



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE  
ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE NEUTRÓFILOS  
IL-17A<sup>+</sup> EN ARTRITIS REUMATOIDE Y DE LOS  
MECANISMOS INDUCTORES PARA LA PRODUCCIÓN DE  
IL-17A**

Tesis que presenta:

**M en C. María de Jesús González Orozco**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

En la especialidad de

**Biomedicina Molecular**

Director de tesis:

**Dr. Vianney Ortiz Navarrete**



# ÍNDICE

Abstract.....	7
Resumen .....	8
Introducción .....	9
Antecedentes .....	11
Autoinmunidad.....	11
Artritis Reumatoide.....	12
Neutrófilos en autoinmunidad.....	17
Antecedentes directos .....	22
Justificación.....	25
Hipótesis.....	26
Objetivos.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos .....	27
Metodología .....	28
Diseño de la investigación .....	28
Definición de la población .....	28
Criterios de inclusión.....	28
Criterios de exclusión .....	28
Tabla 1. Definición de variables.....	29
Detección de pacientes con AR.....	30
Cálculo de DAS28.....	30
Toma de muestra de sangre .....	30
Realización de ultrasonido musculo esquelético.....	30
Medición de VSG y cuantificación de PCR .....	30
Cálculo de DS28-VSG/PCR y SDAI.....	31
Cuantificación de los niveles séricos de citocinas T <sub>H</sub> 1, T <sub>H</sub> 2 y T <sub>H</sub> 17.....	31
Tinción para citometría de flujo de neutrófilos.....	32
Purificación y estimulación de neutrófilos.....	32
Análisis e interpretación de los resultados.....	33
Aspectos éticos .....	33
Resultados.....	34
Características de pacientes y controles.....	34
Clasificación clínica de pacientes de acuerdo a DAS-28-PCR y relación de la actividad clínica con el índice neutrófilos/linfocitos .....	37
Frecuencia de neutrófilos IL-17A+ .....	40
Citocinas séricas .....	46
Frecuencia de linfocitos Th17 .....	46
Estimulación de neutrófilos con DAMPS .....	49
Estimulación de neutrófilos con IL-6 e IL-23.....	51
Discusión .....	53
Conclusiones .....	56

<b>Perspectivas</b> .....	<b>57</b>
<b>Anexo</b> .....	<b>58</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>60</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Etiología de la AR .....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 2. Diferentes etapas de la patogénesis de RA .....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 3. Participación de los neutrófilos y la NETosis en el desarrollo de autoinmidades .....</b>	<b>19</b>
<b>Figura. 4. La frecuencia de los neutrófilos IL-17A<sup>+</sup> se encuentra incrementada en pacientes con asma leve .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 5. NLR se encuentra incrementado en los pacientes con moderada actividad de AR .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6. Frecuencia de neutrófilos en pacientes con AR se encuentra incrementada con respecto al grupo control .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 7. Estrategia experimental .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 8. La frecuencia de neutrófilos IL-17A se encuentra incrementada en pacientes con AR .....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 9. La frecuencia de neutrófilos IL-17A<sup>+</sup> es independiente al estado de actividad de la enfermedad pero no al tiempo de evolución de la AR .....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 10. IL-6 y TNF-<math>\alpha</math> se encuentran incrementados en el suero de los pacientes, no así IL-4, IL-10 IFN-<math>\gamma</math> e IL-17A .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 11. Frecuencia de linfocitos Th17 .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 12. Estímulos inductores de IL-17A .....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 13. La estimulación de con las citocinas IL-6 e IL-23 no incrementa la producción de IL-17A en neutrófilos provenientes de individuos sanos.....</b>	<b>52</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1. Definición de variables .....</b>	<b>29</b>
<b>Tabla 2: Características de los sujetos analizados .....</b>	<b>35</b>
<b>Tabla 3: Manifestaciones extra-articulares presentadas por los pacientes al momento de la toma de muestra .....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 4. Esquema de medicamento recibido por los pacientes con AR .</b>	<b>44</b>

## Abstract

**Objective:** To evaluate the frequency of interleukin 17A-producing neutrophils in patients with rheumatoid arthritis (RA).

**Methods:** A study was conducted in 106 patients with RA and 46 healthy individuals. The patients were classified according to 28 joint disease activity score (DAS-28) as in remission or with low, moderate or high disease activity. Peripheral blood IL-17A-producing neutrophils were identified by flow cytometry.

**Results:** The population of neutrophils positive for cytoplasmic IL-17A was increased in patients with RA (mean 1.2  $\pm$  3.18%) compared with that observed in the healthy individuals (mean 0.08  $\pm$  0.1%). Although there was no difference in the frequency of these cells among all disease activity subgroups, higher frequency of IL-17A-positive neutrophils (mean 6.5  $\pm$  5.14%) was observed in recently diagnosed patients (mean period after disease onset was 3.5  $\pm$  4.24 years).

**Conclusion:** RA patients have an increased frequency of neutrophils producing IL-17A, particularly in patients with a recent onset of disease. These results suggest that IL-17A-producing cells could play a role in early joint inflammation in RA.

## Resumen

La AR es una enfermedad autoinmune en cuyo proceso inflamatorio hay un incremento en la producción de citocinas pro inflamatorias como IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-15, IL-18 e IL-17A, el incremento de estas citocinas se puede detectar tanto en líquido sinovial como en suero de pacientes con esta enfermedad. IL-17A es una citocina pro inflamatoria que promueve el reclutamiento de neutrófilos al sitio de inflamación, así como la activación de osteoclastos los cuales son importantes protagonistas de la reabsorción ósea. Los neutrófilos productores de IL-17A han sido descritos en patologías donde la inflamación tiene un papel muy importante, como es el caso de espondilitis anquilosante, asma, psoriasis entre otras. Como se mencionó anteriormente, la AR es una enfermedad donde se observa una inflamación crónica, por lo tanto nosotros nos preguntamos si los neutrófilos productores de IL-17A podrían estar participando en dicho proceso; para responder esa pregunta, determinamos la frecuencia de los neutrófilos IL-17 en sangre periférica en una cohorte de pacientes con AR. Observamos que hay un incremento en la frecuencia de estos neutrófilos en los pacientes con AR con respecto a los individuos sanos, este incremento fue independiente del estadio de actividad de la enfermedad, pero la mayor frecuencia se observó en pacientes que tenían diagnóstico de menos de 3.5 años mientras los pacientes con más tiempo de evolución presentaron una baja frecuencia. Por lo tanto nuestros resultados sugieren la importancia de estas células en la AR temprana.



## Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica, que afecta principalmente las articulaciones de manos, pies, rodillas y codos, caracterizada por un daño progresivo e irreversible de las articulaciones [1]. Afecta al 1% de la población adulta mundial, predominantemente a mujeres en una relación 3:1 [1, 2], y se estima que en México la prevalencia es del 1.6% [3].

En el proceso inflamatorio de la AR hay un incremento en la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-15, IL-18 e IL-17A, tanto el líquido sinovial como en suero de pacientes con esta enfermedad [4].

IL-17A es una citocina pro inflamatoria importante para el control de infecciones por hongos y otros patógenos extracelulares [5]. La secreción de IL-17A induce el reclutamiento de neutrófilos al sitio de inflamación, además actúa de manera sistémica incrementando los niveles de GM-CSF y G-CSF lo cuales favorecen el desarrollo y velocidad de egreso de neutrófilos, basófilos, eosinófilos y monocitos de médula ósea. Debido a estas y otras funciones IL-17A juega un papel importante en la defensa del hospedero [5].

Dentro de las funciones descritas para IL-17A durante el proceso inflamatorio de AR se encuentra el incremento en la producción de quimiocinas (CCL2, CCL20, CXCL2, CXCL8) y citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) por parte de los fibroblastos sinoviales, además incrementa la producción de metaloproteinasas, bloquea la síntesis de matriz extracelular por parte de los condrocitos, estimula la reabsorción ósea a través de aumentar la expresión del RANKL en osteoblastos y de RANK en precursores de osteoclastos [6, 7].

En AR la inflamación crónica de las articulaciones está caracterizada por una sinovitis e hiperplasia de la membrana sinovial con la concomitante formación de pannus. Una característica importante de la AR es la acumulación de neutrófilos en el líquido sinovial y en el pannus [8].

Por muchos años se ha considerado que la participación de los neutrófilos en la patología de enfermedades inflamatorias como AR, se debe a la liberación de productos citotóxicos como metaloproteinasas, elastasas, catepsinas, las cuales contribuyen al daño del cartílago. Sin embargo, actualmente se ha reconocido que

los neutrófilos tiene también una participación activa durante la progresión de la inflamación regulando funciones de otras células del sistema inmune. Esta función se debe, en gran medida, a su capacidad de secretar una amplia gama de citocinas y quimiocinas las cuales tiene como blanco tanto células del sistema inmune como de las articulaciones afectadas por la enfermedad.

Los neutrófilos de sangre periférica provenientes de pacientes con AR son funcionalmente diferentes a los de individuos sanos, ya que están mejor capacitados para la producir ROS, expresan elevados niveles de TNF- $\alpha$  de membrana y de mieloblastina, los obtenidos de líquido sinovial secretan diversas citocinas y quimiocinas, además de que las condiciones de hipoxia sinovial se incrementa la sobrevivencia de esos neutrófilos a través de IL-8, TNF- $\alpha$  y GM-CSF [9]. Recientemente se describió que los neutrófilos obtenidos de la membrana sinovial de pacientes con AR o del pannus expresan IL-17B mientras que las células cebadas expresan IL-17A, lo que llevo a especular que tal vez la IL-17A estaría reclutando neutrófilos al tejido inflamado mediante la producción de quimioquinas por parte de los fibroblastos sinoviales, mientras que la IL-17B podría contribuir a la estado crónico de la enfermedad [10].

Así mismo se ha observado una acumulación de éstos, en líquido sinovial de los pacientes con AR, así como el índice neutrófilos/ linfocitos (NLR), se asocian con el índice de actividad de la AR, observandose valores altos de NLR en pacientes con alta actividad de la enfermedad y valores bajos en pacientes con baja actividad o remisión [11].

Los neutrófilos además de producir citocinas pro inflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  también producen IL-17A debido a la importancia de esta citocina en el proceso inflamatorio de la AR, consideramos importante evaluar si los neutrófilos de pacientes con AR están produciendo IL-17A y si la frecuencia de ellos es importante en el grado de severidad de la enfermedad.

## **Antecedentes**

### **Autoinmunidad**

El sistema inmunológico tiene la capacidad de reconocer y responder a componentes extraños a nuestro organismo, evitando el reconocimiento de los tejidos propios, sin embargo cuando se pierde el balance en el reconocimiento de lo propio y lo extraño es cuando se generan las enfermedades autoinmunes [12]. Dentro de las cuales se han clasificado cerca de 100 desordenes inflamatorios, estos tienen una prevalencia alta en la población (~7-9%), afectando principalmente a mujeres [13, 14]. Estas enfermedades son generadas debido a la pérdida de la tolerancia central en donde linfocitos B y T autoreactivos escapan a la selección negativa y son exportados a la periferia, normalmente la activación de estas células es controlada por la tolerancia periférica, que incluye mecanismos como la expresión de moléculas inhibitorias, anergia, ignorancia y supresión de la activación de células efectoras por parte de células T reguladoras (Tregs), sin embargo en individuos susceptibles que expresan genes de predisposición (como algunos haplotipos del HLA), que sufren daño del tejido, inflamación o algunas enfermedades infecciosas que promuevan el mimetismo molecular, se genera esta pérdida de la tolerancia lo que lleva al establecimiento y progresión de una patología autoinmune [14]. Que se caracteriza por la presencia elevada de autoanticuerpos en circulación, un incremento de citocinas y quimiocinas en suero y de la proteína C reactiva la cual es un indicador de inflamación [15].

Dependiendo de los órganos o tejidos afectados las autoinmunidades han sido clasificadas como órgano específico algunos ejemplos son: Diabetes tipo I (T1D), esclerosis múltiple (MS), Miastenia Gravis, Enfermedad Inflamatoria de Bowel (IBD) y Cirrosis Biliar Primaria (PBC). Otras enfermedades que reflejan una afectación en diferentes órganos son consideradas sistémicas como lo son Lupus Eritematoso Sistémico (SLE), Psoriasis, Síndrome de Sjögren y Artritis Reumatoide [13, 14].

## **Artritis Reumatoide**

AR es la artropatía inflamatoria más común, la cual además de afectar a las articulaciones tienen algunas manifestaciones extra-articulares que incluyen afección en la piel como nódulos reumatoides (bultos firmes subcutáneos generados de tejido inflamatorio), queratinoconjuntivitis (ojo seco), pleuritis, pericarditis, glomerulonefritis, neuropatía periférica, fenómeno de Raynaud (vasoespasma recurrente en dedos de manos y pies) entre otras [16]. Estas manifestaciones extra-articulares se han relacionado en un incremento en la morbilidad y mortalidad en los pacientes con AR [15].

En la AR como en muchas otras enfermedades autoinmunes se desconoce la etiología, sin embargo se considera ésta una enfermedad multifactorial debido a que tanto factores genéticos como ambientales se han visto relacionados en el desarrollo de esta enfermedad (Figura 1). En cuanto a factores genéticos se ha observado que hay un incremento en el riesgo de desarrollo de AR en los familiares de primer grado de un paciente con AR [17]. Los principales alelos asociados a la susceptibilidad, son HLA-DRB1 \*01, \*04, \*10, los cuales representan el factor genético mas fuerte para el desarrollo de AR, principalmente en aquellos pacientes con Anti-CCP positiva [18]. Por otro lado, individuos en lo que no se asocian los genes de HLA con el desarrollo de la enfermedad, se han asociado alteraciones en otros genes tales como PTPN22 (Proteína tirosina fosfatasa no receptora 22), STAT4, CCR6, CD40 y PADI4 ( Peptidil arginina deaminasa 4, PADI) [17, 18] .

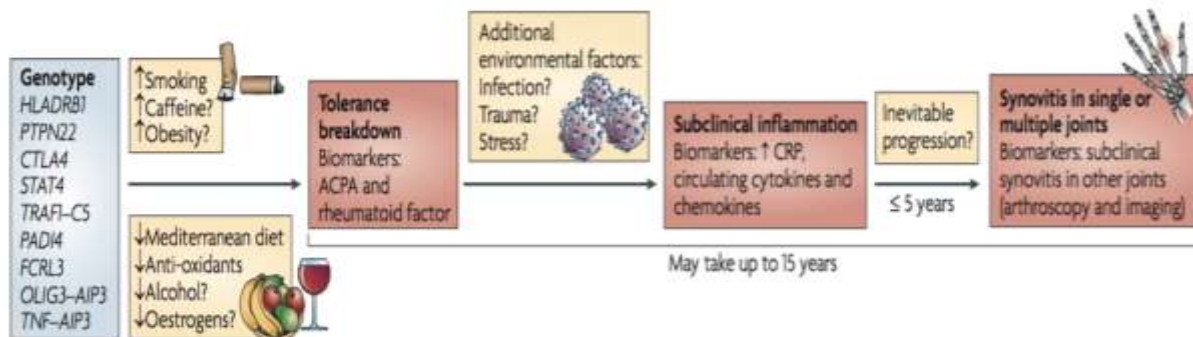
PADI4 es una enzima importante en el desarrollo de AR ya que es la enzima encargada de convertir al aminoácido arginina en citrulina, los residuos de arginina tienen un papel importante en la integridad estructural de la proteína, el cambio a una citrulina genera la perdida de interacciones iónicas y crea nuevas interacciones lo que genera cambios en la estructura y función de las proteínas, lo que ocasiona que se genere la perdida de la tolerancia [19].

Se considera que los factores ambientales también juegan un papel importante en el desarrollo de AR, algunas infecciones como periodontitis causada por

*Porphyromonas gingivalis* e infecciones por el virus Epstein–Barr se han asociado con la patogénesis de la AR, en cuanto a la infección por *Porphyromonas gingivalis* se sabe que esta expresa un ortólogo de la PAD promoviendo la citrulinación de péptidos que pueden ser detectados como autoantígenos, otros factores como fumar debido a que se ha observado que el humo del cigarro incrementa la expresión de PAD en pulmón lo que también lleva a la citrulinación de proteínas; se ha descrito que el péptido antimicrobiano LL37 es citrulinado y que es liberado durante la formación de NETs, lo que podría llevar a la inducción de respuestas patológicas importantes en el desarrollo de autoinmunidad [20]. También la deficiencia de vitamina D y obesidad se han asociado a la inducción de la pérdida de la tolerancia lo que desencadena en la producción de autoanticuerpos llevando al inevitable desarrollo de la enfermedad [9, 17, 21].

Uno de los primeros bio marcadores que se pueden detectar es la presencia de auto anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos (Anti-CCP) y Factor reumatoide (Anticuerpos contra la fracción Fc de la IgG) ambos importantes en el diagnóstico de la enfermedad [18, 22].

Uno de los primeros eventos con los que se inicia la enfermedad ocurre en los órganos linfoides periféricos (figura 2) donde los linfocitos T autoreactivos activados por células presentadoras de antígenos (APCs) que presentan autoantígenos proveen señales de cooperación a linfocitos B autoreactivos los cuales producen autoanticuerpos, éstos al reconocer a su autoantígeno citrulinado (vimentina, fibronetina, fibrinógeno,  $\alpha$  enolasa, etc. citrulinadas) forman inmunocomplejos lo cuales son depositados en la articulación donde inducen la activación del complemento o bien activan a células de la respuesta inmune innata como macrófagos, células cebadas y neutrófilos a través de los receptores Fc, tras la activación de estas células se producen citocinas pro inflamatorias y quimiocinas, lo cual induce el reclutamiento de un mayor número de células a la cavidad sinovial exacerbando la inflamación, estas células que arriban al sitio de inflamación generan la formación de un tejido invasivo llamado pannus [23] [24, 25].



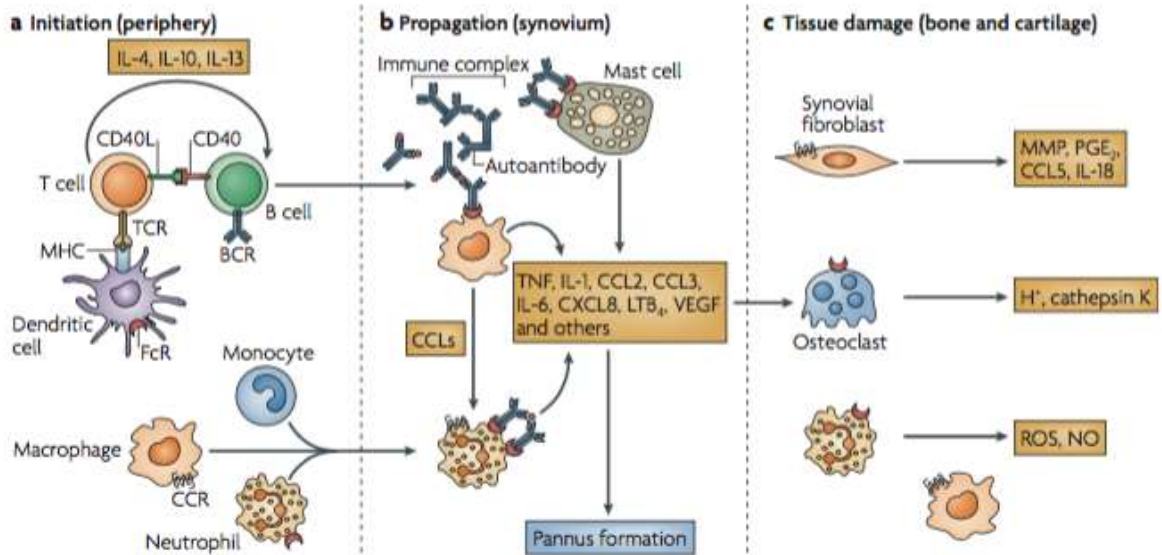
**Figura 1. Etiología de la AR.** Los factores genéticos juegan un papel muy claro en el desarrollo de AR, uno de los factores genéticos de riesgo mas importantes son los haplotipos DRB1 del MHC II, sin embargo no todos los individuos que presentan los haplotipos de riesgo desarrollan la enfermedad o bien no todos los individuos con la enfermedad presentan este haplotipo, o algunos otros factores genéticos de riesgo; lo que lleva a la implicación de otros factores como lo son los ambientales, se ha observado un mayor riesgo en el desarrollo de AR en individuos que fuman cigarrillos sobre todo en la AR seropositiva ya que incrementa la producción de ACCP, algunos factores que se cree disminuyen el riesgo del desarrollo de AR es la dieta mediterránea debido al consumo de vegetales y frutas y altos niveles de anti oxidantes. Antes de presentar las manifestaciones clínicas características de la AR se pueden detectar la presencia de ACCP y FR en suero de los individuos, aunque no queda aun claro como los factores ambientales adicionales como estrés, trauma o infecciones algunos pacientes reportan haber sufrido de estos antes de presentar las manifestaciones clínicas de la enfermedad, esto lleva al incremento de la proteína C reactiva y la velocidad de sedimentación globular (VSG) así como citocinas y quimiocinas las cuales se pueden observar incrementadas poco tiempo antes de la presentación de la enfermedad la cual se caracteriza por sinovitis en una o varias articulaciones (tomado de Isaacs, 2010 Nat Rev Immunol).

Los macrófagos principalmente los de tipo M1 (Inflamatorios) contribuyen en la patología de la enfermedad ya que son fuente importante de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, quimiocinas y MMPs que favorecen el daño y destrucción del tejido[24].

Los fibroblastos sinoviales también tienen una participación importante en el daño al tejido debido a que son activados por los altos niveles de citocinas pro inflamatorias, y producen enzimas como MMPs, Prostaglandina E2 y citocinas pro inflamatorias generando así la destrucción del cartílago.

Los precursores de osteoclastos presentes en el tejido de la articulación pueden ser activados por los anticuerpos anti-CCP debido a que en su superficie expresan proteínas citrulinadas o bien a través de los receptores Fc que unen a los inmunocomplejos formados por los autoanticuerpos; en ambos casos, se induce la liberación de IL-8 que actúa de manera autocrina favoreciendo la maduración de los osteoclastos encargados de la reabsorción ósea [25].

Durante las primeras etapas del proceso inflamatorio de la AR se incrementa la frecuencia de neutrófilos en el fluido sinovial donde participan activamente debido a que producen y liberan una gran cantidad de mediadores inflamatorios como especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógenos (NO), así como diversas enzimas proteolíticas como mieloperoxidasa (MPO), MMPs, elastasas, Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs), etc [26, 27].



**Figura 2. Diferentes etapas de la patogénesis de RA.** a) El primer evento inductor de la autoinmunidad se cree se genera en órganos linfoides periféricos donde los linfocitos T autoreactivos activados tras reconocer autoantígenos estimulan a los linfocitos B autoreactivos para producir autoanticuerpos. b) estos autoanticuerpos depositados en el sinovio ocasionan la propagación de la enfermedad debido a que pueden formar inmunoclomplejos y activar a las células que han sido reclutadas lo que lleva a un incremento en el reclutamiento de células llevando a la formación del panus. c) la etapa final de la AR ocasiona el daño en el tejido debido a la activación de las células en la articulación y a la liberación de enzimas proteolíticas se genera la degradación del cartílago y la reabsorción ósea ( Tomado de Rommel et al 2007 *Nat Rev Immunol*)



## Neutrófilos en autoinmunidad

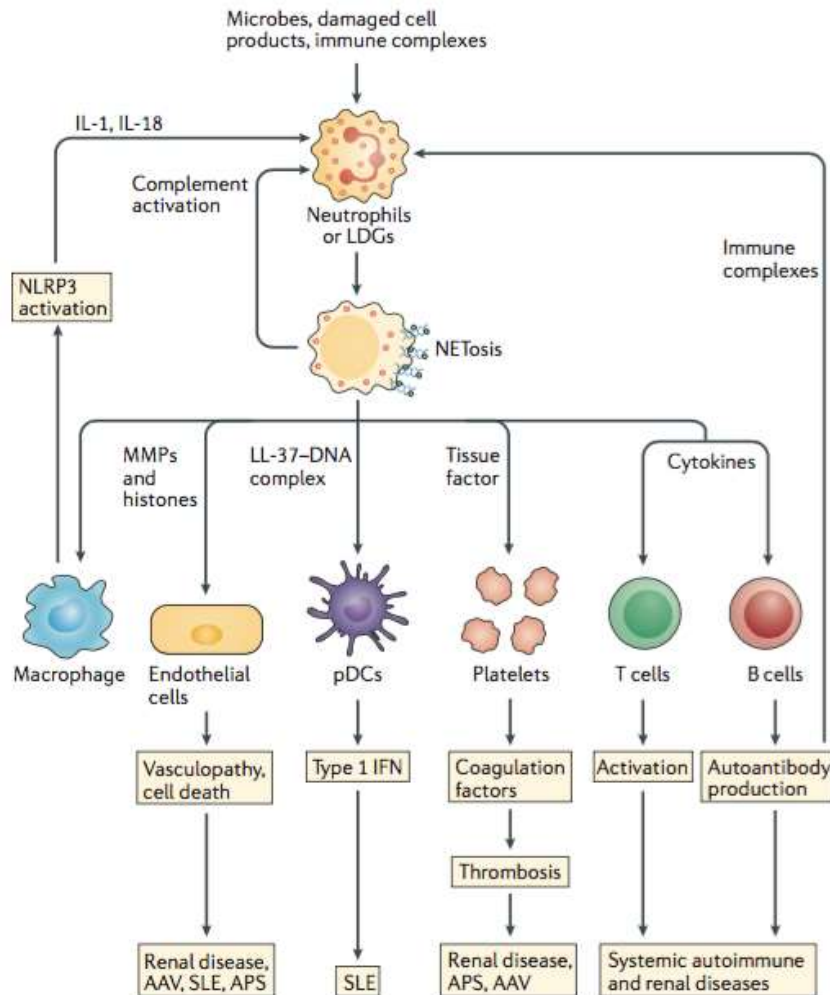
Los neutrófilos son los leucocitos mas abundantes de la sangre, se originan en médula ósea y egresan a circulación como células totalmente diferenciadas, son las primeras células en ser reclutadas al sitio de inflamación y representan nuestra primera línea de defensa frente a microorganismos debido a su amplio espectro de mecanismos como lo son la fagocitosis, como ya se mencionó anteriormente liberan diversas enzimas contenidas en sus gránulos citoplasmáticos, así como la formación de NETs [28] [29].

Sin embargo estos mecanismos que operan durante una infección también lo pueden hacer durante la inflamación estéril o en ausencia de patógeno como lo son las autoinmunidades, debido a que los también neutrófilos pueden ser activados por patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) e inmunocomplejos [29].

Los neutrófilos en circulación tienen un periodo de vida corto y normalmente mueren por apoptosis en aproximadamente 24 horas, pero cuando estos son activados en condiciones de inflamación por algunas citocinas pueden extender su longevidad por algunos días, debido a que se induce la expresión de genes antiapoptóticos como Mcl-1 que les permite continuar contribuyendo a la inflamación [9]. Algunos estudios han demostrado que los neutrófilos de vida larga también tienen perfil de expresión diferente ya que se ha observado que incrementan la expresión de CD54 y disminuyen la expresión de CXCR1 receptor de IL-8, quimiocina importante para el reclutamiento de neutrófilos, estos neutrófilos que se encuentran en circulación provienen de una transmigración reversa, es decir estas células realizaron una migración a través del endotelio probablemente fueron activadas en los tejidos y logran regresar a la circulación, Los neutrófilos que realizaron la transmigración tienen una apoptosis disminuida en comparación con los naive, *in vivo* se ha observado que el 1-2% de los neutrófilos en circulación de pacientes con una inflamación sistémica tienen un fenotipo de neutrófilos que realizaron transmigración reversa (CD54<sup>hi</sup> CXCR1<sup>lo</sup>) [30].

Los neutrófilos de pacientes con autoinmidades como lo es AR o SLE, entre otras están mejor capacitados en su producción de ROS, algunas citocinas como RANKL y BAFF implicados en la activación de osteoclastos y linfocitos B, así como tienen una mayor capacidad de formación de NETs [9, 26, 29]. La formación de NETs es un mecanismo importante de los neutrófilos que les permite liberar su contenido de DNA, proteínas citoplasmáticas y enzimas normalmente contenidas en sus gránulos primarios, como MPO y elastasa, gránulos secundarios como lactoferrina y de los gránulos terciarios como MMP9. Esta red es importante para combatir infecciones bacterianas, virales o por hongos ya que permite que los microorganismos queden atrapados en esas redes y debido a que contienen esas diferentes enzimas proteolíticas, citocinas y péptidos antimicrobianos pueden ser de esta manera eliminadas [31].

Debido a que durante la formación de las NETs hay liberación de moléculas intracelulares como DNA y de proteínas que normalmente no están disponibles al sistema inmune, se cree que por ello, son fuente importante de autoantígenos favoreciendo la disponibilidad de éstos a las clonas autoreactivas encargadas de la producción de autoanticuerpos (Figura 3), el DNA liberado es reconocido por los receptores TLR 9 presentes en las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) esto desencadena la producción de IFN tipo I y II por parte de éstas células, que es muy importante en el desarrollo de algunas patologías como SLE, también pueden activar a las plaquetas lo que ocasiona la cascada de factores de coagulación y trombosis importantes en el desarrollo de enfermedades renales o bien puede ocasionar el daño a las células endoteliales por la liberación de MMPs esto puede ser ocasionar vasculopatías que es una característica importante de muchas enfermedades autoinmunes [29, 32].



**Figura 3. Participación de los neutrófilos y la NETosis en el desarrollo de autoinmidades.** Los neutrófilos pueden ser activados al detectar moléculas provenientes de patógenos o bien durante la inflamación estéril por los DAMPs e inmunocomplejos, esta activación puede llevar a la muerte por NETosis lo que ocasiona la formación de las trampas extracelulares liberándose el contenido de DNA, enzimas, citocinas y otras moléculas como histonas y péptidos antimicrobianos lo que favorece la activación de macrófagos y células endoteliales así como la activación de plaquetas y la producción de IFN tipo I, las NETs también pueden favorecer la activación de linfocitos T y B para la producción de autoanticuerpos, todo esto impacta en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como SLE, vasculitis asociada a anticuerpos anticitoplasma ANCA (AAV), Síndrome de anticuerpos antifosfolipidos (APS), enfermedad renal. (Tomado de Gupta et al., 2016, *Nat Rev, Nephrology*).

Durante la NETosis el DNA que se libera se encuentra en forma de cromatina es decir esta unido a histonas las cuales son susceptibles a modificaciones post traduccionales como la citrulinación lo que permite la descondensación de la cromatina y la consecuente liberación, estas proteínas citrulinadas que quedan expuestas pueden ser reconocidas como autoantígenos, al estar éstos expuestos los linfocitos B pueden reconocerlos y montar una respuesta que lleva a la producción de los autoanticuerpos contra péptidos citrulinados [28].

Se ha observado que algunos estímulos importantes para la generación de NETs son citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-8 e IL-17A todas estas se encuentran de manera abundante en el suero y líquido sinovial de los pacientes con AR; además también se observó que los autoanticuerpos presentes en el suero de los pacientes también son un estímulo importante que promueve la generación de NETs, así mismo los autoanticuerpos presentes en los pacientes con AR pueden unirse a las NETs uno de los principales epítomos descritos a los que se unen es vimentina citrulinada, esto es importante ya que las NETs podrían estar sirviendo como una fuente de autoantígenos, que permite mantener la respuesta patología en las autoinmidades [28].

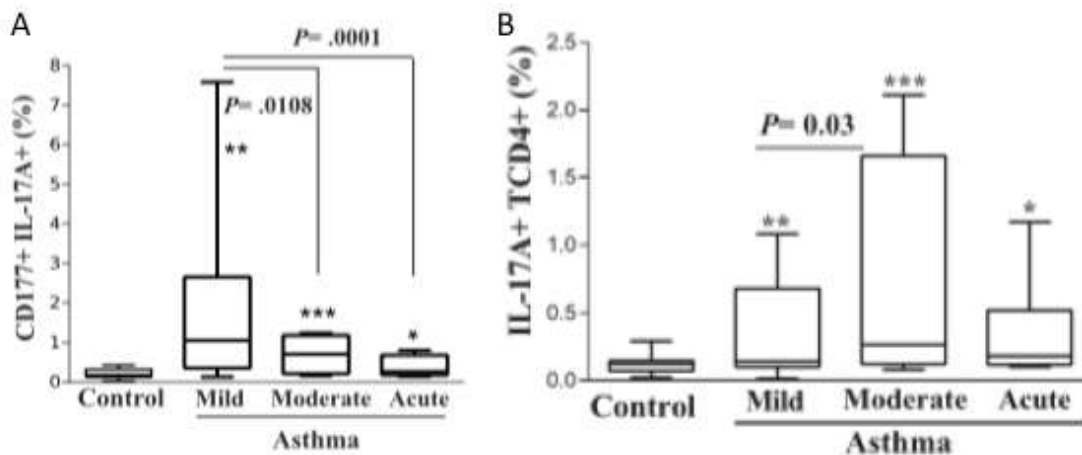
Además de la NETosis también se ha observado que los neutrófilos, mediante un mecanismo todavía no identificado, pueden liberar su contenido de DNA mitocondrial (mtDNA); el cual contiene motivos CpG hipometilados al igual que las bacterias; estos motivos son reconocidos por TLR9 presentes en las pDCs lo que induce la activación que y promueve la producción de IFN tipo I que como se mencionó es importante en el desarrollo de SLE [33, 34]. A diferencia que en la generación de NETs, durante el proceso de expulsión del mtDNA los neutrófilos no mueren, ni tampoco presentan daño en su membrana plasmática, pero si pueden ser activados con el mtDNA que están liberando, incrementando así la respuesta inflamatoria [33].

Los neutrófilos además participan en el proceso inflamatorio de las enfermedades autoinmunes mediante la producción de citocinas y quimiocinas, se ha demostrado que los neutrófilos producen un amplio panel de citocinas como BAFF, RANKL, IL-1 $\alpha$ , IL-1RA, IL-1 $\beta$ , IL-7, IL-12, IL-18, IL-23, MIF, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, IFN- $\gamma$ , IL-17A e

IL-17B y quimicinas como CCL2, CCL3, CCL4, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, todas estas importantes en la activación y reclutamiento celular así como para la activación de osteoclastos [9, 35].

## Antecedentes directos

Como se comentó anteriormente los neutrófilos también producen IL-17A, nuestro grupo describió en otra enfermedad inflamatoria crónica como es el asma, la frecuencia aumentada de neutrófilos de sangre periférica productores de IL-17A en comparación de individuos sanos, siendo los pacientes con asma leve los que presentaban una mayor frecuencia de estas células (figura 4A) [36]. Por otro lado en estos pacientes se observó una disminución en la frecuencia de células Th17 (figura 4B). Lo que pone de manifiesto la importancia de los neutrófilos como productores de dicha citocina.



**Figura. 4. La frecuencia de los neutrófilos IL-17A<sup>+</sup> se encuentra incrementada en pacientes con asma leve.** A) Frecuencia de neutrófilos IL-17A<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes con asma e individuos sanos. B) Frecuencia de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en sangre periférica de pacientes con asma e individuos sanos.

Además la población de neutrófilos productores de IL-17A también se ha visto incrementada en diferentes patologías como lo son la fibrosis quística [37], enfermedades relacionadas con hongos como la queratitis fúngica [38], así como enfermedades autoinmunes como psoriasis, donde observa que en la lesiones psoriaticas hay un numero elevado de células cebadas y neutrófilos, ambas poblaciones producen IL-17, que liberan a través de NETosis. De importancia

señalar que los linfocitos Th17 no fueron la población predominante en las lesiones psoriaticas de los pacientes estudiados[39] .

Las células cebadas productoras de IL-17A también se han observado incrementadas en el líquido sinovial de los pacientes con AR y que algunos factores solubles como TNF- $\alpha$ , C5a e inmunocomplejos así como el LPS inducen la producción de IL-17A estas células cebadas también la expresan el factor de transcripción de IL-17, ROR- $\gamma$ t [40].

Los neutrófilos productores de IL-17A también se encuentran incrementados en muestras de tejido invasivo de cáncer gástrico donde estos estarían favoreciendo la angiogénesis promoviendo el progreso de la enfermedad [41].

La IL-17A producida por los neutrófilos es importante en el modelo murino de isquémica-reperfusión en riñón ya que induce la producción de IFN- $\gamma$  favoreciendo la migración de neutrófilos [42]. Esta población de neutrófilos también es importante durante la infección por pneumococo ya que la IL-17A producida por los neutrófilos induce la producción de IFN- $\gamma$  lo que favorece la activación de macrófagos inflamatorios (M1) y la eliminación del patógeno [43].

En espondilitis anquilosante (EA) se ha observado que los neutrófilos son la principal fuente de IL-17A ya que al analizar otras poblaciones como CD3 y células cebadas no se observó un incremento en la frecuencia de estas células positivas a IL-17A en membrana sinovial de esos pacientes. Por otro lado cuando analizaron pacientes con osteoartritis (OA) una enfermedad de etiología diferente a EA no se observaron incrementadas ni neutrófilos, ni células cebadas, lo que nos hace pensar que esta población es importante en la fisiopatología de las enfermedades autoinmunes [44].

Un aspecto importante de estos neutrófilos productores de IL-17A es conocer que estímulos están induciendo la producción de IL-17A, aspecto que ha sido abordado por diferentes grupos de investigación y se ha observado que al igual que las células Th17 los neutrófilos expresan el factor de transcripción de IL-17A ROR- $\gamma$ t el cual tras la activación con las citocinas IL-23 e IL-6 es traslocado al núcleo donde se posa en el promotor de IL-17A y permite la transcripción de esta citocina [45, 46].

Recientemente se ha observado que los neutrófilos provenientes de pacientes con asma producen cantidades importantes de IL-17A cuando son estimulados con las citocinas IL-23, IL-6 e IL-21 en contraste los neutrófilos provenientes de individuos sanos estimulados con las mismas citocinas, producen cantidades menores; ello se debe a una incapacidad de fosforilación de STAT3 factor de transcripción que se encuentra reducido en la señalización de estas citocinas [47].

Sin embargo se desconoce si hay algunos otros estímulos independientes de las citocinas ya mencionadas que promuevan la producción de IL-17A, durante el proceso inflamatorio de la AR además de la producción de estas citocinas hay liberación de mediadores inflamatorios los cuales pueden actuar como moléculas asociadas a daño (DAMPs) éstas activan a receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) y desencadenan una cascada de señalización que termina en producción de citocinas pro inflamatorias como IL-6 e IL-1 $\beta$  exacerbando la inflamación en ausencia de infección.

Los neutrófilos poseen estos PRRs que pueden ser activados por los DAMPs presentes en el microambiente de la AR sin embargo se desconoce si a través de esta activación se puede inducir la producción de IL-17A.

En el modelo murino de AR mediado por autoanticuerpos K/BxN los neutrófilos que se encuentran en la membrana sinovial son fuente importante de IL-1 $\beta$ , la cual actúa de forma autocrina y paracrina y permite la migración y reclutamiento de neutrófilos a la articulación exacerbando la patología de la AR [48].



## **Justificación**

Interleucina 17 es una citocina pro inflamatoria que contribuye a la inflamación y cronicidad en la AR, las primeras células en ser descritas como productoras de esta citocina fueron los linfocitos Th17, por lo que implicó a estas células en el proceso inflamatorio de la AR, sin embargo el número de estas células es bajo en la AR. Lo que lleva a pensar que otras células productoras de IL-17 son importantes en la fisiopatología de la AR. Debido a que los neutrófilos se encuentran incrementados en la AR y que se sabe participan de manera activa en la destrucción del cartílago, esta población también podría estar contribuyendo a la inflamación mediante la producción de IL-17, por lo que consideramos de importancia evaluar la frecuencia de los neutrófilos productores de IL-17A en pacientes con AR con el fin de analizar la importancia que tienen estas células durante el proceso inflamatorio de la AR.

## **Hipótesis**

La población de neutrófilos IL-17A<sup>+</sup> se encuentra incrementada en pacientes con AR con respecto a individuos sanos. Y diversos DAMPs presentes en el ambiente inflamatorio de la enfermedad estimulan a los neutrófilos a producir IL-17.

## **Objetivos**

### **Objetivo general.**

- Evaluar la frecuencia y estímulos inductores de la producción de IL-17A en neutrófilos.

### **Objetivos específicos.**

- 1- Determinar la frecuencia de neutrófilos IL-17A<sup>+</sup> de sangre periférica de pacientes con artritis reumatoide.
- 2- . Evaluar la frecuencia de las células TH1, TH2 y TH17 así como su perfil de activación en sangre periférica de pacientes con AR.
- 3- . Determinar los niveles en suero de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-2
- 4- Evaluar la capacidad de agonistas de TLR de inducir la producción de IL-17A en neutrófilos.
- 5- Evaluar la capacidad de moléculas asociadas a daño liberadas durante la inflamación de la AR de inducir la producción de IL-17A.

## **Metodología**

### **Diseño de la investigación**

- Estudio de casos y controles
- Observacional, transversal y descriptivo

### **Definición de la población**

#### **Criterios de inclusión**

##### **Grupo de AR**

- Pacientes de ambos sexos
- Edad mayor o igual a 18 años
- Diagnóstico de AR, acorde a criterios ACR/EULAR 2010
- Con o sin tratamiento farmacológico (en caso de agente biológico, únicamente con bloqueadores del TNF- $\alpha$ )
- Consentimiento informado firmado

##### **Grupo control**

- Individuos sanos
- Pareados por edad y sexo con el grupo de AR

#### **Criterios de exclusión**

##### **Criterios de no inclusión**

- Proceso infeccioso activo
- Presencia de alergias, asma
- Coexistencia de enfermedad autoinmune, excepto Síndrome de Sjögren

##### **Criterios de eliminación**

- Retiro del consentimiento informado
- Muestra insuficiente

**Tabla 1. Definición de variables**

Independiente	Tipo	Unidad de medida	Definición conceptual	Definición operacional
Actividad de AR	Cualitativa ordinal	AR remisión	DAS28-VSG/CRP < 2.6 CDAI/SDAI ≤2.8	DAS28-VSG/CRP < 2.6 CDAI/SDAI ≤2.8 + sin DP
		AR leve	DAS28-VSG/CRP 2.6-3.2 CDAI/SDAI >2.8-10.0	DAS28-VSG/CRP 2.6-3.2 CDAI/SDAI >2.8-10.0 + DP
		AR moderada	DAS28-VSG/CRP 3.3-5.1 CDAI/SDAI >10.0-22.0	DAS28-VSG/CRP 3.3-5.1 CDAI/SDAI >10.0-22.0 + DP
		AR severa	DAS28-VSG/CRP > 5.1 CDAI/SDAI >22	DAS28-VSG/CRP > 5.1 CDAI/SDAI >22 + DP
Dependiente	Tipo	Unidad de medida	Definición conceptual	Definición operacional
Neutrófilos IL-17A+	Cuantitativa continua	Porcentaje	Leucocito polimorfonuclear productor de IL-17A+	Leucocito polimorfonuclear productor de IL-17A+

**AR** = Artritis reumatoide. **DAS28-PCR** = Puntaje obtenido al evaluar la actividad de la enfermedad en 28 articulaciones + los niveles séricos de proteína C reactiva. **DP** = Señal Doppler positiva obtenida mediante ultrasonido musculoesquelético.

## **Detección de pacientes con AR**

Se detectaron a los pacientes de acuerdo a los criterios de selección, en la clínica de AR de la consulta externa de reumatología de los días martes y jueves. Se invitaron a los pacientes detectados a participar en el protocolo de investigación y se les programó una cita en martes para cálculo de DAS28 y CDAI y para toma de muestra y en jueves para realización de US7.

## **Cálculo de DAS28**

A los pacientes que aceptaron participar en el protocolo de investigación y firmaron el consentimiento informado, se les calculó DAS28 y CDAI por medio del interrogatorio y la exploración física.

## **Toma de muestra de sangre**

Posterior al cálculo de DAS28, se obtuvo una muestra de 26 mL de sangre periférica mediante venopunción periférica en el área antero cubital, la cual fue recolectada en un tubo seco vacutainer de tapa roja y en tubos de heparina (HWB).

## **Realización de ultrasonido musculo esquelético**

Se realizó el ultrasonido musculo esquelético con un equipo Esaote MyLab 25 con transductor lineal con frecuencia de 18 MHz, posterior al cálculo de DAS28 y de la toma de muestra.

## **Medición de VSG y cuantificación de PCR**

Se midió la velocidad de sedimentación globular (VSG) y se cuantificó la proteína C reactiva (PCR) en el laboratorio central del Hospital Juárez de México.

## **Cálculo de DS28-VSG/PCR y SDAI**

Se calculó el DAS28-VSG/PCR y SDAI con las determinaciones de VSG y PCR

## **Cuantificación de los niveles séricos de citocinas T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub> y T<sub>H17</sub>**

Se determinaron los niveles de citocinas en suero de los pacientes e individuos sanos utilizando el kit de BD CBA cat # 560484 que permite la determinación de citocinas como IL-17A, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10.

## **Obtención de PBMCs**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se obtuvieron por gradiente de ficoll (Ficoll-paque plus) según las indicaciones del fabricante; la sangre se diluyó 1:1 en amortiguador de fosfato salino, posteriormente se realizó el gradiente de ficoll en una proporción 1:2 se agregó la sangre evitando mezclarla con el ficoll, se centrifugó a 400g durante 30 minutos a 20 °C, se obtuvo el anillo de PMBCs y se evaluó su viabilidad realizando una tinción con azul tripano, los PBMCs obtenidos se utilizaron para la fenotipificación de las células TH17 .

## **Tinción para citometría de flujo para linfocitos T**

Las células se procesaron para la caracterización de las poblaciones mediante citometría de flujo utilizando los anticuerpo específicos para las poblaciones deseadas (anti CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PB) así como para moléculas de activación (anti CD69-APC y CRTAM-APC) durante 20 minutos a 4 °C posteriormente se lavaron con PBS-1 % suero fetal bovino (SFB) posteriormente las células fueron fijadas y permeabilizadas con Perm2 (BD Biosciences) para luego realizar la tinción intracelular para las citocinas IL-4-PECy7, IFN- $\gamma$ -PE-Cy7, IL-17-PerCP-Cy5.5 durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Las células fueron analizadas en el citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences).

## **Tinción para citometría de flujo de neutrófilos.**

Las células fueron teñidas para citometría de flujo con los anticuerpos específicos para las poblaciones de neutrófilos (CD177-FITC) y eosinófilos (IL-5R $\alpha$ -PE), además se marcaron para determinar moléculas de activación con los anticuerpos anti CRTAM-APC y CD69-APC a 4°C durante 20 minutos, una vez realizada la tinción de superficie, las células fueron fijadas y permeabilizadas para realizar la tinción intracelular con anti-IL-17A-PerCP-Cy5.5 durante 30 minutos a TA una vez terminada la tinción se lisaron los eritrocitos con amortiguador de lisis de eritrocitos (150mM NH<sub>4</sub>C1, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, and 0.1 mM EDTA, pH 7.3). Posteriormente las células se analizaron mediante citometría de flujo (Ramírez-Velázquez, 2013).

## **Purificación y estimulación de neutrófilos**

Se purificaron neutrófilos a partir de sangre periférica de donadores sanos usando el método de Ficoll, se sedimentaron los eritrocitos con PBS 3% Dextran, posteriormente se recolectó el sobrenadante y con éste se realizó un gradiente de ficoll lo cual permite la separación de PBMCs y neutrófilos, se recolectaron los neutrófilos y se lisaron los eritrocitos restantes con amortiguador de lisis de eritrocitos, posteriormente se realizó el conteo celular mediante una tinción de azul tripano, usando un contador automático de células TC10 (Biorad). Las células se pusieron en medio de cultivo RPMI y se sembró 1 millón de células en 1mL de medio en placas de cultivo de 24 pozos, donde fueron estimuladas con los respectivos reactivos HA50K, HA250K y HA completo 100 $\mu$ g/mL así como con TNF $\alpha$  5, 10 y 20 ng/mL y con fibrinógeno y peptidoglicano 1ng/mL durante 3 horas en presencia del fármaco brefeldina (BFA) para inhibir trafico intracelular y poder detectar la citocina dentro de la célula. Una vez terminada la incubación se realizó una tinción para citometría como se describió anteriormente.



Además de la estimulación con DAMPs y PAMPS los neutrófilos fueron estimulados con las citocinas IL-6 a una concentración de 20 $\mu$ g/mL e IL-23 a 2 $\mu$ g/mL durante 3 horas en presencia de BFA.

### **Análisis e interpretación de los resultados**

El análisis estadístico descriptivo e inferencial se realizó con el software Graph Pad prism 6. Se utilizó la prueba de Mann-Whitney cuando se analizaron dos grupos y Kruskal-Wallis cuando mas de dos grupos fueron analizados.

### **Aspectos éticos**

El presente protocolo se realizó de acuerdo a lo dispuesto en la Ley General de Salud, cuya última reforma fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 18 de diciembre de 2007, así como con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud, cuya última reforma fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el 6 de enero de 1987. Además, el estudio se apega a los principios de la Asamblea Médica Mundial para la investigación en seres humanos, establecidos en la Declaración de Helsinki en 1964 y sus diferentes revisiones, siendo la última la de Fortaleza, Brazil en 2014. El presente trabajo de acuerdo a la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud investigación, Título Segundo sobre Los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos, Capítulo I, Artículo 17, Sección III, se categorizó como una investigación con riesgo mínimo debido a que sólo se extrajo un volumen de sangre de 12 mL por punción venosa a adultos hemodinámicamente estables en una sola ocasión. Este estudio requirió consentimiento informado para los pacientes evaluados de manera prospectiva. Asimismo, el proyecto se sometió a la aprobación por el comité de Ética, Investigación y Bioseguridad del Hospital Juárez de México.

## Resultados

### Características de pacientes y controles

Analizamos 106 pacientes que fueron diagnosticados con artritis reumatoide de acuerdo a los criterios descritos por el Colegio de Reumatología Americano por sus siglas en ingles (ACR) y la Liga Europea contra el reumatismo (EULAR). Las características demográficas y clínicas obtenidas de los resultados de laboratorio se encuentran descritas en la tabla 1. El 87.7% (93) de los pacientes fueron mujeres y el 12.2% (13) hombres; promedio de la edad de los pacientes fue 50.7 años  $\pm$  1.2. El 86.1% de los pacientes tenía factor reumatoide por arriba de los niveles normales ( $>60$ U/ml), el 80.3% de los pacientes tienen velocidad de sedimentación globular arriba de lo normal y el 9.2% tiene PCR arriba de los niveles normales. El 13.8% de los pacientes tienen un familiar de primer grado con alguna enfermedad autoinmune. Al analizar las manifestaciones extra-articulares secundarias de AR el 14.6% tienen nódulos reumatoides actuales, el 1.8% de los pacientes tienen fenómeno de Raynaud, solo el 0.9% de los pacientes tienen vasculitis cutánea; el 79.4% presentaron síndrome de ojo seco y el 79.4% presentaba erosión ósea (tabla 2). El grupo control incluyó 46 individuos sanos 65% (30) mujeres y 35% (16) hombres; la media de edad del grupo control fue de 42.3  $\pm$  2.5; y ninguno de los individuos en este grupo tenía familiares de primer grado con enfermedades autoinmunes. Ninguno de los pacientes o del grupo control, presentaron síntomas de infección cuando se realizó la toma de muestra. Todos los individuos incluidos en este proyecto dieron su consentimiento informado por escrito para la toma de muestra.

**Tabla 2: Características de los sujetos analizados**

	<b>Pacientes AR</b>	<b>Controles Sanos</b>
<b>Sexo Femenino/Masculino</b>	<b>93/13</b>	<b>30/16</b>
<b>Edad (años) (media± SEM)</b>	<b>50.7± 1.2</b>	<b>42.3 ± 2.5</b>
<b>Anti-CCP (UI/L) (media± SD)</b>	<b>322.2 ± 282.1</b>	<b>ND</b>
<b>FR (U/ml) (media± SD)</b>	<b>431.2 ± 701.98</b>	<b>ND</b>
<b>VSG mm/h (media± SD)</b>	<b>32.4 ± 13.25</b>	<b>19.2 ± 11.36</b>
<b>PCR mg/dL (media± SD)</b>	<b>1.35± 1.74</b>	<b>0.33 ± 0.07</b>
<b>Tiempo de evolución (años) (media± SEM)</b>	<b>9.4 ± 0.81</b>	<b>ND</b>

ND: No determinado

**Tabla 3: Manifestaciones extra-articulares presentadas por los pacientes al momento de la toma de muestra.**

<b>Manifestación extra-articular</b>	<b>% (n)</b>
Nódulo Reumatoide	14.6% (16)
Fenómeno de Raynaud	1.8% (2)
Vasculitis cutánea	0.9% (1)
Queratoconjuntivitis sicca	79.4 (84)

## **Clasificación clínica de pacientes de acuerdo a DAS-28-PCR y relación de la actividad clínica con el índice neutrófilos/linfocitos**

La AR puede clasificarse según, el instrumento clínico, DAS-28 que toma en cuenta la inflamación y dolor de 28 articulaciones (manos, codos, hombros, rodillas) además del resultado de la determinación de PCR, en 4 grupos: remisión, pacientes con baja actividad, con moderada actividad y con alta actividad. De acuerdo a esos criterios, la cohorte estudiada se subdividió de la siguiente manera: 38 pacientes en remisión ( $\text{DAS-28} < 2.6$ ), 14 con baja actividad ( $\text{DAS-28} \geq 2.6 < 3.2$ ), 45 con actividad moderada ( $\text{DAS-28} \geq 3.2 \leq 5.1$ ) y 9 con alta actividad ( $\text{DAS-28} \geq 5.1$ )

De acuerdo a los resultados provenientes de la biometría hemática, el porcentaje de neutrófilos de los pacientes estuvo incrementado en comparación a los individuos del grupo control (media  $63.9\% \pm 10.73$  AR vs.  $58.01\% \pm 6.17$  sanos  $p=0.0004$ ); (figura 5) sin embargo, en ambos casos los valores se encuentran dentro el rango considerado como niveles normales. Se ha reportado que el índice neutrófilos/linfocitos (NLR) se relaciona con el índice de actividad de la enfermedad [11]; en ese sentido, observamos que el grupo con el menor índice fue el de remisión  $2.5 \pm 0.43$ , el de los pacientes con baja actividad fue de  $3.2 \pm 0.93$ , de los pacientes con moderada fue de  $5.3 \pm 0.84$  y pacientes con alta actividad fue de  $3.61 \pm 1.27$  (figura 6). Estos resultados coinciden con los lo reportados previamente por Tekeoglu y cols [11] y nos indican que los números circulantes de neutrófilos impactan en el estado de actividad de la enfermedad.

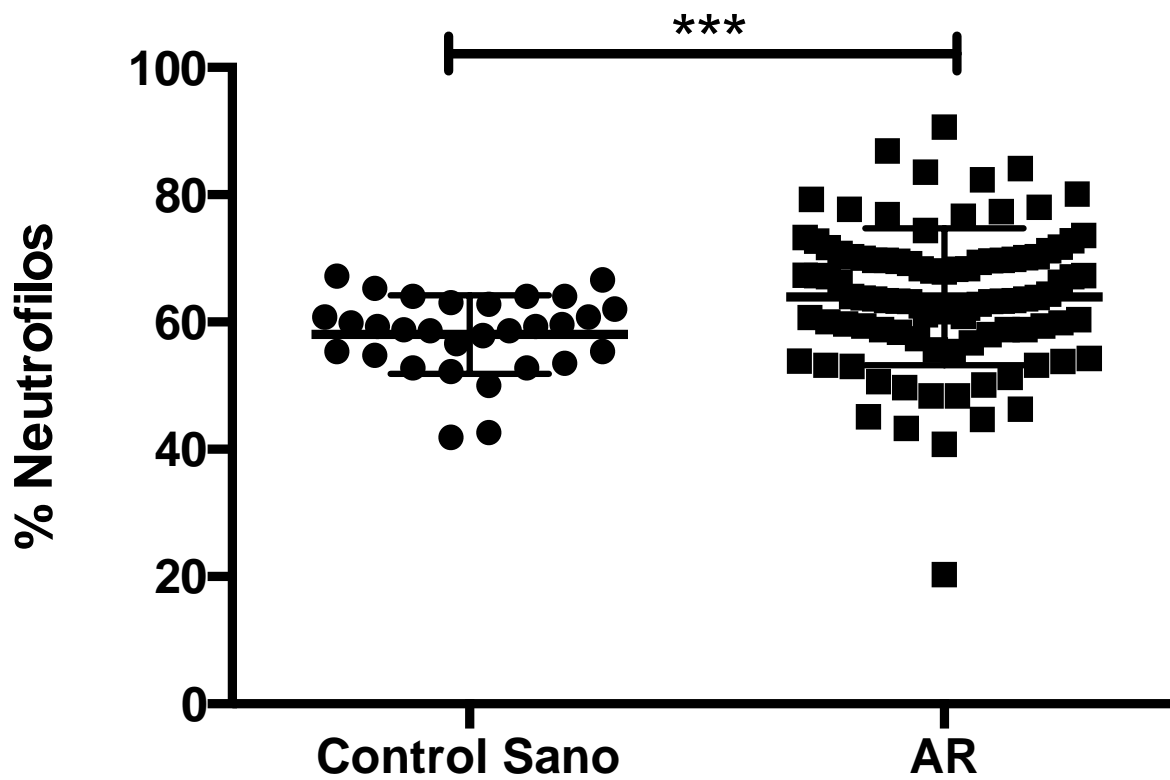
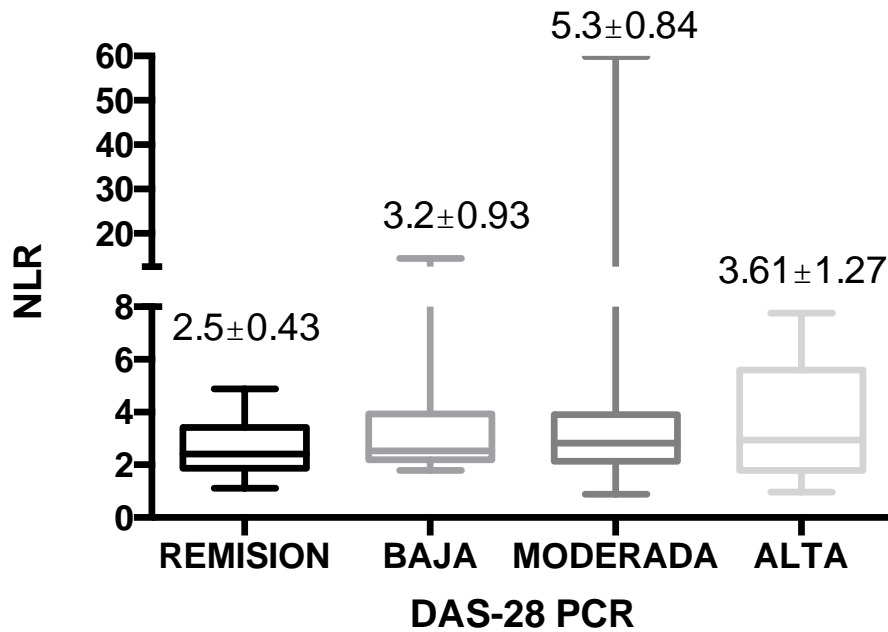


Figura 5. Frecuencia de neutrófilos en pacientes con AR se encuentra incrementada con respecto al grupo control. La frecuencia de neutrófilos de acuerdo a la cuenta clínica de la biometría hemática (BH).



**Figura 6. NLR se encuentra incrementado en los pacientes con moderada actividad de AR. Se calculó en NLR usando el número de neutrófilos y linfocitos obtenidos de la biometría hemática.**

## Frecuencia de neutrófilos IL-17A+

A partir de sangre periférica de pacientes y de individuos sanos se analizó la frecuencia de los neutrófilos que expresan IL-17A. En la figura 7, se muestra la estrategia de análisis de los resultados provenientes de la citometría de flujo que nos permitió identificar a dicha población; en primera instancia se seleccionaron los eventos simples usando FSC-A vs FSC-lin, posteriormente se identificó la población de granulocitos mediante FSC vs SSC, a partir de esa región, se identificó a los neutrófilos por su expresión de CD177. La molécula CD177 es una integrina que identifica una subpoblación de neutrófilos que corresponden al 45 % y 65 % de las células circulantes, esta molécula se expresa en los neutrófilos en maduración desde la etapa de metamielocito y la proporción de los neutrófilos CD177+ permanece estable en los individuos independientemente de la edad, genero o estado de activación [49].

Debido a que se observó una población positiva y otra negativa para CD177; se realizó una tinción doble, empleando el anticuerpo contra la molécula CD66b como otro marcador de neutrófilos, y como se muestra en la 5B, tanto las células CD177 negativas como las positivas, expresaron CD66b, por lo tanto ambas poblaciones son neutrófilos y nosotros usamos la suma de ambas poblaciones para determinar a la población de neutrófilos IL-17A+. En la figura 8A y 8B, se muestra la 3 ejemplos representativos de frecuencia de neutrófilos productores de IL-17A en pacientes con AR y en individuos sanos. Se puede observar que existen pacientes con una frecuencia baja (1.16%) pacientes con una frecuencia intermedia (3.25%) y con frecuencia alta (19.92%). Para el caso de las personas sanas, se observaron frecuencias bajas, en el ejemplo de la Figura 8A panel inferior (0.028%, 0.14% y 0.43%).

En la figura 8B, se muestra el análisis de los 106 pacientes y los 46 individuos sanos, observamos una mayor frecuencia de los neutrófilos IL-17A+ en pacientes con AR que en los individuos sanos, media  $1.2 \pm 3.18\%$  vs.  $0.07 \pm 0.1\%$  respectivamente. El mismo comportamiento se observó, con el numero absolutos de neutrófilos productores de IL-17A para paciente, media  $42.1 \pm 99.4 \times 10^3/\text{ml}$

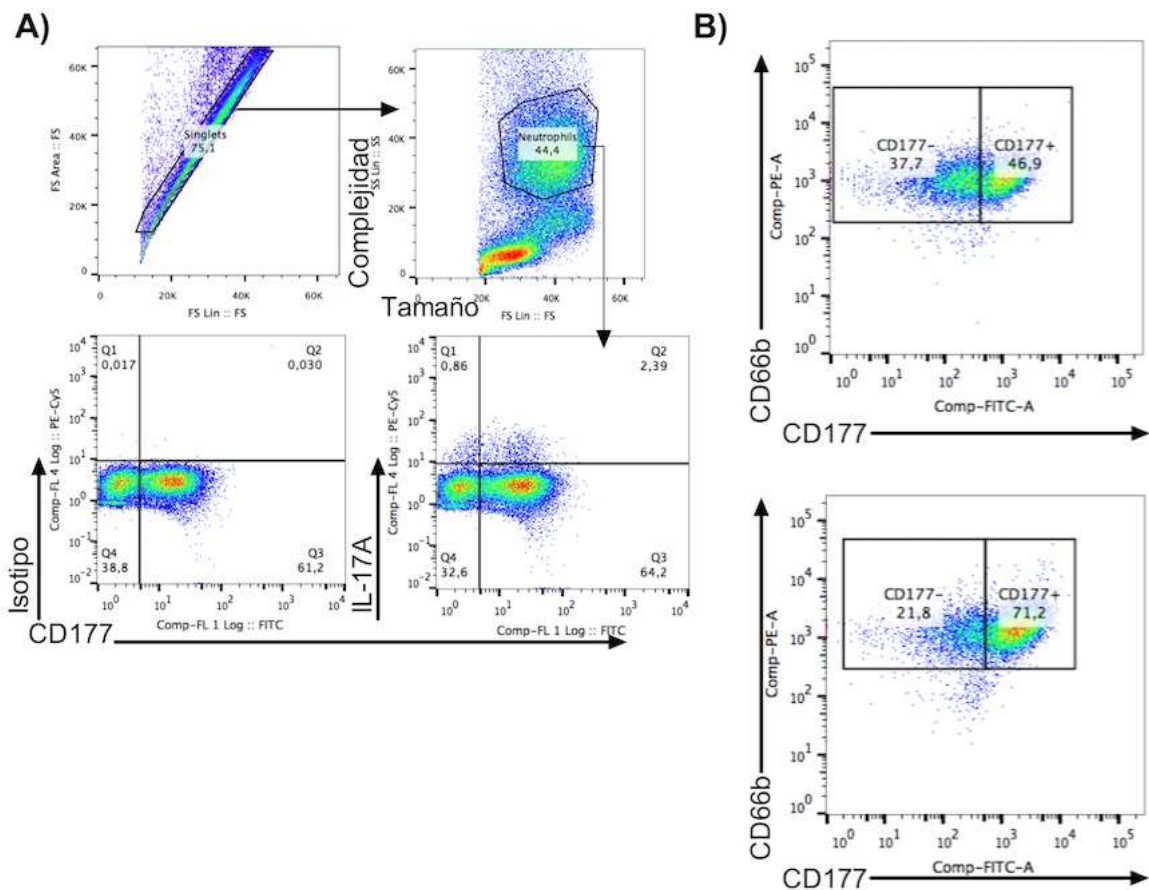


vs. controles sanos ,media  $3.42 \pm 4.0 \times 10^3/\text{ml}$ ,  $p < 0.0001$ ) (figura 8C). Con todos los resultados de pacientes y controles, se definió un valor de corte, considerando 3 veces la desviación estándar, para el caso de la frecuencia fue de 0.45% y  $5 \times 10^3/\text{ml}$  para el caso del número absoluto; esos valores se indican como una línea punteada, en las figuras 8B y 8C.

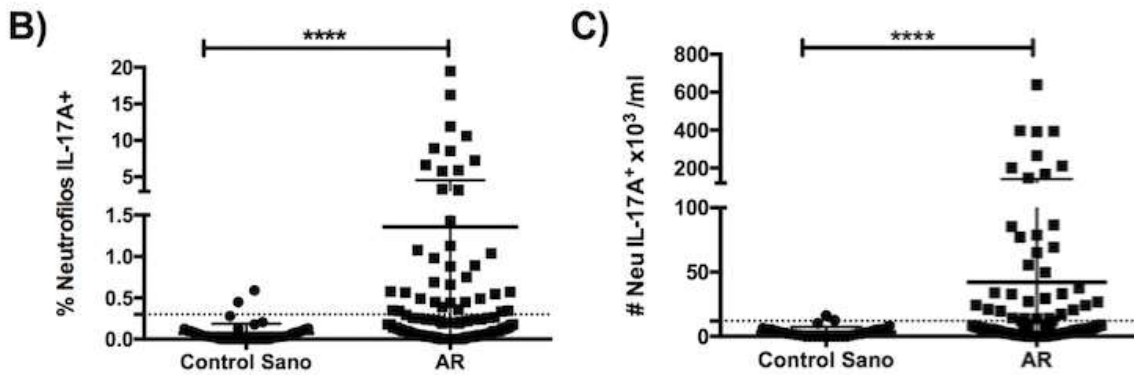
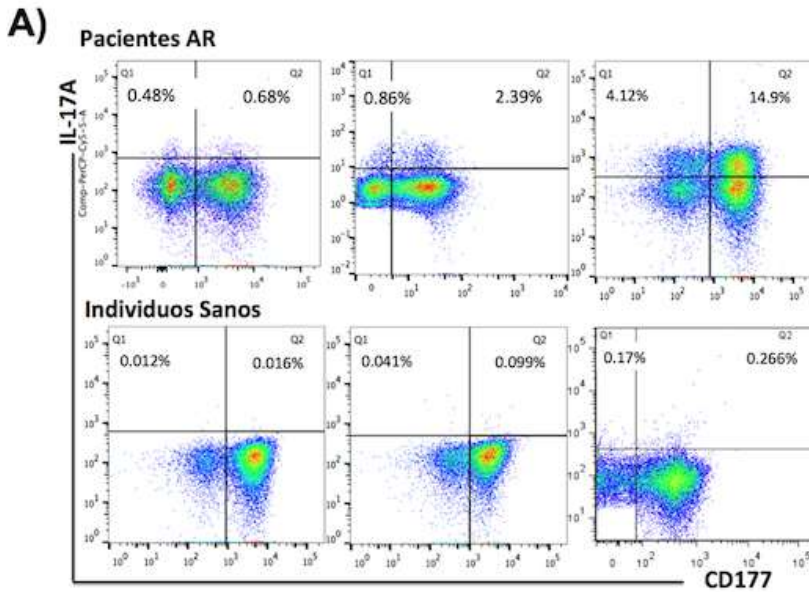
Es importante mencionar que 105 de los pacientes estaban recibiendo medicamentos sintéticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) (tabla 4) y 1 paciente se encontraba sin medicación al momento de la muestra, sin embargo no observamos una correlación entre el medicamento recibido y la frecuencia de los neutrófilos IL-17A+.

El análisis de la frecuencia de neutrófilos productores de IL-17A con respecto a la actividad clínica, mostró que independientemente del estadio de actividad hay un incremento en la frecuencia de neutrófilos IL-17A comparado con el grupo de individuos sanos (figura 9A), resultado que nos indica que los mecanismos moleculares y celulares están activos incluso cuando los pacientes no presentan una inflamación clínica (remisión).

Cuando analizamos el tiempo de evolución de la enfermedad y la frecuencia de neutrófilos IL-17A+, observamos que los pacientes con reciente diagnóstico (media de  $3.5 \pm 4.24$  años) presentan una elevada frecuencia de neutrófilos IL-17A+ (figura 9B) en cambio los pacientes con una mayor tiempo de evolución de la enfermedad (media de  $8.2 \pm 8.1$  años), son los que tienen una menor frecuencia de esa población; lo que nos pone de manifiesto la importancia de estas células en el inicio de la enfermedad.



**Figura 7. Estrategia de análisis.** A) Los neutrófilos fueron identificados a partir de la selección de eventos simples (dot plot superior izquierdo) de acuerdo a tamaño (fsc) y complejidad (ssc) se seleccionó la región de granulocitos y con la expresión de CD177 se determinó la población de neutrófilos CD177. Se usó un control de isotipo para identificar a las células positivas a IL-17A. B) Las células fueron teñidas con anti-CD66b-PE y anti-CD177-FITC para corroborar que las células CD177- fueran neutrófilos podemos observar que éstas también expresan este marcador de neutrófilos CD66b.



**Figura 8. La frecuencia de neutrófilos IL-17A se encuentra incrementada en pacientes con AR.** A) Ejemplo representativo la citometría de flujo de 3 pacientes y 3 controles. B) Frecuencia de neutrófilos IL-17A+ en pacientes e individuos sanos. C) Números absolutos de neutrófilos productores de IL-17A por ml de sangre fueron calculados utilizando la formula:

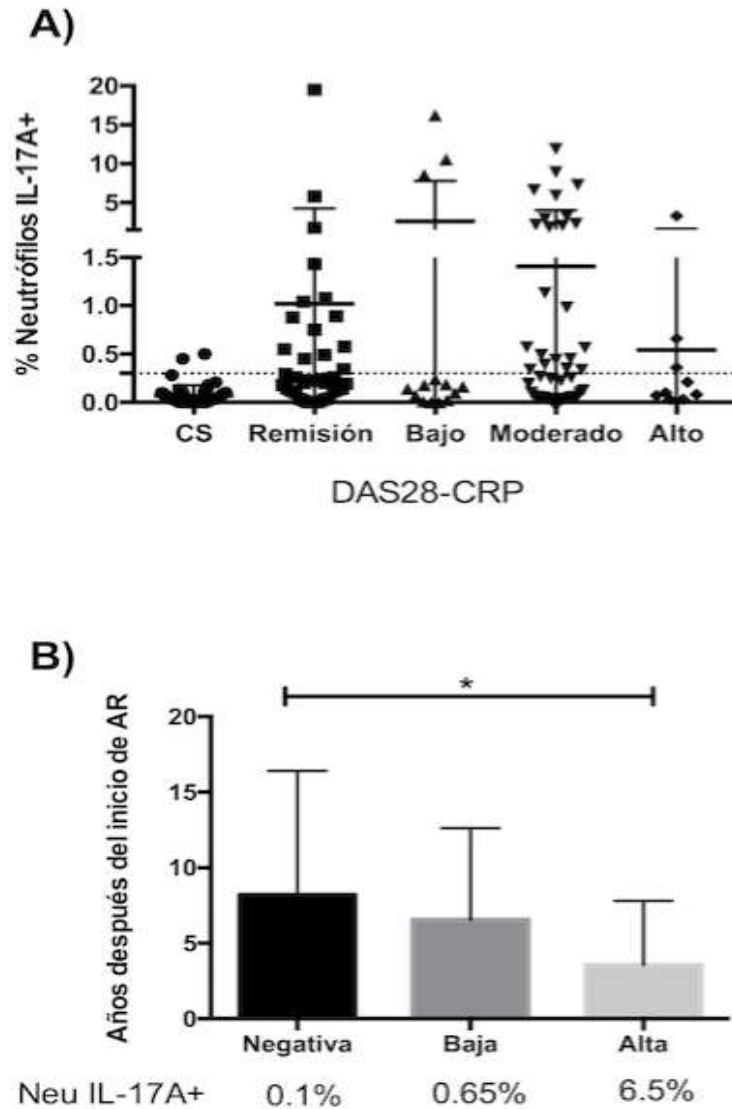
$$\frac{\text{Leucocitos} \times \% \text{ Neutrófilos en BH} \times \% \text{ Neutrófilos IL-17A+ (Citometría)} \times 1000}{100 \quad 100}$$

Se utilizó la prueba U de Mann–Whitney  $p < 0.0001$ .

**Tabla 4. Esquema de medicamento recibido por los pacientes con AR**

<b>DAMRD sintético</b>	<b>Porcentaje de pacientes recibiendo este medicamento %(n)</b>	<b>Prednisona</b>
MTX	27.1% (28)	2.9% (3)
LEF	2.9% (3)	
HCQ	3.8% (4)	
SSZ	7.6% (8)	3.8%(4)
MTX + SSZ	13.5% (16)	
MTX + HCQ	21.6% (23)	5.6% (6)
MTX + LEF	2.9% (3)	
HCQ + SSZ	3.8% (4)	0.9% (1)
SSZ + LEF	3.8% (4)	
MTX + HCQ + SSZ	3.8% (4)	0.9% (1)
HCQ + SSZ + LEF	2.9% (3)	
MTX + SSZ + LEF	2.8% (3)	0.9% (1)
MTX+ HCQ + LEF	1.94% (2)	0.9% (1)

MTX= Metotrexato; LEF=Leflunomida; HCQ=Hidroxicloroquina; SSZ=Sulfasalazina  
 Todos los pacientes estaban recibiendo dosis baja de prednisona  $\leq 10\text{mg/día}$ .



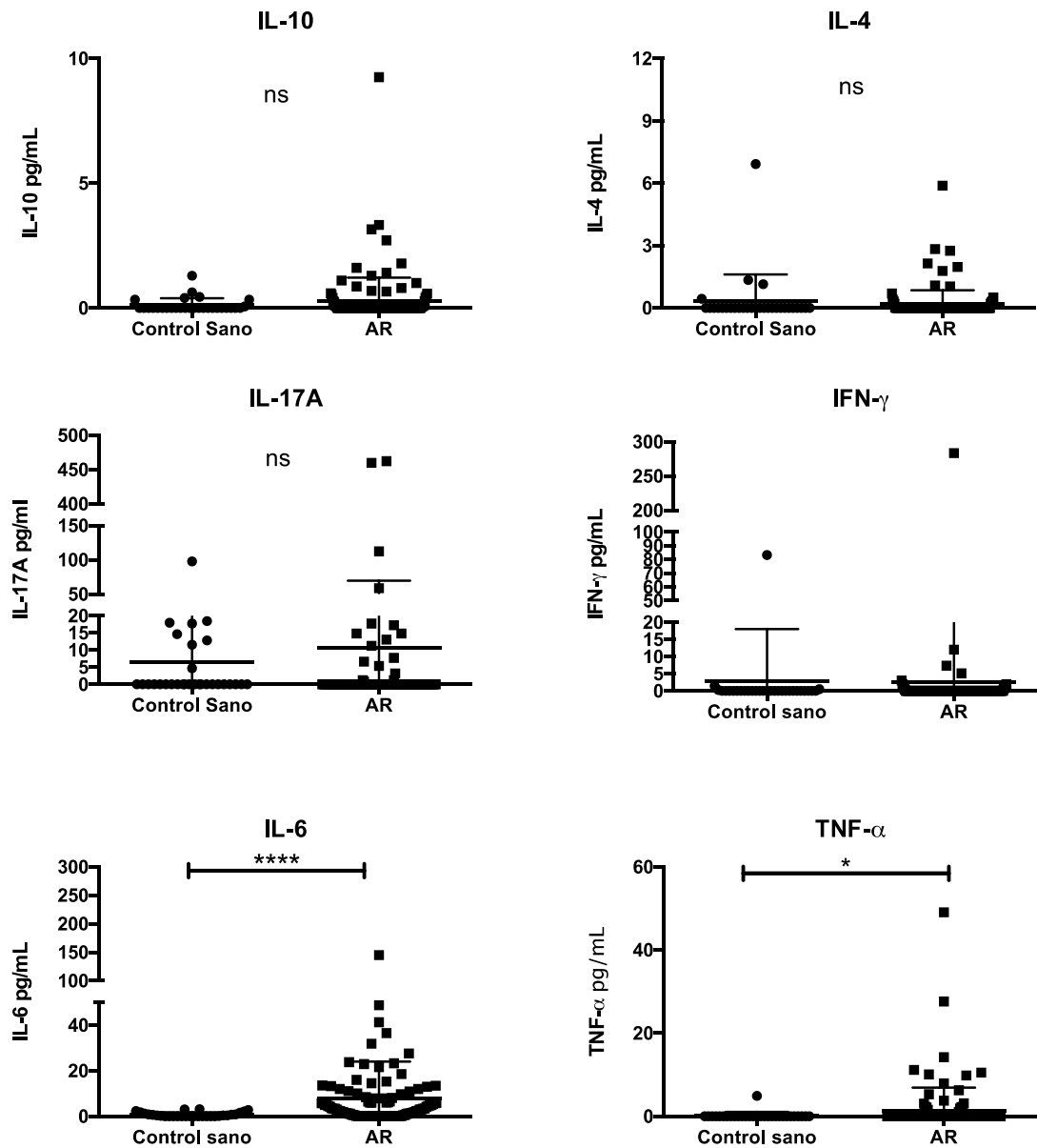
**Figura 9. La frecuencia de neutrófilos IL-17A+ es independiente al estado de actividad de la enfermedad pero no al tiempo de evolución de la AR.** Frecuencia de neutrófilos productores de IL-17A subdivididos de acuerdo al DAS28/PCR en remisión, bajo, moderado y alto. D) tiempo de evaluación de los pacientes subdivididos de acuerdo a la frecuencia de neutrófilos se uso la prueba one-way ANOVA  $p=0.034$ . las barras indican SD.

## **Citocinas séricas**

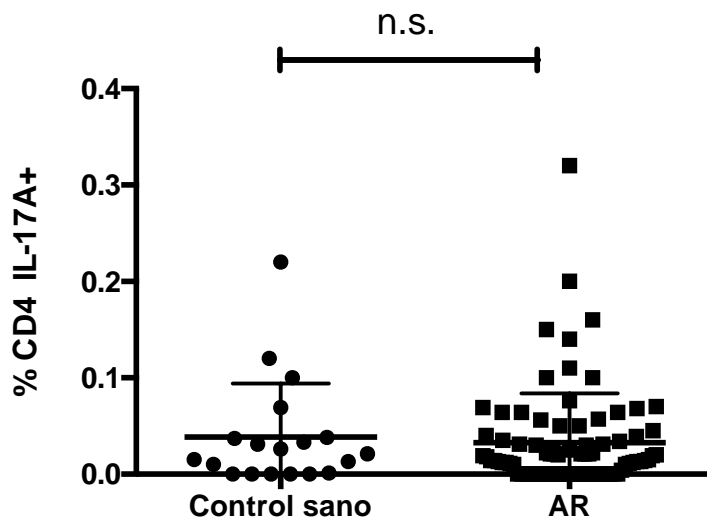
Se midieron los niveles de citocina, en el suero de pacientes e individuos sanos, usando un kit de detección basado en perlas para citometría de flujo. Como se muestra en la figura 10, no se observó diferencia significativa entre ambos grupos, en los niveles de IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-17A. En cambio las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  se detectaron incrementadas con respecto a los individuos sanos (Figura 10), de importancia señalar, que ambas citocinas han sido descritas como moléculas importantes en la inmunopatología de AR. De manera interesante los niveles séricos de IL-17A, tampoco mostraron diferencia entre pacientes e individuos sanos, inclusive, los pacientes con mayor frecuencia de neutrófilos IL-17A+ no presentan niveles elevados de IL-17A, lo cual nos sugiere que la IL-17A que esta siendo liberada, podría estar siendo utilizada por otras células o por el mismo neutrófilo para promover algunos de los efectos inflamatorios característicos en la AR. Otra posibilidad es que se requiera un estímulo adicional que promueva la liberación de IL-17A dado, que la observamos de manera intracelular en los neutrófilos de sangre periférica.

## **Frecuencia de linfocitos Th17**

Una de las primeras fuentes de IL-17A que fue descrita fueron los linfocitos Th17, cuando, analizamos la presencia de estas células en sangre periférica de los pacientes con AR; no observamos un incremento en la población de linfocitos Th17 con respecto a los individuos sanos (figura 11), por lo que podemos considerar que los Th17, no son la fuente más importante de dicha citocina, lo que nos sugiere, que los neutrófilos podrían ser la mayor fuente de IL-17A durante el proceso inflamatorio de la AR.



**Figura 10. IL-6 y TNF-α se encuentran incrementados en el suero de los pacientes, no así IL-4, IL-10, IFN-γ e IL-17A.** Al analizar los niveles séricos de las citocinas observamos que solo IL-6 y TNF-α se encuentran incrementada en los pacientes con AR



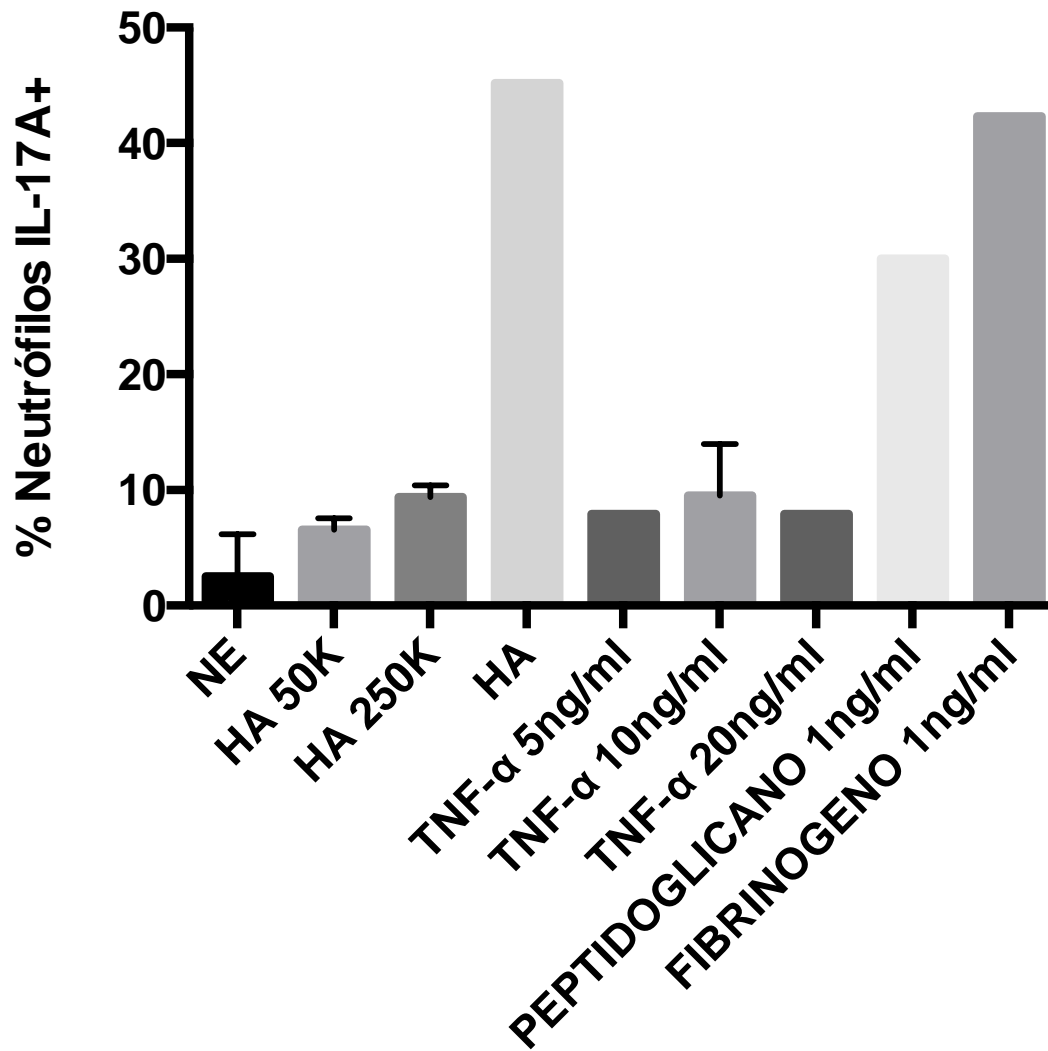
**Figura 11. Frecuencia de linfocitos Th17.** Mediante citometría de flujo se determinó *ex vivo* la frecuencia de los linfocitos Th17 no observamos diferencias en éstas células en los pacientes y los individuos sanos.



## Estimulación de neutrófilos con DAMPS

Neutrófilos provenientes de donadores sanos fueron estimulados con diferentes DAMPS como son: ácido hialurónico de bajo peso molecular (50K y 250K), ácido hialurónico completo (HA), fibrinógeno, así como con la citocina TNF- $\alpha$  y el PAMP peptidoglicano. Después de 3 horas de cultivo, se realizó la tinción intracelular para la detección de IL-17A. En la Figura 12, podemos observar que el ácido hialurónico de alto peso molecular HA induce un claro incremento en la frecuencia de neutrófilos IL-17A<sup>+</sup> (2% en la población no estimulada vs 45.2% en la estimulada con HA), mientras que los HA de bajo peso molecular no inducen incremento en la producción de IL-17A.

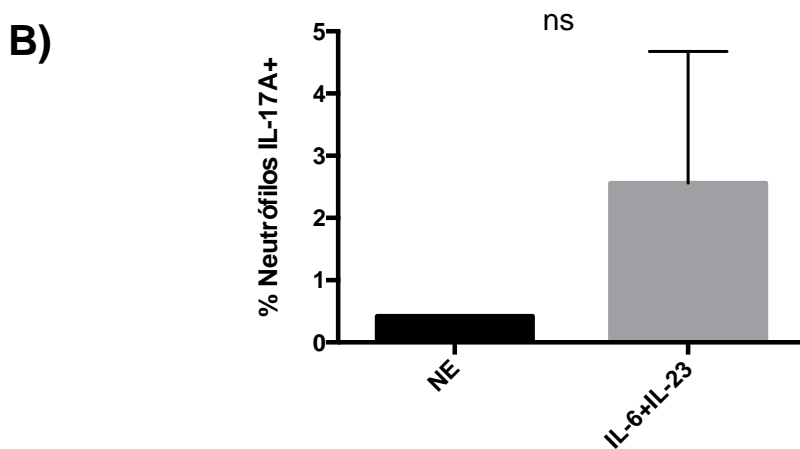
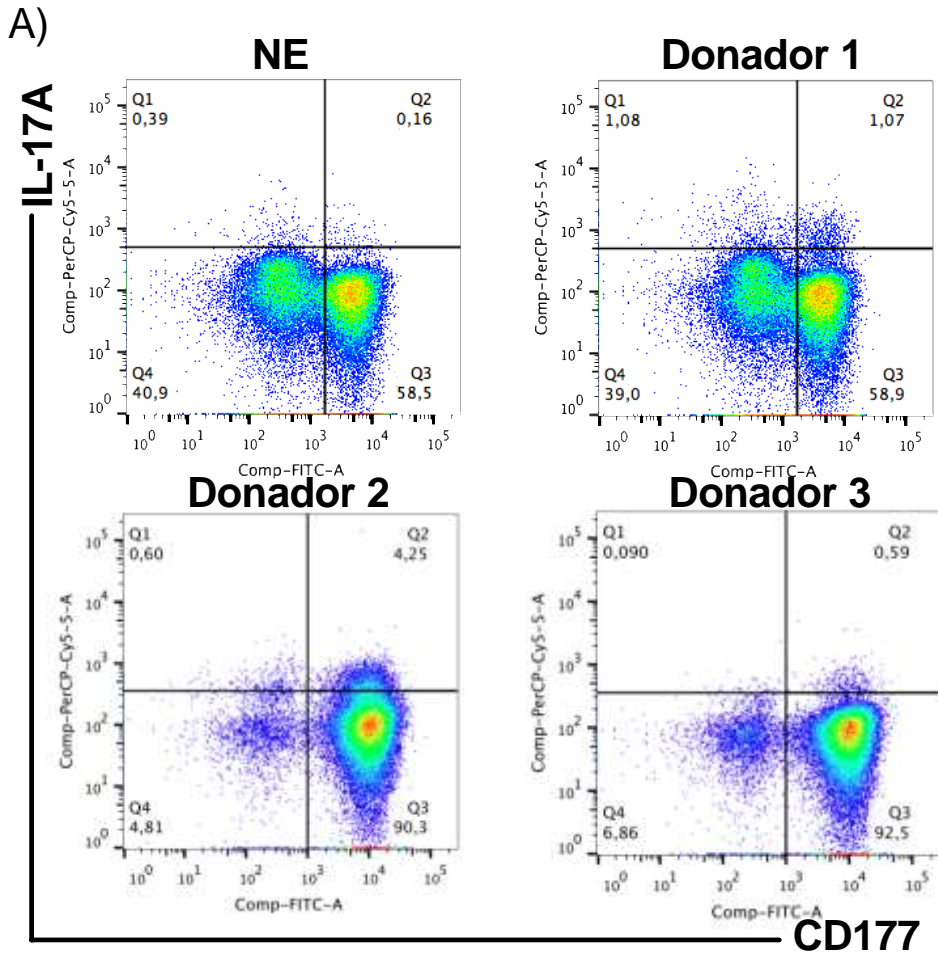
Para el caso de TNF- $\alpha$ , no observamos ningún efecto sobre el incremento en la población de los neutrófilos productores de IL-17A, a ninguna de las concentraciones (5,10,20 ng/ml) empleadas para estimular; mientras que cuando se estimuló con peptidoglicano y fibrinógenos pudimos observar un incremento en la población de neutrófilos IL-17A<sup>+</sup> del 30% y 42.3% respectivamente.



**Figura 12. Estímulos inductores de IL-17A.** Los neutrófilos fueron estimulados con ácido hialurónico (HA), HA-50K y HA250K 100  $\mu$ g/mL, TNF- $\alpha$  5, 10 y 20 ng/mL y peptidoglicano y fibrinógeno 1ng/mL.

## **Estimulación de neutrófilos con IL-6 e IL-23**

IL-6 e IL-23 son dos de las citocinas importantes para la diferenciación de las células T naive a células productoras de IL-17A, tomando esto en cuenta nosotros estimulamos neutrófilos provenientes de individuos sanos con éstas citocinas durante 3 horas, al termino del cultivo, mediante tinción intracelular se determino la presencia de IL-17A. En la Figura 13, observamos que no existe diferencia estadística significativa entre la frecuencia de neutrófilos IL-17A+ cultivados con esas citocinas con los cultivados en ausencia de estímulo (media de  $2.56 \pm 2.1$  vs  $0.42 \pm 0.1$ ). Consideramos importante analizar neutrófilos provenientes de pacientes con AR y realizar los mismos ensayos, así como determinar la presencia de la citocina en el sobrenadante de lo cultivos, para tener resultados concluyentes.



**Figura 13.** La estimulación de con las citocinas IL-6 e IL-23 no incrementa la producción de IL-17A en neutrófilos provenientes de individuos sanos. Los neutrófilos provenientes de 3 distintos donares fueron estimulados con las citocinas IL-6 20 $\mu$ g/mL e IL-23 2 $\mu$ g/mL y teñidos intracelularmente para la detección de IL-17A, se muestra el dot plot no estimulado (NE) del donador 1.

## Discusión

En el presente trabajo, estudiamos una cohorte de pacientes con diagnóstico de AR y demostramos que en sangre periférica de esos pacientes, se encuentra incrementada la población de neutrófilos que producen IL-17A en comparación del grupo control de individuos sanos. Ese incremento es independiente al estadio clínico de la enfermedad, inclusive se observó en aquellos pacientes que se definen en estado de remisión; por lo tanto es probable que la alta frecuencia de estas células contribuye a la incapacidad que tienen los pacientes de alcanzar un estado de ausencia de síntomas. Consideramos que es importante el hallazgo que señala la asociación de alta frecuencia de neutrófilos productores de IL-17A con el tiempo del diagnóstico de la enfermedad, aquellos pacientes de más reciente diagnóstico son los que presentaron una alta frecuencia de la mencionada población de neutrófilos; lo que sugiere que serían más importantes en la parte temprana de la inmunopatología de la enfermedad, es importante mencionar que independientemente el tiempo de evolución de los pacientes todos estaban recibiendo fármacos sintéticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) como metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina y el 15.9% de los pacientes además de al menos un DMARD estaban recibiendo prednisona, no observamos diferencias en la frecuencia de neutrófilos IL-17A+ y el esquema de medicamentos recibidos por los pacientes.

Se ha sugerido el papel de los neutrófilos productores de IL-17 en diversas enfermedades que cursan con procesos inflamatorios; en ese sentido, se han encontrado abundantemente a estas células en las articulaciones facetarias de pacientes con espondilitis anquilosante avanzada [44], también se han observado elevados en pacientes con fibrosis quística, en particular en aquellos que presentan ausencia de fenilalanina 508. Durante las exacerbaciones pulmonares fue cuando se observó un elevado porcentaje en esputo y sangre periférica de estos pacientes. Y dando que los individuos presentaban infecciones con *P. aeruginosa* y algunos con *S. aureus* o *Aspergillus fumigatus*, se pudo comprobar que después de haber recibido el tratamiento con antibióticos, ya no se detectaron neutrófilos IL-17 ni en esputo ni en sangre periférica; lo que sugiere que la

activación vía receptores tipo Toll o lectinas tipo C podrían estar participando en la producción de IL-17A en los neutrófilos [37]. En ese sentido, especulamos que los DAMPs liberados durante la AR, estarían siendo reconocidos por los TLR y así inducir la producción de IL-17 por los neutrófilos de los pacientes con AR. Nosotros observamos que al estimular con agonistas de TLR4 y 2 se induce la producción de IL-17A en los neutrófilos de individuos sanos, lo que apoya nuestra especulación, sin embargo será importante analizar si los neutrófilos provenientes de los pacientes con AR presentan el mismo comportamiento cuando son estimulados con los DAMPs y esos estímulos también conducen a la liberación de la IL-17A por parte de los neutrófilos.

El cáncer gástrico es otra patología donde números elevados de neutrófilos en sangre periférica se asocia con mal pronóstico, además son los neutrófilos productores de IL-17, la población de neutrófilos mas abundante en el margen invasivo de los tumores donde promueven la liberación de quimiocinas por parte de las células cancerosas gástricas y también liberan metaloproteína 9, que podría estar participando en promover angiogénesis, y la progresión del cáncer [43]. En sangre periférica de pacientes con asma especialmente en aquellos pacientes con asma alérgica a hongos, también han sido reportada elevada frecuencia de neutrófilos productores de IL-17A, y recientemente se publicó que los neutrófilos de pacientes con asma producen mayores cantidades de IL-17 que los neutrófilos de individuos sanos cuando se estimulan con IL-6, IL-23 e IL-21. Nosotros observamos niveles elevados de IL-6 en el suero de los pacientes con AR, lo que nos sugiere que esa citocina, podría estar promoviendo la producción de IL-17 por los neutrófilos [43, 46, 47, 50]. Sin embargo cuando estimulamos neutrófilos provenientes de individuos sanos con IL-6 e IL-23 observamos solo un ligero incremento en la población de neutrófilos IL-17A+ que no fue estadísticamente significativo al compararlos con los no estimulados, pero resulta de vital importancia evaluar si estas citocinas son importantes para la inducción de la producción de IL-17A en neutrófilos de pacientes con AR, debido a que ha reportado que los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con AR presenta un fenotipo de activación, caracterizado por la disminución de apoptosis a través

del incremento de Mcl-1 y activación de los factores de transcripción Nfk.b y FoxO3a [13, 50, 51]. En cambio, los neutrófilos de individuos sanos son un tanto inactivos, por lo que requieren de un pre-estimulo (primming) para aumentar la expresión de moléculas de adhesión que les facilita la migración de sangre periférica hacia los tejidos inflamados, por lo tanto resulta de vital importancia, analizar, si el pre-estimulo con los DAMPs, condiciona a los neutrófilos de individuos sanos a responder a IL6-, IL-21 e IL-23, como se demostró para los neutrófilos provenientes de pacientes con asma. Además sería importante identificar si la población de neutrófilos IL-17A+ que observamos pertenece a los neutrófilos que realizaron transmigración endotelial reversa (rTEM) es decir que regresan de los sitios de inflamación a la circulación sanguínea [52]; Se ha observado que pacientes con pancreatitis aguda que presentaron síndrome de dificultad respiratoria tienen una mayor frecuencia de los neutrófilos rTEM y éstos correlacionan con una mayor severidad de la dificultad respiratoria [53].

Por otro lado, consideramos importante realizar un estudio prospectivo para determinar si el incremento en esta población tiene algún valor predictivo de recaídas o si tuvieran alguna relación con las comorbilidades, en particular con la erosión ósea. Además el hecho de que los neutrófilos IL-17+ estén mas elevados en pacientes con reciente diagnostico menos de 3.5 años mientras que los pacientes con mas de 8 años tienen frecuencias mas bajas nos sugiere que tienen un papel importante en el inicio de la AR, por lo que habría que ampliar el numero de este tipo de paciente a través de un estudio multicentrico. Otro aspecto que deberá analizarse, será el impacto del tratamiento sobre dicha población de neutrófilos, a pesar que en el presente trabajo no se observó ninguna correlación con el tipo de tratamiento que los pacientes estaban recibiendo al momento del análisis.

En conclusión nuestro trabajo sugiere que los neutrófilos de sangre periférica productores de IL-17A participan en la respuesta inmune innata que contribuye a sostener la inflamación articular observada en los pacientes con AR.

## Conclusiones

- La frecuencia de neutrófilos productores de IL-17A en sangre periférica se encuentra incrementada en los pacientes con AR con respecto a los individuos sanos.
- El incremento en sangre periférica de la frecuencia de neutrófilos productores de IL-17A es independiente del estadio de actividad de la enfermedad.
- La estimulación a través de TLR-2 y TLR4 por fibrinógeno y peptidoglicano inducen la producción de IL-17A en neutrófilos de donadores sanos.
- La estimulación de las citocinas IL-6 e IL-23 no induce la producción de IL-17A en neutrófilos de individuos sanos.



## Perspectivas

1. Evaluar prospectivamente si el incremento de la frecuencia de neutrófilos IL-17A impacta en el cambio de estado de actividad de la enfermedad.
2. Identificar si la población de neutrófilos productora de IL-17A corresponde a los neutrófilos que realizaron trans migración reversa.
3. Evaluar si las citocinas IL-6, IL-23 e IL-21 tienen un papel en la producción de IL-17A en neutrófilos provenientes de pacientes.
4. Analizar si los DAMPs y PAMPs utilizados en este trabajo inducen la producción de IL-17A en neutrófilos provenientes de pacientes con AR.

## Anexo

AR	Artritis reumatoide
ACR	Colegio americano de reumatología
Anti-CCP	Anticuerpos anti péptido cíclico citrulinado
APC	Célula presentadora de antígeno
BFA	Brefeldina
BH	Biometría hemática
CDAI	Índice clínico de actividad de la enfermedad
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
DAS28	Índice de actividad de la enfermedad
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EA	Espondilitis anquilosante
EULAR	Liga europea contra el reumatismo
FC	Fracción cristalizable
FR	Factor reumatoide
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos
HA	Ácido hialurónico
HLA	Antígeno leucocitario humano
HWB	Sangre total heparinizada
IBD	Enfermedad inflamatoria de Bowel
IFN	Interferón
IL	Interleucina
LPS	Lipopolisacarido
M-CSF	Factor estimulador de colonia de monocitos
MMP	Metaloproteinasa de matriz
MPO	Mieloperoxidasa
MtDNA	Ácido desoxiribonucleico mitocondrial
NETS	Trampas extracelulares de neutrófilos
NLR	Relación linfocitos neutrófilos
OA	Osteoartritis
PAD	Peptidil arginasa deaminasa
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PBC	Cirrosis biliar primaria
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Proteína C reactiva
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrón
RANK	Receptor activador del factor nuclear kB
RANKL	Ligando del Receptor activador del factor nuclear kB

ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDAI	Índice simplificado de actividad de la enfermedad
SLE	Lupus eritematoso sistémico
T1D	Diabetes tipo 1
TLR	Receptor tipo toll
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
US	ultrasonido
VSG	Velocidad de sedimentación globular

## Bibliografía

1. Grassi, W., et al., *The clinical features of rheumatoid arthritis*. Eur J Radiol, 1998. **27 Suppl 1**: p. S18-24.
2. Khurana, R. and S.M. Berney, *Clinical aspects of rheumatoid arthritis*. Pathophysiology, 2005. **12**(3): p. 153-65.
3. Pelaez-Ballestas, I., et al., *Epidemiology of the rheumatic diseases in Mexico. A study of 5 regions based on the COPCORD methodology*. J Rheumatol Suppl, 2011. **86**: p. 3-8.
4. McInnes, I.B. and G. Schett, *Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 429-42.
5. Veldhoen, M., *Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity*. Nature Immunology, 2017. **18**(6): p. 612-621.
6. Kirkham, B.W., A. Kavanaugh, and K. Reich, *Interleukin-17A: a unique pathway in immune-mediated diseases: psoriasis, psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis*. Immunology, 2014. **141**(2): p. 133-42.
7. Lubberts, E., *The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2015. **11**(10): p. 562.
8. Bromley, M. and D.E. Woolley, *Histopathology of the rheumatoid lesion. Identification of cell types at sites of cartilage erosion*. Arthritis Rheum, 1984. **27**(8): p. 857-63.
9. Wright, H.L., R.J. Moots, and S.W. Edwards, *The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(10): p. 593-601.
10. Kouri, V.P., et al., *Neutrophils produce interleukin-17B in rheumatoid synovial tissue*. Rheumatology (Oxford), 2014. **53**(1): p. 39-47.
11. Tekeoglu, I., et al., *Overlooked hematological markers of disease activity in rheumatoid arthritis*. Int J Rheum Dis, 2015.
12. Bell, E. and L. Bird, *Autoimmunity*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 583-583.
13. Wang, L., F.S. Wang, and M.E. Gershwin, *Human autoimmune diseases: a comprehensive update*. J Intern Med, 2015. **278**(4): p. 369-95.
14. Theofilopoulos, A.N., D.H. Kono, and R. Baccala, *The multiple pathways to autoimmunity*. Nat Immunol, 2017. **18**(7): p. 716-724.
15. Cafaro, G., et al., *The onset site of rheumatoid arthritis: the joints or the lung?* Reumatismo, 2016. **68**(4): p. 167-175.
16. Cojocar, M., et al., *Extra-articular Manifestations in Rheumatoid Arthritis*. Maedica (Buchar), 2010. **5**(4): p. 286-91.
17. Araki, Y. and T. Mimura, *Matrix Metalloproteinase Gene Activation Resulting from Disordered Epigenetic Mechanisms in Rheumatoid Arthritis*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(5).
18. Derksen, V., T.W.J. Huizinga, and D. van der Woude, *The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis*. Semin Immunopathol, 2017.
19. Fan, L., et al., *Citrullinated fibronectin inhibits apoptosis and promotes the secretion of pro-inflammatory cytokines in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2012. **14**(6): p. R266.

20. Kilsgard, O., et al., *Peptidylarginine deiminases present in the airways during tobacco smoking and inflammation can citrullinate the host defense peptide LL-37, resulting in altered activities.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2012. **46**(2): p. 240-8.
21. Alpizar-Rodriguez, D. and A. Finckh, *Environmental factors and hormones in the development of rheumatoid arthritis.* Semin Immunopathol, 2017.
22. Baka, Z., E. Buzas, and G. Nagy, *Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together.* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(4): p. 238.
23. Rommel, C., M. Camps, and H. Ji, *PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond?* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(3): p. 191-201.
24. Firestein, G.S. and I.B. McInnes, *Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis.* Immunity, 2017. **46**(2): p. 183-196.
25. Catrina, A.I., et al., *Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis.* Nat Rev Rheumatol, 2017. **13**(2): p. 79-86.
26. Kaplan, M.J., *Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases.* Arthritis Res Ther, 2013. **15**(5): p. 219.
27. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The multifaceted functions of neutrophils.* Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 181-218.
28. Khandpur, R., et al., *NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis.* Sci Transl Med, 2013. **5**(178): p. 178ra40.
29. Gupta, S. and M.J. Kaplan, *The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases.* Nat Rev Nephrol, 2016. **12**(7): p. 402-13.
30. Buckley, C.D., et al., *Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration.* J Leukoc Biol, 2006. **79**(2): p. 303-11.
31. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria.* Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
32. Garcia-Romo, G.S., et al., *Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus.* Sci Transl Med, 2011. **3**(73): p. 73ra20.
33. Caielli, S., et al., *Oxidized mitochondrial nucleoids released by neutrophils drive type I interferon production in human lupus.* J Exp Med, 2016. **213**(5): p. 697-713.
34. Lood, C., et al., *Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease.* Nat Med, 2016. **22**(2): p. 146-53.
35. Tecchio, C. and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity.* Semin Immunol, 2016. **28**(2): p. 119-28.
36. Ramirez-Velazquez, C., et al., *IL-17-producing peripheral blood CD177+ neutrophils increase in allergic asthmatic subjects.* Allergy Asthma Clin Immunol, 2013. **9**(1): p. 23.
37. Taylor, P.R., et al., *Neutrophils from F508del cystic fibrosis patients produce IL-17A and express IL-23 - dependent IL-17RC.* Clin Immunol, 2016. **170**: p. 53-60.
38. Karthikeyan, R.S., et al., *Interleukin 17 expression in peripheral blood neutrophils from fungal keratitis patients and healthy cohorts in southern India.* J Infect Dis, 2015. **211**(1): p. 130-4.

39. Lin, A.M., et al., *Mast Cells and Neutrophils Release IL-17 through Extracellular Trap Formation in Psoriasis*. Journal of Immunology, 2011. **187**(1): p. 490-500.
40. Hueber, A.J., et al., *Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3336-40.
41. Li, T.J., et al., *Interleukin-17-Producing Neutrophils Link Inflammatory Stimuli to Disease Progression by Promoting Angiogenesis in Gastric Cancer*. Clin Cancer Res, 2017. **23**(6): p. 1575-1585.
42. Li, L., et al., *IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 331-42.
43. Bi, Y., et al., *IL-17A produced by neutrophils protects against pneumonic plague through orchestrating IFN-gamma-activated macrophage programming*. J Immunol, 2014. **192**(2): p. 704-13.
44. Appel H, et al., *Analysis of IL-17+ cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response*. Arthritis Research & Therapy, 2011. **13**(3).
45. Tan, Z., et al., *RORgammat+IL-17+ neutrophils play a critical role in hepatic ischemia-reperfusion injury*. J Mol Cell Biol, 2013. **5**(2): p. 143-6.
46. Taylor, P.R., et al., *Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, RORgammat and dectin-2*. Nat Immunol, 2014. **15**(2): p. 143-51.
47. Halwani, R., et al., *Th-17 regulatory cytokines IL-21, IL-23, and IL-6 enhance neutrophil production of IL-17 cytokines during asthma*. J Asthma, 2017: p. 1-12.
48. Chou, R.C., et al., *Lipid-cytokine-chemokine cascade drives neutrophil recruitment in a murine model of inflammatory arthritis*. Immunity, 2010. **33**(2): p. 266-78.
49. Bai, M., et al., *CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation*. Blood, 2017. **130**(19): p. 2092-2100.
50. Turrel-Davin, F., et al., *FoxO3a involved in neutrophil and T cell survival is overexpressed in rheumatoid blood and synovial tissue*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(4): p. 755-60.
51. Weinmann, P., et al., *Delayed neutrophil apoptosis in very early rheumatoid arthritis patients is abrogated by methotrexate therapy*. Clin Exp Rheumatol, 2007. **25**(6): p. 885-7.
52. de Oliveira, S., E.E. Rosowski, and A. Huttenlocher, *Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse*. Nat Rev Immunol, 2016. **16**(6): p. 378-91.
53. Wu, D., et al., *Reverse-migrated neutrophils regulated by JAM-C are involved in acute pancreatitis-associated lung injury*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 20545.