

## casos clínicos

## Los niveles séricos de Interleucina 22 e Interleucina 6 disminuyen luego del tratamiento en pacientes con artritis reumatoidea

María Clara Álvarez Ferreira<sup>1</sup>, Vanina Alejandra Alamino<sup>1</sup>, Cristina del Valle Acosta<sup>1</sup>, Laura Beatriz Onetti<sup>2</sup>, Eduardo Daniel Musssano<sup>2</sup>, Isaac Ignacio Cadile<sup>2</sup>, Estefanía Raquel Zacca<sup>1</sup>, Adriana Gruppi<sup>3</sup>, Eva Virginia Acosta Rodriguez<sup>3</sup>, Paola Virginia Ferrero<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Inmunología y Serología, Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (Argentina); <sup>2</sup>Servicio de Reumatología, Unidad Hospitalaria de Medicina Interna I, Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (Argentina); <sup>3</sup>Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (Argentina); Trabajo realizado en el Hospital Nacional de Clínicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba (Argentina) Trabajo financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva, MINCYT PID 2012-0068 (Argentina)

## RESUMEN

**Palabras clave:**

Artritis reumatoidea, Interleucina 22, Interleucina 6, líquido sinovial, inflamación, DMARDs

**Introducción:** La artritis reumatoidea se caracteriza por inflamación de la membrana sinovial debido al infiltrado de células inmunitarias que secretan citocinas relacionadas a perfil Th17 como IL-22 e IL-6. La dinámica de estas citocinas durante el tratamiento permanece incomprendida. El objetivo fue evaluar los niveles séricos y en líquido sinovial (LS) de IL-22 e IL-6, correlacionarlos con diferentes parámetros bioquímicos y clínicos y medir sus cambios post-tratamiento.

**Material y métodos:** Se estudiaron 77 pacientes con AR y 30 controles. A 30 pacientes se los evaluó nuevamente luego de 3 meses de tratamiento y a 12 se les extrajo LS. Se midió VSG, PCR, FR, anti-CCPhs, IL-22 e IL-6. Se evaluó la actividad con DAS28 y respuesta al tratamiento con criterios EULAR.

**Resultados:** IL-22 e IL-6 fueron similares entre pacientes y controles. Sus niveles disminuyeron luego del tratamiento, principalmente en pacientes respondedores. IL-22 fue menor e IL-6 mayor en LS que en sangre. IL-6 correlacionó positivamente con PCR y anti-CCPhs. Los niveles de VSG, PCR y DAS28 fueron mayores en pacientes con valores dosables de IL-6 que en no dosables.

**Conclusión:** En pacientes con valores basales dosables de IL-22 e IL-6, los niveles de estas citocinas podrían utilizarse como marcador adicional de respuesta al tratamiento.

## ABSTRACT

**Key words:**

Rheumatoid arthritis, Interleukin 22, Interleukin 6, synovial fluid, inflammation, DMARDs

**Introduction:** Rheumatoid arthritis is characterized by synovium inflammation due to the infiltration of immune cells that secrete Th17 cytokines like IL-22 and IL-6. The dynamics of these cytokines during the treatment remain unknown. The aim of this study was to evaluate the levels of IL-22 and IL-6 serum and synovial fluid (SF) in correlation with different biochemical and clinical parameters and treatment-associated changes.

**Material and methods:** Seventy-seven RA patients and 30 controls were recruited. Thirty patients were evaluated after 3 months of treatment and SF was collected of 12 patients. ESR,

CRP, RF, anti-CCP hs, IL-22 e IL-6 were measured. DAS28 was used to assess disease activity and response to treatment followed EULAR criteria.

**Results:** There were not differences in serum IL-22 and IL-6 levels between patients and controls. Cytokine levels decreased after treatment, mainly in responder patients. IL-22 was decreased and IL-6 was increased in SF compared to serum. IL-6 correlated positively with CRP and anti-CCPs. ESR, CRP and DAS28 were increased in patients with detectable IL-6 compared to those with undetectable IL-6.

**Conclusion:** In patients with detectable serum IL-22 and IL-6 levels before treatment initiation, follow-up of cytokine levels could be an useful additional tool to evaluate treatment response.

Mail de contacto:

paferrero@fcm.unc.edu.ar

## Introducción

La artritis reumatoidea (AR) es una enfermedad crónica autoinmune de causa desconocida caracterizada por inflamación persistente y simétrica de pequeñas y grandes articulaciones y la producción de autoanticuerpos como Factor Reumatoideo (FR) y anti-proteínas/péptidos citrulinados (ACPA)<sup>1</sup>. Esta patología puede tener manifestaciones extraarticulares como desórdenes cardiovasculares, pulmonares, vasculitis, nódulos reumatoideos y otras comorbilidades sistémicas como anemia y osteoporosis<sup>1-3</sup>. Afecta principalmente al grupo etario con mayor capacidad laboral o productiva dentro de la sociedad, lo que conlleva a altos costos socio-económicos<sup>1</sup>.

A nivel celular y molecular, la AR se caracteriza por la inflamación de la membrana sinovial debido al infiltrado de células inmunitarias que secretan citocinas<sup>4</sup>. Aunque los mecanismos exactos subyacentes a la patogénesis de la AR aún no se han dilucidado, las principales características patológicas conocidas están relacionadas con una secreción anormal de citocinas inflamatorias en el tejido sinovial, junto a la disregulación de las citocinas antiinflamatorias, y anormal proliferación de células sinoviales en la articulación<sup>5-6</sup>.

Se han encontrado niveles más altos de ciertas citocinas en suero y en líquido sinovial (LS) de pacientes con AR en comparación con individuos sanos, entre ellas factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )<sup>7</sup>, interleucina (IL) -1<sup>6</sup>, IL-6<sup>8</sup>, e IL-17<sup>6</sup>. Dada la relevancia que han adquirido las citocinas en la patogenia de esta enfermedad, desde 1999 los medicamentos biológicos, anticuerpos monoclonales o proteínas de fusión destinadas a bloquear la acción de distintas citocinas, se transformaron en una opción terapéutica temprana<sup>9</sup>. Desde su descripción en el año 2005<sup>10</sup>, los linfocitos (Li) T CD4<sup>+</sup> de perfil T helper (Th) 17 y las citocinas relacionadas con esta población, han sido ampliamente estudiados en la AR<sup>11-13</sup>. Esta subpoblación de células Th se induce en presencia de factor de crecimiento transformante  $\beta$ , y otras citocinas inflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-21 y la IL-23 que es requerida para expandir y estabilizar a las Th17. Los Li Th17 producen principalmente IL-17A, IL-17F e IL-22<sup>14-16</sup>.

La IL-22, miembro de la familia de la IL-10<sup>4,17</sup>, es produci-

da no sólo por los Li Th17 sino también por Li T de perfil Th1 y Th22<sup>4-5,18</sup> así como por células innatas, como las Natural Killer (NK) y las células NKT<sup>5,17</sup>. Esta citocina juega un papel clave en la defensa contra patógenos, curación de heridas, y reorganización de tejidos<sup>19</sup> y participa en los mecanismos de defensa y cicatrización de heridas asociados con el epitelio intestinal y los tejidos de la piel<sup>20</sup>. Además, controla significativamente la respuesta de los tejidos a la inflamación activando las vías proliferativas e inhibiendo las vías apoptóticas<sup>4</sup>, mediando así un importante rol en la patogénesis de enfermedades autoinmunes como AR, Psoriasis, Síndrome de Sjögren, Lupus Eritematoso Sistémico, entre otras<sup>5,17,19</sup>. La asociación de niveles séricos elevados de IL-22 con erosiones óseas en pacientes con AR en etapas tempranas de su enfermedad sugirió el potencial de esta citocina como marcador predictivo temprano en el curso de la enfermedad<sup>21</sup>.

La IL-6 es una citocina con actividad pleiotrópica producida por varios tipos de células como monocitos, macrófagos, Li T, Li B, células endoteliales y fibroblastos<sup>3,22</sup>. Juega numerosos roles dentro del sistema inmune, incluida la diferenciación y activación de Li T (como los Th17 que mencionamos anteriormente), la proliferación y diferenciación de Li B en células plasmáticas y la regulación de la respuesta de fase aguda hepática al inducir la síntesis de Proteína C Reactiva (PCR)<sup>3,23-24</sup>. Si bien la expresión transitoria de IL-6 es esencial para activar el sistema inmune, su producción desregulada y persistente puede inducir daño, y se ha demostrado que está relacionada con la patogénesis de diversas enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes, incluida la AR<sup>25</sup>. En la AR, la IL-6 estaría implicada también en la etiología de muchas de sus manifestaciones clínicas como anemia, resistencia a la insulina, fatiga, trastornos del estado de ánimo, osteoporosis y riesgo de enfermedades cardiovasculares<sup>24,26</sup>. En relación a la articulación, la IL-6 desempeña un papel integral en su fisiopatología; se expresa abundantemente en la membrana sinovial e induce inflamación y daño, degradación del cartílago, erosión y estrechamiento de las articulaciones, y progresión hacia la inflamación crónica<sup>24,27</sup>.

Las estrategias terapéuticas en la AR han mejorado dramáticamente en las últimas 3 décadas. Con la estrategia treat to target y la posibilidad de elegir entre diferentes modos de acción, se puede alcanzar el objetivo de una remi-

sión estable y prevenir la destrucción articular<sup>1,28</sup>. Para controlar la inflamación a largo plazo, se necesitan medicamentos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) sintéticos convencionales como metotrexato (MTX)<sup>28</sup>. Los DMARDs biológicos surgieron como consecuencia de la creciente comprensión de las vías inmunes e inflamatorias en la AR y se dirigen a las citocinas inflamatorias, las células B y la co-estimulación de las células T<sup>1,29-30</sup>. Hablando en particular de IL-6, Tocilizumab (TCZ) es un anticuerpo monoclonal IgG1 recombinante humanizado que se une al receptor de IL-6 (RIL-6) soluble y unido a la membrana, bloqueando su acción<sup>1,28,30</sup>. Recientemente ha sido aprobado un nuevo anti-RIL-6 denominado Sarilumab<sup>31-32</sup>. En la actualidad ningún medicamento tiene como blanco específico a IL-22, sin embargo, los DMARDs sintéticos "targeted", como los inhibidores de las janus kinasas (JAK), bloquean las cascadas de señalización de numerosas citocinas, incluidas IL-22 e IL-6<sup>1,28,33</sup>. A pesar del notable éxito de tales enfoques, una proporción importante de pacientes con AR no logran la remisión de su enfermedad<sup>33</sup>.

Este trabajo tiene como objetivo evaluar los niveles de IL-22 e IL-6 en suero y LS de pacientes con AR y el impacto que puede tener la instauración de un nuevo tratamiento sobre el nivel de estas citocinas. Además, estudiar la relación entre los valores séricos de IL-22 e IL-6 con distintos parámetros bioquímicos y clínicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes y controles

Se estudiaron 77 pacientes mayores de 18 años con diagnóstico de AR según Criterios de Clasificación de Artritis Reumatoidea del American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism 2010 (2010 ACR/EULAR)<sup>34</sup>. Se incluyeron 40 pacientes sin medicación específica para la AR (vírgenes de tratamiento o que lo hayan suspendido por más de 6 meses) y 37 pacientes sometidos a distintos tratamientos específicos. Los principales tratamientos utilizados fueron: terapia con DMARDs sintéticos convencionales: 18 pacientes (principalmente MTX); drogas inhibidoras de TNF: 16 pacientes; y Tofacitinib (Tofa): 3 pacientes. Ningún paciente recibió tratamiento con anti-RIL-6. Se excluyeron pacientes que padecían otras enfermedades autoinmunes sistémicas, endocrinopatías autoinmunes, neoplasias, patologías infecciosas agudas o crónicas, tratados con dosis de prednisona mayores a 10 mg/día o su equivalente en otro glucocorticoide de distinta potencia, y embarazadas. A todos los pacientes se les extrajo una muestra de sangre que se utilizó para realizar las determinaciones bioquímicas de rutina para el diagnóstico de la AR. Se fraccionó una alícuota de suero que se conservó a -80°C para el posterior dosaje de la IL-22 y la IL-6. En el momento de la toma de la muestra se evaluó la actividad de la enfermedad a través del Índice de Actividad de la Enfermedad en 28 articulaciones (DAS28)<sup>35</sup>.

A 12 pacientes que presentaron la articulación de la rodilla inflamada se les realizó una artrocentesis para extraer LS que se separó de la fracción celular y se conservó a -80°C.

Este procedimiento fue realizado por un médico reumatólogo, guiado por ecografía en la mayoría de los casos. A aquellos pacientes que empezaron un nuevo tratamiento se les realizó un seguimiento y nuevas determinaciones a los 3 meses post-tratamiento. La respuesta al tratamiento se midió utilizando los criterios de respuesta EULAR<sup>36</sup>. Se consideraron respondedores a los pacientes con buena y moderada respuesta. Además, se incluyeron 30 individuos controles sin AR, mayores de 18 años, teniendo en cuenta la misma distribución de sexo y criterios de exclusión de los pacientes.

El presente proyecto ha sido aprobado por el Comité de Ética de las Investigaciones en Salud del Hospital Nacional de Clínicas y el Consejo de Evaluación Ética de Investigaciones en Salud dependiente del Ministerio de Salud de la provincia de Córdoba bajo Registro Provincial de Investigación en Salud, Registro de Investigaciones no Patrocinadas, N°165/13. Todas las personas involucradas en este estudio firmaron previamente el consentimiento informado.

### Proteína "C" Reactiva, velocidad de sedimentación globular, Factor Reumatoideo, anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos de alta sensibilidad.

La PCR se determinó por inmunoturbidimetría (Dimensión RxL Max, SIEMENS, Nueva York, EE. UU.), la velocidad de sedimentación globular (VSG) por método de Westergren, el FR por técnica de látex, título de corte 1/20 (Artritest directo, Wiener Laboratorios S.A.I.C, Rosario, Argentina) y los anticuerpos anti-péptidos citrulinados cíclicos (anti-CCPhs) por ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay), VR<20 U/mL (ORGENTEC, Diagnostika GmbH, Mainz, Alemania).

### Determinación de IL-22 e IL-6

La determinación de las citocinas se realizó por ELISA sandwich. Para IL-22 se utilizó el equipo "Human IL-22 ELISA MAX Deluxe Sets" (BioLegend, 8999 Biologend Way, San Diego, CA 92121, Estados Unidos) y para IL-6 el "BD OptEIA Human IL-6 ELISA Set" (BD Biosciences, 2350 Qume Drive, San Jose, CA 95131, Estados Unidos). Se siguieron las instrucciones de los fabricantes utilizando ¼ del volumen de los distintos reactivos (placas Costar Assay Plate, Half Area, Corning Incorporated, Kennebunk ME 04043, USA). Los estándares y las muestras de suero y LS se analizaron por duplicado y se incubaron toda la noche (16-18 hs). Los puntos de la curva se realizaron de la siguiente manera, para IL-22: 2000; 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 (pg/ml); y para IL-6: 300; 150; 75; 37,5; 18,8; 9,4; 4,7 (pg/ml). Para ambas citocinas se utilizó blanco de muestra. Se realizó la lectura de las absorbancias utilizando el lector de microplacas Seac Sirio, Radim (Pomezia, Italia) y se utilizó curva sigmoidal de respuesta a la dosis en el software GraphPad Prism versión 5 para extrapolar la concentración de las citocinas. El límite de detección de IL-22 fue 16 pg/mL mientras que de IL-6 3 pg/mL.

### Análisis estadístico de los datos

Para el cálculo estadístico se utilizó el software GraphPad Prism versión 5. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## Resultados

### Características de los grupos en estudio

Las características demográficas, bioquímicas y clínicas de los grupos en estudio se detallan en la **Tabla I**. La distribución de sexos fue homogénea ( $p=0,55$ ), mientras que la media etaria fue mayor en los pacientes con AR que en los controles ( $p=0,011$ ). Como se esperaba, los valores de VSG, PCR y anti-CCPhs fueron superiores en los pacientes con AR cuando se compararon con el grupo control ( $p= 0,0016$ ,  $p=0,0003$ , y  $p<0,0001$ , respectivamente). Así mismo, un 71,4% de los pacientes presentaron valores detectables de FR, mientras que sólo un control (3,3%), con título bajo ( $p<0,0001$ ).

### Comparación de los niveles séricos de IL-22 e IL-6 entre pacientes con AR y controles

No todos los pacientes con AR y controles presentaron valores dosables de las citocinas en suero. De los 77 pacientes con AR, 46 (59,7%) y 35 (45,4%) presentaron niveles dosables de IL-22 e IL-6, respectivamente. Cabe aclarar que algunos pacientes presentaron valores dosables de ambas citocinas mientras que otros sólo de IL-22 o de IL-6. De los 30 controles, 10 (33,3%) presentaron valores dosables de IL-22 y 7 (23,3%) de IL-6. Cuando se compararon los niveles de ambas citocinas entre los grupos de pacientes y controles que tuvieron valores dosables, no se hallaron diferencias significativas para IL-22 ( $p=0,60$ ) (**Figura 1a**) y tampoco para IL-6 ( $p=0,13$ ) (**Figura 1b**).

### Comparación de los niveles de IL-22 e IL-6 al inicio y a los tres meses de tratamiento

De los 30 pacientes con AR a los cuales se les hizo el seguimiento luego de haber iniciado un nuevo tratamiento, 19 (63%) tuvieron valores dosables de IL-22 y 13 (43%) de IL-6. Al comparar los niveles de IL-22 luego de 3 meses de tratamiento en los pacientes que tuvieron inicialmente valores dosables, se observó una disminución significativa ( $p=0,035$ ) (**Figura 2a**). La mayoría de los pacientes, 63,2%, fueron respondedores al tratamiento, 26,4 % tuvieron buena y 36,8% moderada respuesta. El 36,8% restante no tuvo respuesta al tratamiento. Sin embargo, cuando discriminamos a los pacientes en respondedores y sin respuesta (**Figura 2b y 2c**) y se compararon nuevamente los niveles de IL-22 antes y después del tratamiento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p= 0,469$  y  $p= 0,468$ , respectivamente). De los pacientes que respondieron al tratamiento, 8 iniciaron con MTX, 2 con etanercept, 1 con abatacept y 1 tuvo una terapia combinada de MTX más golimumab. Mientras los que no respondieron al tratamiento, 6 iniciaron con MTX y 1 con Tofa.

Los niveles séricos de IL-6 en los pacientes con valores dosables también disminuyeron significativamente luego de 3 meses de tratamiento ( $p=0,0003$ ) (**Figura 3a**). El 69,3% tuvo respuesta al tratamiento, 23,1% buena y 46,2% moderada, mientras que el 30,8% no respondió. La disminución de los valores de IL-6 también fue significativa ( $p=0,0039$ ), cuando analizamos los pacientes respondedores (**Figura 3b**). Debido al escaso número de pacientes en el grupo sin respuesta ( $n=4$ ), no

fue posible realizar la comparación al inicio y luego del tratamiento (**Figura 3c**). De los pacientes respondedores, 5 iniciaron tratamiento con MTX, 1 con etanercept, 1 con abatacept y 2 con terapia combinada: 1 de MTX más golimumab y el otro de MTX más Tofa. De los pacientes sin respuesta, 2 iniciaron con Tofa, 1 con MTX y 1 con etanercept.

### Comparación de los niveles de IL-22 e IL-6 en suero y líquido sinovial

En los pacientes a los que se les realizó artrocentesis terapéutica, se compararon los niveles de las citocinas en suero y LS. Los niveles de IL-22 fueron menores en LS que en suero de un mismo paciente ( $p=0,019$ ) (**Figura 4a**), mientras que los niveles de IL-6 fueron marcadamente superiores en LS ( $p<0,0001$ ) (**Figura 4b**).

### Asociación de las concentraciones de citocinas con la actividad de la enfermedad, autoanticuerpos y marcadores de inflamación

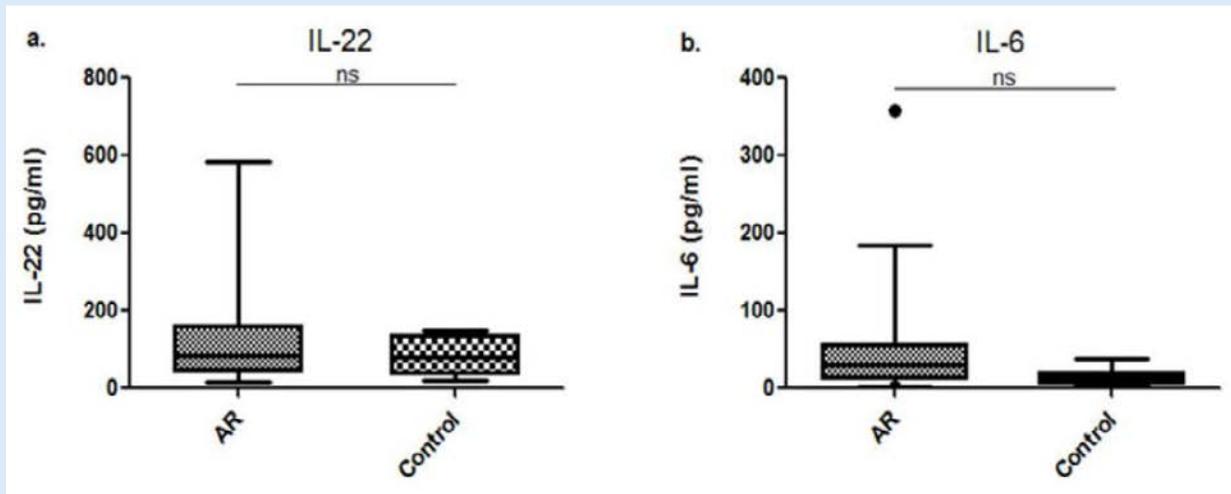
Se analizó la correlación de los niveles de las citocinas en el suero de los pacientes con distintas variables bioquímicas y clínicas. Para ello, los pacientes con valores dosables de las citocinas fueron agrupados en aquellos que estaban sin tratamiento específico y aquellos que estaban siendo tratados. Los valores de IL-22 no correlacionaron con ninguna de las variables analizadas, ni en los pacientes sin tratamiento, ni en los tratados (**Tabla II**). Tampoco hallamos diferencias significativas cuando comparamos los valores de VSG, PCR, DAS28 y anti-CCPhs entre los pacientes sin tratamiento con valores no dosables y dosables o entre los pacientes tratados con valores no dosables y dosables (**Tabla III**).

En contraposición, los valores de IL-6 en los pacientes sin tratamiento correlacionaron positivamente con la PCR (**Figura 5a y Tabla II**) y con los anti-CCPhs (**Figura 5b y Tabla II**), y en el caso de los pacientes tratados, sólo con la PCR (**Tabla II**). Para las demás variables no se obtuvo correlación significativa. Sin embargo, cuando comparamos los niveles de estas variables, entre los pacientes sin tratamiento, con valores no dosables y dosables, y entre los pacientes tratados con valores no dosables y dosables de IL-6, observamos que: la VSG fue mayor en los pacientes con valores dosables tanto en aquellos que estaban sin tratamiento ( $p=0,041$ ) como en aquellos tratados ( $p=0,0088$ ); la PCR fue mayor en los pacientes con valores dosables de IL-6 tanto en el grupo sin tratamiento ( $p=0,0010$ ) como en el tratado ( $p=0,0088$ ); el DAS28 también fue mayor en los pacientes con valores dosables en el grupo sin tratamiento ( $p=0,0058$ ), aunque no hubo diferencias en el caso de los tratados ( $p=0,073$ ); para los anti-CCPhs no se obtuvieron diferencias ni en los pacientes sin tratamiento ( $p=0,7398$ ), ni en los tratados ( $p=0,63$ ) (**Tabla IV**).

## Discusión

Las citocinas son responsables de la inflamación y la destrucción de las articulaciones que se producen durante la AR, estimulando la proliferación y diferenciación de Li B,

Figura 1



#### Niveles de IL-22 e IL-6 en suero de pacientes con AR y controles.

a) IL-22 mediana (P25-75) AR: 84,17 (43,92- 160,8), control: 80,40 (37,68- 135,3). Test de Mann Whitney,  $p=0,60$ .

b) IL-6 mediana (P25-75) AR: 30,05 (11,52- 56,88), control: 15,01 (6,60 -19,42); Test de Mann Whitney,  $p=0,13$ .

AR= Artritis reumatoidea. ns= no significativo.

Li T y células NK, activación de fibroblastos y osteoclastos, y aumento de la expresión de moléculas de adhesión endotelial<sup>6,23</sup>. En este trabajo nos enfocamos en el estudio de la IL-22, citocina efectora de la respuesta Th17, a la que se le ha adjudicado un papel patogénico en el inicio y el desarrollo de la AR<sup>4</sup>. También en la IL-6, citocina inflamatoria por excelencia, que promueve la reacción de fase aguda y que contribuye a la inducción y mantenimiento de los procesos autoinmunes a través de la maduración de Li B y la diferenciación de Li Th17<sup>23</sup>.

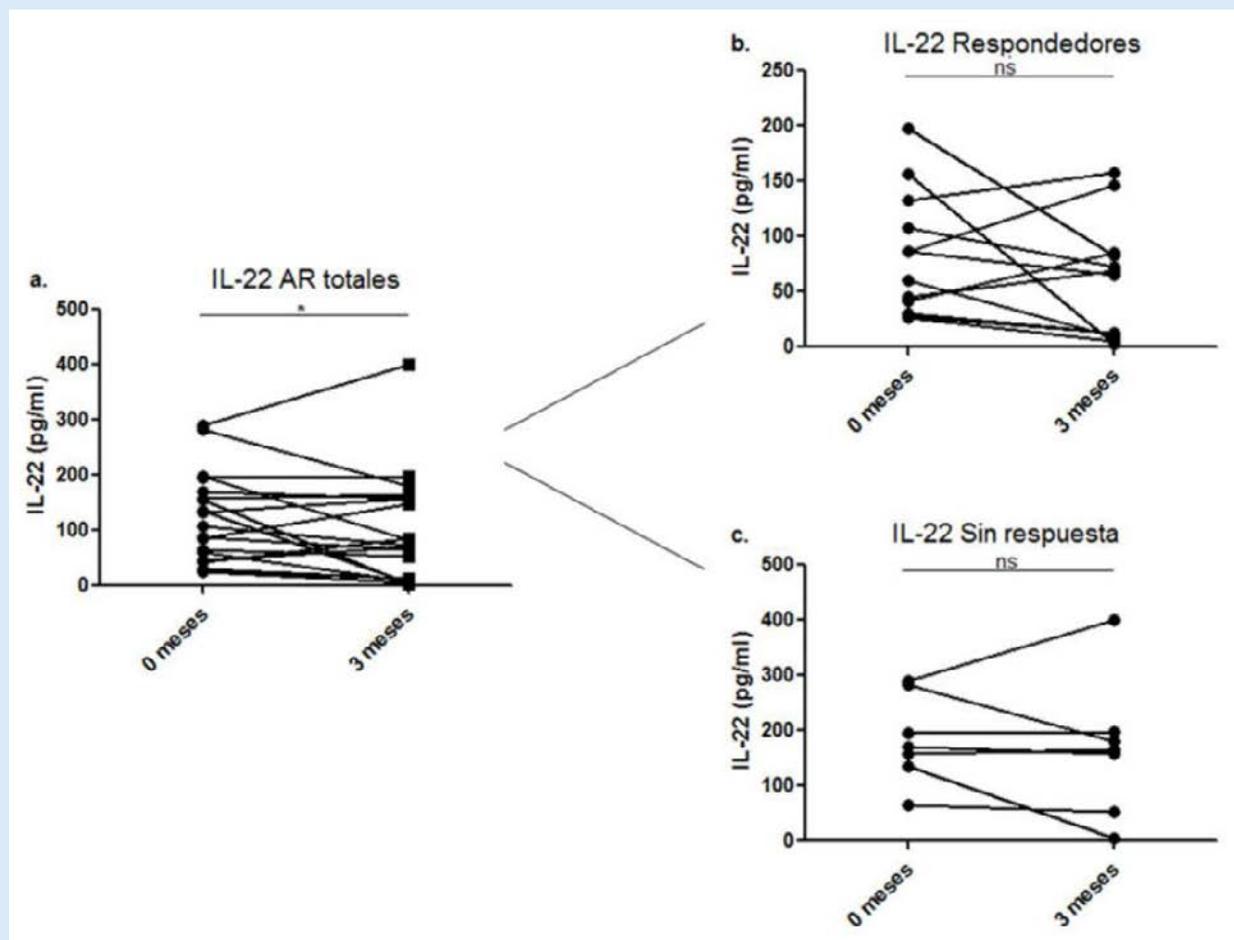
En nuestra cohorte de pacientes identificamos un alto porcentaje de ellos con niveles indetectables o no dosables de IL-22 (40,3%), y de IL-6 (54,6%). Otros estudios demuestran una remarcable heterogeneidad en los valores séricos de estas citocinas entre los pacientes con AR<sup>21,37-38</sup>. Algunos autores determinaron inicialmente un rango de valores normales, actualmente llamados valores de referencia, de IL-22 en suero de un grupo de 45 controles sanos, calculado como la media  $\pm$  3 desviación estándar. En este trabajo los pacientes, con AR muy temprana y activa, fueron agrupados en aquellos con IL-22 en el rango normal y aquellos con altos niveles de IL-22<sup>21</sup>. El grupo de pacientes con IL-22 normal tuvo una media de  $4,3 \pm 1,4$  pg/mL que fue menor al límite de detección de nuestro ensayo de ELISA (16 pg/mL) y el porcentaje de pacientes con valores no dosables (40,3%) de nuestro estudio fue similar al porcentaje de pacientes con valores normales del estudio arriba mencionado (51%)<sup>21</sup>. Motohiko Aizu y col. utilizaron un ELISA para medir IL-6 en suero de pacientes con AR cuyo límite de detección fue de 3 pg/mL y a los pacientes con valores menores a ese límite, consecuentemente, no dosables, decidieron asignarle ese valor<sup>37</sup>. El mismo criterio fue utilizado en otro estudio realizado en Jalisco, México<sup>38</sup>. Asignar un mismo valor, el del límite de detección, a todas aquellas muestras no

dosables impacta de manera no aleatoria en el valor medio del analito, por lo tanto, en nuestro trabajo decidimos analizar únicamente a aquellos pacientes y controles en los cuales se pudieron medir las citocinas con certeza.

En nuestro estudio no hallamos diferencias en los niveles de IL-22 cuando comparamos los valores dosables de esta citocina entre los pacientes con AR y los controles. En acuerdo con nuestros resultados, Anupam Mitra y col. tampoco hallaron diferencias en los niveles séricos de IL-22 cuando compararon pacientes con AR con osteoartritis, una artritis no-inflamatoria, como control negativo<sup>39</sup>. Sin embargo, en otros estudios hallaron aumento en los niveles plasmáticos de IL-22 de pacientes con AR cuando se compararon con controles sanos<sup>4,17,21,40-42</sup>. Cabe destacar que en estos trabajos los niveles séricos de IL-22 en los pacientes con AR fueron extremadamente dispersos o heterogéneos, como se mencionó anteriormente, con un gran número de pacientes con valores bajos y muy bajos de IL-22 y algunos pocos con valores muy altos, lo que lleva a DS grandes e incluso superiores a la media<sup>21,40-41</sup>. Algo similar sucedió en nuestro grupo de pacientes.

Tampoco hallamos diferencias significativas entre los niveles dosables de IL-6 de los pacientes con AR y el grupo control. Esto concuerda con el trabajo de Ibrahim Tekeoglu y col. donde compararon los niveles séricos de IL-6 entre pacientes con AR y controles sanos utilizando un ELISA con una sensibilidad 10 veces mayor a la del nuestro<sup>43</sup>. Sin embargo, hay otros estudios donde demuestran niveles aumentados de IL-6 en los pacientes con AR<sup>8,12,22,38,44-45</sup>. Al igual que para IL-22, los trabajos muestran valores muy heterogéneos de IL-6 en los pacientes con AR con DS mayores a la media<sup>22,37-38,45</sup>. Estos hallazgos podrían explicar la falta de respuesta a TCZ de algunos pacientes. La variabilidad en los valores plasmáticos

Figura 2



**Niveles de IL-22 al inicio (0 meses) y después de 3 meses de tratamiento.**

- a) IL-22 AR totales: mediana (P25-75) Inicio= 107,1 (44,63-169,2), 3 meses= 72,7 (12,37- 157,5); n= 19, Test t de muestras pareadas, p=0,035.  
 b) IL-22 Respondedores: mediana (P25-75) Inicio= 73,7 (32,8-126,4), 3 meses= 67,5 (9,9-85,1); n=12, Test de Wilcoxon, p= 0,469.  
 c) IL-22 Sin respuesta: mediana (P25-75) Inicio= 169,2 (136,3-283,4), 3 meses= 166,5 (53,1-197,3); n=7, Test de Wilcoxon, p= 0,468. AR= Artritis reumatoidea. ns= no significativo. \* p<0,05.

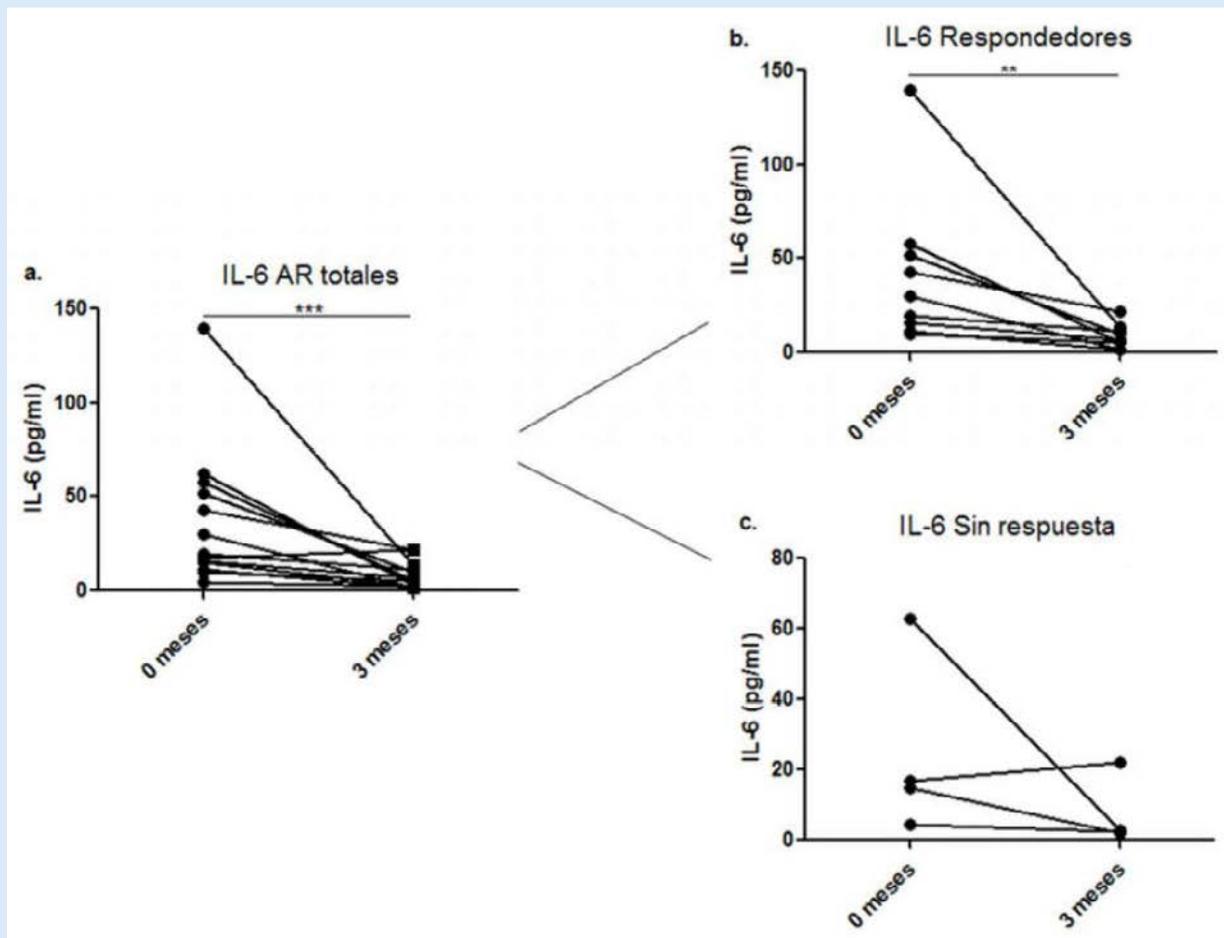
de las citocinas parece no limitarse a IL-22 e IL-6, ya que Reyes-Castillo y col hallaron esta limitación cuando estudiaron distintas citocinas Th1, Th2 y Th17 con un ensayo multiplex en pacientes con AR<sup>38</sup>. Las discrepancias observadas entre los diferentes estudios pueden explicarse por los diferentes backgrounds genéticos de las poblaciones estudiadas, las formas de clasificar a los pacientes con AR, la utilización de diferentes técnicas (con diferentes límites de detección) para la determinación de las citocinas, el tiempo de evolución de la enfermedad y la utilización de diferentes drogas inmunosupresoras.

Un hallazgo muy interesante de nuestro trabajo fue la disminución que se produjo en los valores séricos de IL-22 e IL-6 en los pacientes luego de 3 meses de haber iniciado un nuevo tratamiento. Para el caso de IL-22 esa diferencia estadística fue modesta y se pierde cuando agrupamos a los pacientes en

respondedores y sin respuesta al tratamiento. De acuerdo con nuestros datos, otros autores hallaron una disminución en los niveles plasmáticos de IL-22 en pacientes que mostraron buena respuesta, luego de 3 meses de tratamiento combinado de MTX con leflunomida<sup>4</sup>. Cabe destacar que el criterio utilizado para evaluar la respuesta al tratamiento no fue exactamente el mismo que el utilizado por nosotros, y que el 66,7% de los pacientes, con buena y moderada respuesta en nuestro estudio, inició tratamiento con MTX, pero ninguno terapia combinada con leflunomida.

Vale la pena decir que los niveles séricos de IL-6 de nuestros pacientes disminuyeron significativamente en aquellos con buena y moderada respuesta al tratamiento. En un estudio realizado en 20 pacientes con AR y enfermedad establecida y clínicamente activa, se demostró una disminución en los niveles de IL-6 luego de 3 meses de tratamiento con bajas

Figura 3



Niveles de IL-6 al inicio (0 meses) y después de 3 meses de tratamiento.

a) IL-6 AR totales: mediana (P25-75) inicio= 19,7 (13,19-54,69), 3 meses= 5,7 (2,31- 12,41); n= 13, Test t de muestras pareadas, p= 0,0003.

b) IL-6 Respondedores: mediana (P25-75) Inicio= 30,1 (13,8-54,7), 3 meses= 6,6 (3,7-12,4); n=9, Test de Wilcoxon, p= 0,0039.

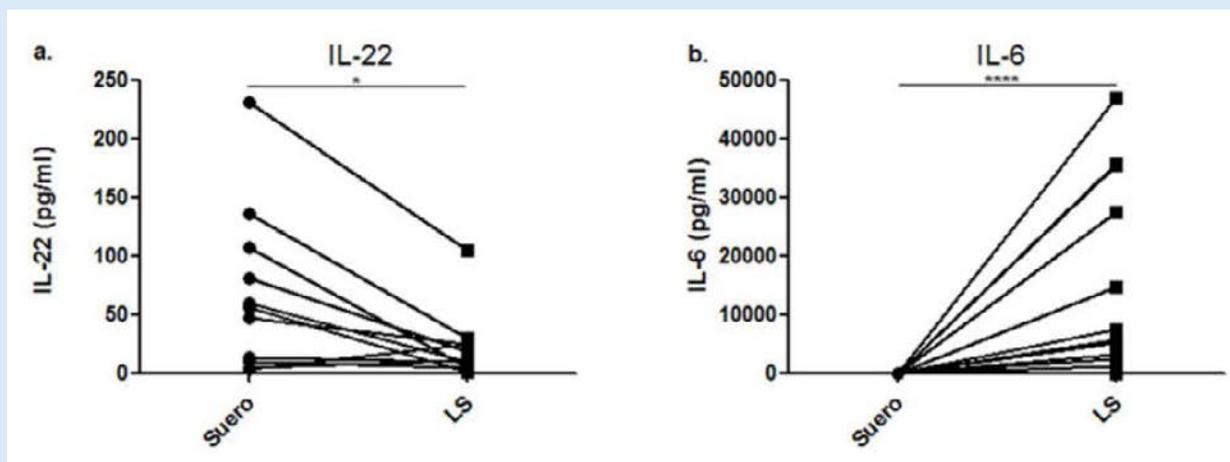
c) IL-6 Sin respuesta: n=insuficiente. AR=Artritis Reumatoidea. \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001.

dosis de MTX<sup>46</sup>. Otro trabajo también demostró una reducción en los niveles de IL-6 luego de 12 semanas de tratamiento pero con dosis mayores de MTX<sup>12</sup>. Hambarzumyan y col demostraron que los niveles de IL-6 fueron menores en los pacientes con baja actividad de la enfermedad cuando se compararon a aquellos con alta actividad, luego de 3 meses de tratamiento con MTX<sup>47</sup>. En ese mismo estudio los niveles pre-tratamiento de IL-6 no fueron capaces de predecir respuesta clínica (baja actividad de la enfermedad) luego de 3 meses de tratamiento con MTX<sup>47</sup>. Por otro lado, Straub y col., demostraron una reducción en los niveles de IL-6 luego de un año de tratamiento con DMARDs sintéticos convencionales, y que esta disminución, fue el mejor marcador pronóstico de respuesta clínica luego de 3 años de tratamiento<sup>48</sup>. Consecuentemente, en aquellos pacientes con niveles basales dosables de IL-6, esta determinación podría utilizarse como una medida adicional de respuesta. Lamentablemente, el número pequeño de pacientes con niveles basales dosables, sin respuesta al trata-

miento, en nuestro estudio, no nos permitió evaluar los cambios de esta citocina luego de 3 meses de tratamiento en este grupo. En contraposición a nuestros hallazgos, en un trabajo donde midieron IL-6 al inicio y luego de 3 y 6 meses de tratamiento con anti-TNF $\alpha$  no hallaron cambios en los niveles de la citocina<sup>22</sup>. En nuestro estudio sólo 1 paciente respondedor, con nivel dosable de IL-6, inició tratamiento con etanercept y otro terapia combinada de golimumab más MTX.

Cuando comparamos los niveles séricos de IL-22 e IL-6 con los hallados en LS de un mismo paciente, se encontraron comportamientos opuestos. IL-22 estaba disminuida e IL-6 extremadamente aumentada en LS. En contraposición, Anupam Mitra y col. hallaron que los niveles de IL-22 en LS de los pacientes con AR fueron mayores que en plasma<sup>39</sup>. Sin embargo, al realizar la comparación utilizaron un test estadístico de muestras independientes o no pareado<sup>39</sup>. También se han observado niveles elevados de esta citocina en el tejido sinovial de pacientes que padecen esta enfermedad<sup>17,49-50</sup> y en

Figura 4

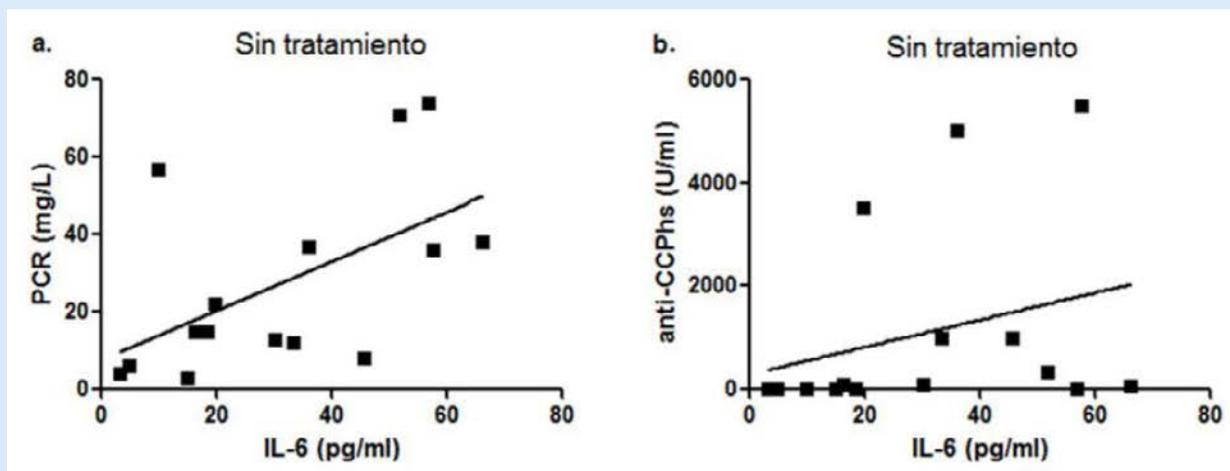


#### Niveles de IL-22 e IL-6 en suero y líquido sinovial.

a) IL-22: mediana (P25-75) suero= 56,77 (10,14- 107,1), LS= 11,71 (5,21- 24,93) n=11; Test de Wilcoxon, p=0,019.

b) IL-6: mediana (P25-75) suero= 14,84 (1,39-48,57), LS= 6683 (2730- 33609) n=12; Test t de muestras pareadas, p<0,0001. LS= líquido sinovial. \* p<0,05. \*\*\*\*p<0,0001.

Figura 5



#### Correlación entre las concentraciones séricas de IL-6 con distintos parámetros bioquímicos.

a) Correlación entre los niveles séricos de IL-6 de pacientes sin tratamiento y los niveles de PCR

b) Correlación entre los niveles séricos de IL-6 de pacientes sin tratamiento y los niveles de anti-CCPhs.

Test estadísticos y valores de r y p figuran en la tabla II.

células mononucleares de líquido sinovial<sup>49</sup>. En concordancia con nuestros resultados, otros grupos hallaron niveles mayores de IL-6 en LS que en plasma de pacientes con AR<sup>51-52</sup>. En uno de esos trabajos estudiaron secuencialmente, durante un seguimiento de 8 hs, muestras pareadas de sangre y LS de 3 pacientes con AR y hallaron que los niveles de IL-6 fueron variando independientemente en ambas muestras biológicas<sup>51</sup>. Consecuentemente en los pacientes con AR hay una producción local de IL-6 que estaría impulsando una fuerte respuesta inflamatoria en la articulación. Esa producción lo-

cal es 1000 veces mayor en la articulación que en la sangre, pasando del orden de los pg/mL a ng/mL. En la articulación, IL-6 desempeña un papel fundamental en el proceso inflamatorio, en la resorción ósea mediada por osteoclastos y en el desarrollo del pannus a través de una mayor expresión de factor de crecimiento endotelial vascular<sup>3,24</sup>.

Al momento de correlacionar los niveles de las citocinas con variables bioquímicas y clínicas, los niveles séricos de IL-22 no correlacionaron con VSG, PCR, DAS28, FR o anti-CCPhs ni en los pacientes sin tratamiento, ni en los tratados. Estos

**Tabla I. Características demográficas, bioquímicas y clínicas de individuos controles y pacientes con AR**

	AR				
	Control (n=30)	Todos pts. (n=77)	Valor p	Tratamiento	
				Sin Tx (n=40)	Tx (n=37)
<b>Edad,<sup>a</sup> años</b>	47±10	53±14	0,011c	52±15	55±12
<b>Sexo, n° F/M</b>	27/3	64/13	0,55d	34/6	30/7
<b>VSG,<sup>b</sup> mm/h</b>	7 (3,7-15)	15 (5,5-29)	0,0016e	19,5 (7-35)	10 (4-24)
<b>PCR,<sup>b</sup> mg/L</b>	3 (2-5)	6 (3-15)	0,0003e	6 (3-22)	6,0 (3,0-12,5)
<b>DAS28<sup>a</sup></b>	--	4,4±1,4	--	4,6±1,3	4,2±1,5
<b>FR, +/- (% +)</b>	1/29 (3,3%)	55/22 (71,4%)	<0,0001f	27/13 (67,5%)	28/9 (75,6%)
<b>Anti-CCP hs,<sup>b</sup> U/mL</b>	2,7 (1,6-5,3)	97,5 (5,1-1000)	<0,0001e	70 (3-1000)	278,0 (11,0-1000,0)

Referencias: <sup>a</sup>Valor expresado como la media ± desviación estándar; <sup>b</sup>valor expresado como la mediana y rango intercuartílico (P25-75); <sup>c</sup>Test de Welch; <sup>d</sup>Test exacto de Fisher; <sup>e</sup>Test de Mann Whitney; <sup>f</sup>Test Chi-cuadrado. AR= artritis reumatoidea; pts.=pacientes; Tx= tratamiento; VSG= velocidad de sedimentación globular; PCR= Proteína C Reactiva; DAS28= índice de actividad de la enfermedad sobre 28 articulaciones; FR= factor reumatoideo (VR < 1/20); anti-CCP hs= anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados de alta sensibilidad (VR < 20 U/mL).

**Tabla II. Correlación entre las concentraciones de IL-22 e IL-6 en suero de pacientes y distintas variables bioquímicas y clínicas**

	IL-22				IL-6			
	Sin Tx		Tx		Sin Tx		Tx	
	r	Valor p	r	Valor p	r	Valor p	r	Valor p
<b>VSG, mm/h</b>	0,034	0,86 <sup>a</sup>	0,16	0,49 <sup>a</sup>	0,14	0,61 <sup>b</sup>	0,26	0,28 <sup>a</sup>
<b>PCR, mg/L</b>	0,034	0,87 <sup>a</sup>	0,24	0,28 <sup>a</sup>	0,59	0,019 <sup>a</sup>	0,52	0,019 <sup>a</sup>
<b>DAS28</b>	0,052	0,81 <sup>a</sup>	0,15	0,53 <sup>a</sup>	0,37	0,18 <sup>a</sup>	0,25	0,28 <sup>a</sup>
<b>FR, (+/-) %+</b>	-0,11	0,68 <sup>a</sup>	0,32	0,23 <sup>a</sup>	0,018	0,98 <sup>a</sup>	-0,052	0,85 <sup>a</sup>
<b>Anti-CCP hs, U/mL</b>	-0,19	0,37 <sup>a</sup>	0,23	0,33 <sup>a</sup>	0,55	0,03 <sup>a</sup>	0,075	0,76 <sup>a</sup>

Referencias: <sup>a</sup>Correlación de Spearman; <sup>b</sup>Correlación de Pearson; Tx= tratamiento; VSG= velocidad de sedimentación globular; PCR= Proteína C Reactiva; DAS28= índice de actividad de la enfermedad sobre 28 articulaciones; FR= factor reumatoideo (VR < 1/20); anti-CCP hs= anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados de alta sensibilidad (VR < 20 U/mL). En negrita se remarcan las correlaciones significativas.

**Tabla III. Comparación de las distintas variables bioquímicas y clínicas entre pacientes sin tratamiento y tratados, discriminados según valores no dosables y dosables de IL-22**

	Sin Tx			Tx		
	No dosable (n=15)	Dosable (n=25)	Valor p	No dosable (n=16)	Dosable (n=21)	Valor p
	<b>VSG,<sup>a</sup> mm/h</b>	21,0 (7,0-36,0)	15,0 (7,5-29,0)	0,417 <sup>a</sup>	15,5 (4,3-27,0)	9,0 (3,0-23,0)
<b>PCR,<sup>a</sup> mg/L</b>	5,0 (2,7-18,7)	8,0 (3,5-25,0)	0,395 <sup>a</sup>	7,0 (3,0-32,7)	5,0 (3,0-12,5)	0,735 <sup>a</sup>
<b>DAS28</b>	4,6 ± 1,2 <sup>b</sup>	4,6 ± 1,5 <sup>b</sup>	0,994 <sup>a</sup>	4,4 (3,4-5,1) <sup>b</sup>	4,1 (2,5-5,4) <sup>b</sup>	0,602 <sup>c</sup>
<b>anti-CCP hs, <sup>a</sup>U/mL</b>	62 (1,4-1000)	92,5 (5,2-573,8)	0,686 <sup>c</sup>	380 (14-1000)	85,5 (5,9-1000)	0,548 <sup>c</sup>

Referencias: <sup>a</sup>Valor expresado como la mediana y rango intercuartílico (P25-75); <sup>b</sup>valor expresado como la media ± desviación estándar; <sup>c</sup>Test de Mann Whitney; <sup>d</sup>Test de Welch; Tx= tratamiento; VSG= velocidad de sedimentación globular; PCR= Proteína C Reactiva; DAS28= índice de actividad de la enfermedad sobre 28 articulaciones; anti-CCP hs= anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados de alta sensibilidad (VR < 20 U/mL).

**Tabla IV. Comparación de las distintas variables bioquímicas y clínicas entre pacientes sin tratamiento y tratados, discriminados según valores no dosables y dosables de IL-6**

	Sin Tx			Tx		
	No dosable (n=25)	Dosable (n=15)	Valor p	No dosable (n=17)	Dosable (n=20)	Valor p
	<b>VSG, mm/h</b>	17,3 ± 11,5 <sup>b</sup>	32,6 ± 25,0	0,041 <sup>c</sup>	5 (3-15) <sup>a</sup>	19 (9-46) <sup>a</sup>
<b>PCR,<sup>a</sup> mg/L</b>	4,5 (2,3-8,5)	15 (8-38)	0,001 <sup>d</sup>	4 (3-6)	11 (6,2-37)	0,008 <sup>d</sup>
<b>DAS28<sup>b</sup></b>	4,2 ± 1,2	5,3 ± 1,3	0,006 <sup>e</sup>	3,7 ± 1,5	4,6 ± 1,4	0,073 <sup>e</sup>
<b>anti-CCP hs, <sup>a</sup>U/mL</b>	66 (83,9-573,8)	100 (2,2-1000)	0,739 <sup>d</sup>	93 (4,6-1000)	320 (31-1000)	0,631 <sup>d</sup>

Referencias: <sup>a</sup>Valor expresado como la mediana y rango intercuartílico (P25-75); <sup>b</sup>valor expresado como la media ± desviación estándar; <sup>c</sup>Test de Welch; <sup>d</sup>Test de Mann Whitney; <sup>e</sup>Test t de muestras independientes; Tx= tratamiento; VSG= velocidad de sedimentación globular; PCR= Proteína C Reactiva; DAS28= índice de actividad de la enfermedad sobre 28 articulaciones; anti-CCP hs= anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados de alta sensibilidad (VR < 20 U/mL). En negrita se remarcan las correlaciones significativas.

hallazgos confirman que IL-22 no tiene efectos directos sobre células inmunes, incluidos los Li B y su función productora de anticuerpos. Tampoco se hallaron diferencias en todas estas variables cuando se las comparó entre los pacientes con IL-22 no dosable y dosable. Concordantemente, Jan Leipe y col. no hallaron diferencias entre los pacientes con AR con niveles normales y aquellos con niveles altos de IL-22 cuando compararon DAS28, PCR, VSG, FR y anti-CCPs<sup>21</sup>. Así mismo, otros autores tampoco hallaron correlación entre los niveles de IL-22 y DAS28, o IL-22 y PCR<sup>41-42</sup>. Siguiendo en la misma línea, Kyoung-Woon y col. no obtuvieron correlación con VSG y PCR<sup>50</sup>. La IL-22 puede ser proinflamatoria o protectora del tejido dependiendo del tipo de respuesta inflamatoria, su fuente celular y el medio de citoquinas que la rodean<sup>53</sup>. En AR el efecto proinflamatorio de IL-22 parece ser leve y algunos grupos proponen a esta citocina como un marcador de erosiones óseas<sup>21</sup>. Desafortunadamente, los cambios radiográficos no fueron evaluados en nuestro estudio y no podemos corroborar esta hipótesis. En contraposición, otros estudios hallaron correlación entre los niveles séricos de IL-22 con DAS28<sup>40</sup>, con FR<sup>40,50</sup> o con anti-CCPs<sup>50</sup>. Sin embargo, en algunos casos las correlaciones fueron débiles, con valores de "r" que oscilan entre 0,2 y 0,3<sup>40</sup>.

La IL-6 es un factor de crecimiento de células B y cumple un rol muy importante en la inducción de Li T foliculares helper<sup>54</sup> lo que promovería la generación de células plasmáticas y la producción de autoanticuerpos<sup>3,55</sup>. Al ser una citocina proinflamatoria, también induce la síntesis de proteínas de fase aguda a nivel hepático, como la PCR y otras proteínas que llevarían al aumento de la VSG<sup>3,23-24,55</sup>. Los niveles séricos de IL-6 en nuestro estudio correlacionaron positivamente con la PCR en pacientes sin tratamiento y tratados, y con los anti-CCPs en pacientes sin tratamiento. Aunque no hubo correlación con VSG y DAS28, cuando comparamos estas variables entre los pacientes con valores no dosables y dosables de IL-6, observamos que los pacientes con valores dosables tuvieron mayores niveles de VSG tanto en los pacientes sin tratamiento como en los tratados, y mayores niveles de DAS28 cuando los pacientes estaban sin tratamiento. La PCR también fue

mayor en los pacientes con valores dosables cuando se compararon con los no dosables, en ambos grupos de pacientes. En un trabajo publicado recientemente, los autores hallaron correlación positiva de IL-6 en suero con parámetros de actividad de la enfermedad como VSG, PCR y DAS28, y con distintos autoanticuerpos como los anti-CCP y anti-vimentina mutada citrulinada<sup>38</sup>. Concordantemente, otros grupos hallaron correlación positiva entre IL-6 y PCR<sup>8,56</sup>. Si bien en el trabajo de Abdel Mequid y col no obtuvieron correlación entre esas 2 variables, ellos hallaron correlación positiva de IL-6 con VSG y anti-CCP<sup>45</sup>. Otros estudios también hallaron correlación positiva de la IL-6 con la VSG<sup>8,56</sup>. El grupo de Tekeoglu y col. en Turquía reportó que la IL-6 en suero de los pacientes con alta actividad de la enfermedad fue mayor que en los de baja actividad, y los niveles de esta citocina correlacionaron positivamente con DAS28 y VSG<sup>43</sup>. Sin embargo, otros autores no encontraron correlación entre los niveles de IL-6 y DAS28<sup>22,45,56</sup> o IL-6 y FR<sup>45</sup>.

## Conclusiones

Dado que la AR es una enfermedad muy heterogénea, tanto en su presentación clínica como en los mecanismos involucrados en su fisiopatogenia, en aquellos pacientes que al inicio del tratamiento presenten valores dosables de IL-22 o, principalmente, de IL-6, la disminución de sus niveles, podría utilizarse como un biomarcador adicional de respuesta.

Una mejor comprensión del rol de IL-22 e IL-6 en pacientes con AR, incluidos sus cambios luego de la instauración de un tratamiento específico, ayudaría al diseño de terapias más eficaces, principalmente en aquellos pacientes de difícil manejo de su estado inflamatorio o actividad de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016; 388(10055):2023-2038.
- Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4: 18001
- Srirangan S, Choy EH. The role of Interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2010; 2(5):247-56.
- Zhong W, Zhao L, Liu T, Jiang Z. IL-22-producing CD4+T cells in the treatment response of rheumatoid arthritis to combination therapy with methotrexate and leflunomide. *Sci Rep*. 2017; 7:41143.
- Zhao M, Yishuo L, Xiao W. Anti-apoptotic effect of interleukin-22 on fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis is mediated via the signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway. *International Journal of Rheumatic Diseases* 2016; 20(2):214-224.
- Mateen S, Zafar A, Moin S, Khan AQ, Zubair S. Understanding the role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 2016;455:161-71
- Edrees AF, Misra SN, Abdou NI. Anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in rheumatoid arthritis: correlation of TNF-alpha serum level with clinical response and benefit from changing dose or frequency of infliximab infusions. *Clin Exp Rheumatol*. 2005; 23:469-74.
- Usón J, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Cabezas JA, Gonzalez-Tarrio JM, Martín-Mola E, Fontan G. Soluble Interleukin 6 (IL-6) Receptor and IL-6 Levels in Serum and Synovial Fluid of Patients with Different Arthropathies. *J Rheumatol*. 1997;24(11):2069-75.
- Luchetti MM, Balloni A, Gabrielli A. Biologic Therapy in Inflammatory and Immunomediated Arthritis: SafetyProfile. *Curr Drug Saf*. 2016; 11(1):22-34.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005; 6(11):1123-32.
- Shen H, Goodal JC, Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(6):1647-56.
- Yue C, You X, Zhao L, Wang H, Tang F, Zhang F, et al. The effects of adalimumab and methotrexate treatment on peripheral Th17 cells and IL-17/IL-6 secretion in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int*. 2010;30: 1553-7.
- Gullick NJ, Abozaid HS, Jayaraj DM, Evans HG, Scott DL, Choy EH, et al. Enhanced and persistent levels of interleukin (IL)-17+CD4+ T cells and serum IL-17 in patients with early inflammatory arthritis. *Clin Exp Immunol*. 2013; 174(2):292-301.
- Velhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006; 24(2):179-89.
- Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, et al. IL-21 and TGF-b are required for differentiation of human Th17 cells. *Nature*. 2008; 454(7202):350-2.
- Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol*. 2008; 9(6):650-7.
- Zhao L, Jiang Z, Jiang Y, Ma N, Zhang Y, Feng L. IL-22+CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2013; 16(5):518-26.
- Duhen T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol*. 2009; 10(8):857-63.
- Xie Q, Huang C, Li J. Interleukin-22 and rheumatoid arthritis: Emerging role in pathogenesis and therapy. *Autoimmunity*. 2015; 48(2):69-72.
- Miyazaki Y, Nakayama S, Kubo S, Nakano K, Iwata S, Miyagawa I, et al. Th22 Cells Promote Osteoclast Differentiation via Production of IL-22 in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*. 2018; 9:2901
- Leipe J, Schramm MA, Grunke M, Baeuerle M, Dechant C, Nigg AP, et al. Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(8):1453-7.
- Wielnińska J, Dratwa M, Świerkot J, Korman L, Iwaszko M, Wysoczańska B, et al. IL-6 gene polymorphism is associated with protein serum level and disease activity in Polish patients with rheumatoid arthritis. *HLA*. 2018;92 Suppl 2:38-41
- McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev*. 2007; 7:429-442
- Dayer JM, Choy E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49:15-24.
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6:a016295.
- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205-19.

27. Ogata A, Kato Y, Higa S, Yoshizaki K. IL-6 inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis: a comprehensive review. *Mod Rheumatol*. 2019; 29: 258-267.
28. Köhler BM, Günther J, Kaudewitz D, Hanns-Martin Lorenz. Current Therapeutic Options in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med*. 2019; 8(7):938.
29. Burmester GR, Feist E, Dörner T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2014; 10(2):77-88
30. Ogata A, Hirano T, Hishitani Y, Tanaka T. Safety and efficacy of tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Med Insights Arthritis Musculoskelet Disord*. 2012; 5:27-42.
31. Uciechowski P, Dempke WCM. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology*. 2020; 98(3):131-137.
32. Choy EH, De Benedetti F, Takeuchi T, Hashizume M, John MR, Kishimoto T. Translating IL-6 biology into effective Treatments. *Nat Rev Rheumatol*. 2020; 16(6):335-345.
33. Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*. 2020; 79(6):685-699.
34. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010; 62(9):2569-81
35. Prevoo MLL, van't Hof MA, Kuper HH, van de Putte LBA, van Riel PLCM. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995; 38: 44-48.
36. Fransen J, van Riel PL. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Rheumat Dis Clin North Am*. 2009; 35:745-57.
37. Aizu M, Mizushima I, Nakazaki S, Nakashima A, Kato T, Murayama T, et al. Changes in Serum Interleukin-6 Levels as Possible Predictor of Efficacy of Tocilizumab Treatment in Rheumatoid Arthritis. *Modern Rheumatology*. 2018; 28(4):592-598.
38. Reyes-Castillo Z, Palafox-Sánchez CA, Parra-Rojas I, Martínez-Bonilla GE, del Toro-Arreola S, Ramírez-Dueñas MG, et al. Comparative analysis of autoantibodies targeting peptidylarginine deiminase type 4, mutated citrullinated vimentin and cyclic citrullinated peptides in rheumatoid arthritis: associations with cytokine profiles, clinical and genetic features. *Clin Exp Immunol*. 2015; 182(2):119-31
39. Mitra A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2012; 14(2):R65
40. da Rocha Jr LF, Branco Pinto Duarte AL, Tavares Dantas A, Ataíde Mariz H, da Rocha Pitta I, Lins Galdino S, et al. Increased Serum Interleukin 22 in Patients with Rheumatoid Arthritis and Correlation with Disease Activity. *J Rheumatol*. 2012; 39(7):1320-5.
41. Zhang L, Li JM, Liu XG, Ma DX, Hu NW, Li YG, et al. Elevated Th22 Cells Correlated with Th17 Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Clin Immunol*. 2011; 31(4):606-14.
42. Zhang L, Li Yg, Li Yh, Qi L, Liu Xg, Yuan Cz, et al. Increased Frequencies of Th22 Cells as well as Th17 Cells in the Peripheral Blood of Patients with Ankylosing Spondylitis and Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2012; 7(4):e31000
43. Tekeoğlu I, Harman H, Sağ S, Altındış M, Kamanlı A, Nas K. Levels of serum pentraxin 3, IL-6, fetuin A and insulin in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2016; 83:171-175.
44. Zheng Y, Sun L, Jiang T, Zhang D, He D, Nie H. TNF $\alpha$  Promotes Th17 Cell Differentiation through IL-6 and IL-1 $\beta$  Produced by Monocytes in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol Res*. 2014; 2014:385352.
45. Abdel Meguid MH, Hasan Hamad Y, Shafek Swilam R, Barakat MS. Relation of interleukin-6 in rheumatoid arthritis patients to systemic bone loss and structural bone damage. *Rheumatol Int*. 2013; 33(3):697-703
46. Crilly A, McInness IB, McDonald AG, Watson J, Capell HA, Madhok R. Interleukin 6 (IL-6) and soluble IL-2 receptor levels in patients with rheumatoid arthritis treated with low dose oral methotrexate. *J Rheumatol*. 1995; 12:224-6.
47. Hambarzumyan K, Bolce RJ, Wallman JK, van Vollenhoven RF, Saevarsdottir S. Serum Biomarkers for Prediction of Response to Methotrexate Monotherapy in Early Rheumatoid Arthritis: Results from the SWEFOT Trial. *J Rheumatol*. 2019; 46(6):555-563
48. Straub RH, Müller-Ladner U, Lichtinger T, Schölmerich J, Menninger H, Lang B. Decrease of interleukin 6 during the first 12 months is a prognostic marker for clinical outcome during 36 months treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs. *Br J Rheumatol*. 1997; 36(12):1298-303.
49. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum*. 2005; 52(4):1037-46.
50. Kyoung-Woon K, Hae-Rim K, Jin-Young P, Jin-Sil P, Hye-Jwa O, Yun-Ju W, et al. Interleukin-22 Promotes Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis Through Induction of RANKL in Human Synovial Fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2012; 64(4):1015-23.
51. Pery MG, Richards L, Harbuz MS, Jessop DS, Kirwan JR. Sequential synovial fluid sampling suggests plasma and synovial fluid IL-6 vary independently in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006; 45(2):229-30.
52. Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*. 1988; 31(6):784-8.
53. Plank MW, Kaiko GE, Maltby S, Weaver J, Tay HL, Shen W, et al. Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. *J Immunol*. 2017; 198(5):2182-2190.
54. Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly – TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13:412-26.
55. Hashizume M, Mihara M. The Roles of Interleukin-6 in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis*. 2011; 2011:765624.
56. H. Helal AM, Shahine E, Hassan MM, Hashad DI, Moneim RA. Fatigue in rheumatoid arthritis and its relation to interleukin-6 serum level. *The Egyptian Rheumatologist*. 2012; 34: 153-157.

Fecha de trabajo recibido: 03/07/2020

Fecha de trabajo aceptado: 04/08/2020