






Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

TESIS DOCTORAL

CONSECUENCIAS FUNCIONALES DE LA UNIÓN DE LAS PLAQUETAS AL MONOCITO

AUTORA

ANAÍS MARISCAL RODRÍGUEZ

DIRECTORES

CARLOS ZAMORA ATENZA

SÍLVIA VIDAL ALCORISA

Programa de Doctorado en Inmunología Avanzada
Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología
IIB Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
Universitat Autònoma de Barcelona, 2022

RESOLUCIÓ DE PRESENTACIÓ DE LA TESI COM A COMPENDI DE PUBLICACIONS

En la reunió del dia 31 de maig de 2022 de la Comissió Acadèmica del Programa de Doctorat en Biologia Cel·lular, d'acord amb la normativa Acadèmica de la Universitat Autònoma de Barcelona aplicable als Estudis universitaris regulats de conformitat amb el RD 1393/2007, de 29 d'octubre, modificat pel RD 861/2010, de 2 de juliol.

Ha resultat,

- Autoritzar
- No autoritzar

la presentació de la tesi de la Sra. **Anaïs Mariscal Rodríguez** de títol "*Conseqüències funcionals de la unió de la plaqueta al monòcit*" en forma de compendi de publicacions a la Universitat Autònoma de Barcelona.

IGNACIO
GERARDO
ALVAREZ
PEREZ - DNI
15392421Q

Firmado digitalmente por
IGNACIO GERARDO ALVAREZ
PEREZ - DNI 15392421Q
Nombre de reconocimiento (DN):
c=ES, sn=ALVAREZ PEREZ,
givenName=IGNACIO GERARDO,
serialNumber=IDCES-15392421Q,
cn=IGNACIO GERARDO ALVAREZ
PEREZ - DNI 15392421Q
Fecha: 2022.05.31 11:34:09 +02'00'

Iñaki Álvarez

Coordinador del programa de Doctorat en Immunologia Avançada

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), a 31 de maig de 2022

CÒPIA PER A LA PERSONA INTERESSADA

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACPAs	<i>Anti-citrullinated protein antibodies</i>
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ANAs	<i>Antinuclear antibodies</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
APRIL	<i>A proliferation-inducing ligand</i>
AR	<i>Artritis reumatoide</i>
BAFF	<i>B cell activating factor</i>
bdMARDs	<i>Biological disease-modifying anti-rheumatic drugs</i>
CCL	<i>Chemokine C-C motif ligand</i>
CCR	<i>CC-chemokine receptor</i>
CD	<i>Cluster de diferenciación</i>
CD40L	<i>Ligando de CD40</i>
CDAI	<i>Clinical disease activity index</i>
cDCs	<i>Celulas dendríticas convencionales</i>
cDMARDs	<i>Conventional disease-modifying anti-rheumatic drugs</i>
CX3CL	<i>CX3C-chemokine ligand</i>
CX3CR	<i>CX3C-chemokine receptor</i>
DAMPs	<i>Damage associated molecular patterns</i>
DAS28	<i>Disease activity score 28 joints</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercelular adhesión molecul-3-grabbing non-integrin</i>
dsDNA	<i>Double strand deoxyribonucleic acid</i>
EAI	<i>Enfermedades autoinmunes</i>
EMMPRIN	<i>Extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
Fc	<i>Fracción constante</i>
FcγR	<i>Receptores para la fracción Fc de la IgG</i>
FLS	<i>Fibroblast-like synoviocytes</i>
FR	<i>Factor reumatoide</i>
GA	<i>Global activity</i>
GP	<i>Glicoproteína</i>
GPI	<i>Glicosilfolfatidilinositol</i>
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HMGB1	<i>High mobility group box 1 protein</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	<i>Interferón</i>
Ig	<i>Inmunoglobulina</i>
IL	<i>Interleucina</i>
IL-10R	<i>Receptor de la interleucina 10</i>
ILCs	<i>Innate-lymphoid cells</i>
LAMP	<i>Lisosomal-associated membrane proteins</i>
LES	<i>Lupus eritematoso sistémico</i>
LFA	<i>Lymphocyte function associated</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i>
MLS	<i>Macrophage-like synoviocytes</i>
MMPs	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MPO	<i>Mieloperoxidasa</i>
MRP	<i>Myeloid-related protein</i>

NETs	<i>Neutrophil extracellular traps</i>
NO	<i>Nitric oxid</i>
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2</i>
NOS-2	<i>Nitric oxid synthase 2</i>
PAD-4	<i>Peptidil arginina deaminasa tipo IV</i>
PADGEM	<i>Platelet activation dependent granule-external membrane protein</i>
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PCR	<i>Proteína C reactiva</i>
pDCs	<i>Celulas dendríticas plasmacitoides</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PF4	<i>Factor plaquetario 4</i>
PMPs	<i>Platelet-derived microparticles</i>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RANTES	<i>Regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
sCD62P	<i>CD62P soluble</i>
SDAI	<i>Simplified disease activity index</i>
Siglec-1	<i>Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 1</i>
SJC	<i>Swollen joint counts</i>
SLEDAI	<i>SLE Disease Activity Index</i>
SLICC	<i>Systemic Lupus International Collaborating Clinics</i>
Sm	<i>Smith</i>
T_{FH}	<i>T follicular helper cells</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper</i>
TJC	<i>Tender joint counts</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumoral necrosis factor</i>
Treg	<i>T reguladoras</i>
TREM	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells</i>
tsDMARDs	<i>Target specific disease-modifying anti-rheumatic drugs</i>
VSG	<i>Velocidad de sedimentación globular</i>

1. RESUMEN	1
1.1. RESUMEN DE LA TESIS Y DE LAS PUBLICACIONES DERIVADAS	3
2. INTRODUCCIÓN.....	7
1.2. GENERALIDADES DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	9
1.2.1. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.....	11
1.2.1.1. Fisiopatología	12
1.2.1.2. Diagnóstico, tratamiento y monitorización.....	15
1.2.2. ARTRITIS REUMATOIDE	18
1.2.2.1. Fisiopatología	19
1.2.2.2. Diagnóstico, tratamiento y monitorización.....	22
1.3. RESPUESTA INMUNE INNATA EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES.....	24
1.3.1. Respuesta celular	26
1.3.1.1. Células dendríticas	27
1.3.1.2. Neutrófilos.....	28
1.3.1.3. Monocitos.....	29
1.3.1.4. Macrófagos.....	35
1.3.2. Factores solubles.....	37
1.3.2.1. IFN- α	40
1.3.2.2. IL-1 β , IL-6, y TNF- α	41
1.3.2.3. IL-17 e IL-23	42
1.3.2.4. IL-10.....	43
1.4. EL PAPEL DE LA PLAQUETA EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE.....	45
1.4.1. Las plaquetas como elemento de la inmunidad innata	48
1.4.2. Interacción de las plaquetas con células de la inmunidad innata.....	50
1.4.2.1. Migración y extravasación.....	52
1.4.2.2. Fagocitosis y formación de NETs.....	53
1.4.2.3. Fenotipo y diferenciación de monocitos.....	53
1.4.2.4. Secreción de citocinas	54
1.4.3. El papel de la plaqueta y su interacción con la inmunidad innata en LES y AR ..	55
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	57
3.1. HIPÓTESIS.....	59
3.2. OBJETIVOS.....	60
4. PUBLICACIONES	63
4.1. ARTÍCULO I	65
4.2. ARTÍCULO II	87

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	103
4.3. ARTÍCULO I	105
4.3.1. Resumen global de resultados	105
4.3.2. Discusión y relevancia	107
4.4. ARTÍCULO II	108
4.4.1. Resumen global de resultados	108
4.4.2. Discusión y relevancia	110
6. CONCLUSIONES	111
7. BIBLIOGRAFÍA	117

1. RESUMEN

1.1. RESUMEN DE LA TESIS Y DE LAS PUBLICACIONES DERIVADAS

Las enfermedades autoinmunes (EAI) presentan alteraciones en el sistema inmune, tanto innato como adaptativo, que desempeñan un papel importante en su fisiopatología. Estas enfermedades se acompañan de inflamación sistémica, la cual provoca un daño directo, pero también tiene efectos indirectos, al afectar a la maduración y activación de células del sistema inmune, así como de plaquetas. Está descrito que las plaquetas se unen a células del sistema inmune, principalmente monocitos, modulando sus funciones. En las EAI, la interacción monocito-plaqueta puede verse alterada, lo que podría tener consecuencias sobre la patología. De hecho, se ha publicado un mayor porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en varias EAI, entre ellas en el lupus eritematoso sistémico (LES) y en la artritis reumatoide (AR). Por ello, esta tesis pretende estudiar las consecuencias funcionales de la unión de las plaquetas al monocito, así como su asociación con la actividad de la enfermedad en estas dos patologías. El primer objetivo ha sido definir las características fenotípicas y funcionales de los monocitos con plaquetas unidas en individuos sanos y pacientes con LES, y asociar el porcentaje de estos complejos con la actividad clínica del LES. El segundo objetivo ha sido relacionar el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas con la actividad de la enfermedad en pacientes con AR, así como estudiar los cambios en estos complejos tras el tratamiento con tocilizumab y su relevancia en la monitorización de la eficacia del fármaco.

A continuación, se resumen los resultados de cada publicación.

ARTÍCULO 1 - Phenotypic and Functional Consequences of PLT Binding to Monocytes and Its Association with Clinical Features in SLE

Anaís Mariscal, Carlos Zamora, Berta Magallares, Tarek Carlos Salman-Monte, Cesar Díaz-Torné, Iván Castellví, Héctor Corominas and Silvia Vidal.

International Journal of Molecular Sciences. 2021, Apr 29;22(9):4719. Factor de impacto 5.924, Primer cuartil

Se analizó el fenotipo y función de monocitos con plaquetas unidas en sangre periférica de 49 pacientes con LES que no estaban tratados con glucocorticoides a dosis mayores de 10 mg/día. Se realizó el mismo análisis de forma simultánea en 16 individuos sanos. Se observó que un mayor porcentaje de monocitos intermediarios y no clásicos presentaban plaquetas unidas, tanto en pacientes con LES como en individuos sanos. Los monocitos con plaquetas unidas, tanto si estas estaban activadas o no, tenían mayor expresión de HLA-DR, CD86, CD54, CD16 y CD64 que los monocitos sin plaquetas unidas, tanto en pacientes con LES como en individuos sanos. Además, para los marcadores HLA-DR y CD54, la expresión en monocitos con plaquetas activadas era aún mayor que en los monocitos con plaquetas no activadas. En el estudio funcional, se encontró que los monocitos con plaquetas unidas tenían más capacidad de fagocitar bacterias *Escherichia coli*. Además, los monocitos con plaquetas unidas secretaban mayores cantidades de interleucina (IL)-10 que los monocitos sin plaquetas unidas, no habiendo diferencias en la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (*tumoral necrosis factor*, TNF- α). Todas estas diferencias entre monocitos con plaquetas unidas o monocitos sin plaquetas fueron comparables en pacientes con LES y en individuos sanos. Sin embargo, los pacientes con LES presentaron un mayor porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en las tres poblaciones de monocitos: clásicos, intermediarios y no clásicos. Además, los monocitos de pacientes con LES tenían una expresión reducida de la principal molécula de unión del monocito a la plaqueta: la glicoproteína ligando de la P-selectina (*P-selectin glycoprotein ligand-1*, PSGL-1), pero una expresión incrementada de CD40, molécula que también participa en la unión a plaquetas. La expresión de PSGL-1 se asoció de manera inversa al porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en pacientes con LES, pero no en individuos sanos. Esta asociación no se encontró con CD40. Finalmente, se observó que aquellos pacientes con anticuerpos anti-dsDNA, consumo de complemento, hematuria y mayor ratio albúmina/creatinina tenían un menor porcentaje de monocitos con plaquetas unidas. En resumen, tanto en LES como en individuos sanos, los monocitos con plaquetas unidas son

distintos a los que no llevan plaquetas a nivel de fenotipo y capacidad funcional. Sin embargo, en LES hay un incremento en la unión de plaquetas a monocitos, y esta se relaciona a una menor actividad de la enfermedad.

ARTÍCULO 2- Increase of Circulating Monocyte–Platelet Conjugates in Rheumatoid Arthritis Responders to IL-6 Blockage

Anaís Mariscal, Carlos Zamora, César Díaz-Torné, M^a Àngels Ortiz, Juan José de Agustín, Delia Reina, Paula Estrada, Patricia Moya, Héctor Corominas and Sílvia Vidal

International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23(10), 5748. Factor de impacto 5.924, Primer cuartil

Se estudió el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas y la expresión de PSGL-1 en monocitos en sangre periférica de 35 pacientes con AR candidatos a recibir tratamiento con tocilizumab. El estudio se realizó en muestras previas a la infusión de la primera dosis de tocilizumab y a las 4 y 12 semanas, antes de la infusión de la segunda y tercera dosis. También se analizaron 15 muestras de individuos sanos. Previo al tratamiento con tocilizumab, se observó que los pacientes con AR tenían un mayor porcentaje de monocitos con plaquetas unidas y una menor expresión de PSGL-1 en los monocitos. Estos dos parámetros se asociaron entre sí inversamente en pacientes con AR, pero directamente en individuos sanos. El porcentaje de monocitos con plaquetas unidas se asoció además inversamente con la velocidad de sedimentación globular (VSG) y la proteína C reactiva (PCR). En cambio, el nivel de expresión de PSGL-1 en los monocitos se asoció a la afectación articular y al grado de malestar del paciente. Tras el tratamiento con tocilizumab se encontró que el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas se incrementó a las 4 semanas, mientras que el nivel de expresión de PSGL-1 en los monocitos disminuyó. Al segregar los pacientes en función de si alcanzaron la remisión o no a las 12 semanas, se observó que el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas se incrementó en aquellos pacientes que alcanzaron la remisión, no cambiando o disminuyendo en los que no la alcanzaron. El incremento en el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas se asoció con la disminución de la actividad clínica de los pacientes, de la VSG y del número de articulaciones inflamadas. Además, aquellos pacientes que antes de comenzar el tratamiento tenían un porcentaje de monocitos con plaquetas

unidas más bajo respondieron al tocilizumab en una mayor proporción que aquellos con porcentajes de monocitos con plaquetas unidas más altos. En los estudios in vitro se observó que la IL-6 incrementaba el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas, y el tratamiento con tocilizumab previno este efecto. Por lo tanto, en AR, el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas se asocia inversamente al grado de inflamación y se modifica tras el tratamiento con tocilizumab.

2. INTRODUCCIÓN

1.2. GENERALIDADES DE LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

Las EAI son aquellas que presentan un síndrome clínico debido a una respuesta inmune aberrante, tanto celular como humoral, frente a antígenos propios¹. Esta definición ha dirigido la atención durante muchos años hacia las células T y las células B. Sin embargo, en las últimas décadas se ha inclinado esta atención hacia la respuesta inmune innata, lo que ha llevado a descubrir que ésta es también un elemento clave en la patogénesis de las EAI. Este hecho no es sorprendente ya que, para mantener la homeostasis, ambos brazos del sistema inmunitario, el adaptativo y el innato, deben trabajar en conjunto y en equilibrio. La respuesta inmune innata participa en la rotura de tolerancia que lleva a la autoinmunidad, además de provocar daño tisular, ya sea directamente o de forma indirecta al guiar la respuesta aberrante de la inmunidad adaptativa².

Las EAI engloban enfermedades individualmente raras (excluyendo la AR y la tiroiditis autoinmune), pero que en conjunto alcanzan una prevalencia del 12% a nivel global. Esta prevalencia se ha incrementado en los últimos tiempos, debido al aumento en la incidencia, pero también a la reducción de la mortalidad³.

Se han identificado varios factores de riesgo que predisponen al desarrollo de EAI. Entre ellos, los factores genéticos determinan el grado de susceptibilidad a padecer una EAI. En este sentido, las EAI son poligénicas, con múltiples genes de susceptibilidad que actúan en concierto para provocar el fenotipo patológico. Sin embargo, algunos genes confieren mucho más riesgo que otros. Este es el caso de los genes que codifican para los antígenos leucocitarios humanos (*human leukocyte antigen*, HLA). La mayoría de las EAI están ligadas a una molécula particular de HLA, pero no son las únicas, hay otras variantes genéticas que predisponen o incluso son responsables directamente del desarrollo de una EAI, como es el caso de la ganancia de función en *Toll-like receptor 7* (TLR7) o el déficit hereditario de C1q y el desarrollo de LES^{4,5}. Sin embargo, aun en individuos con genes de susceptibilidad, son necesarios eventos que rompan la tolerancia, en otras palabras, eventos desencadenantes de autoinmunidad. Éstos son por lo general factores ambientales, principalmente agentes infecciosos, pero también factores endógenos, como son los niveles hormonales. De hecho, las EAI son mucho más frecuentes en sexo femenino y edad fértil. Una vez se rompe la tolerancia, las EAI progresan hacia la cronicidad, acompañadas de un incremento en el número de

autoantígenos a los que el sistema inmune reconoce, fenómeno que se conoce como propagación del epítipo (*epitope spreading*)⁶.

Desde un punto de vista clínico, las EAI se clasifican en sistémicas, cuando afectan a varios órganos u órgano-específicas, cuando la afectación se restringe a un órgano principalmente⁷. Sin embargo, desde un punto de vista fisiopatológico, no siempre está claro si la enfermedad es estrictamente autoinmune o si es una enfermedad autoinflamatoria⁸. La EAI prototípica se caracteriza por la rotura de tolerancia, el reconocimiento de antígenos propios por linfocitos T y B seguido por la producción de autoanticuerpos específicos y el daño de múltiples órganos debido a la desregulación de la inmunidad adaptativa⁹. Las enfermedades autoinflamatorias no están dirigidas por antígenos específicos; tienen inflamación sistémica y crónica sin haberse roto la tolerancia y sin la generación de autoanticuerpos específicos¹⁰. Estas dos definiciones son los extremos de un espectro en el que se sitúan enfermedades que presentan rasgos de uno y otro grupo en mayor o menor grado. Del mismo modo, las enfermedades autoinmunes se mueven también dentro de un espectro de participación del sistema inmune adaptativo e innato (**Figura 1**). En esta tesis, las dos EAI que se estudian pertenecen al grupo de EAI sistémicas que se encuentran en dos situaciones dentro de este espectro: el LES se describe como puramente autoinmune y la AR, con un patrón mixto autoinmune-inflamatorio.

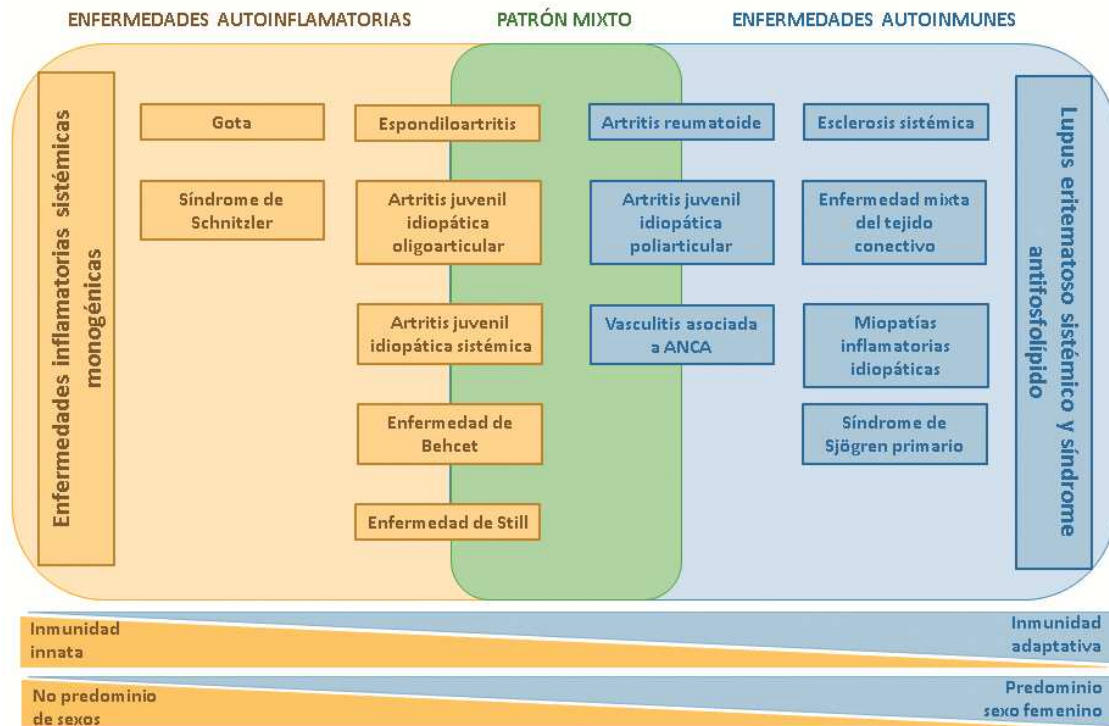


Figura 1. Espectro de enfermedades autoinflamatorias, mixtas y autoinmunes. El prototipo de enfermedad autoinflamatoria clásica lo comprende un grupo de enfermedades autoinflamatorias sistémicas monogénicas (amarillo). Los prototipos de enfermedad autoinmune clásica son el lupus eritematoso sistémico y el síndrome antifosfolípido (azul). Las enfermedades en el centro del espectro podrían considerarse enfermedades reumáticas y musculoesqueléticas con patrón mixto (verde). Los triángulos horizontales de abajo representan el espectro de participación de la inmunidad innata y adaptativa, así como la dominancia de un sexo sobre otro. (Adaptada de *Scekanecz et al, Nat Rev Rheumatol, 2021*)¹¹.

1.2.1. LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

El LES se trata de una EAI crónica con afectación multisistémica variable y un curso clínico impredecible de recaídas y remisiones. Afecta de forma predominante a mujeres entre 15 y 50 años, con una edad de aparición temprana, produciéndose un impacto significativo en la calidad de vida. La prevalencia se encuentra entre 50-100 casos por 100,000 habitantes en el norte de Europa y 250-5000 casos por 100,000 en raza negra. En los últimos años, la prevalencia parece ir en aumento a medida que se establece un diagnóstico de forma más precoz y que la supervivencia aumenta. Actualmente la tasa de supervivencia a 10 años es del 80%. Sin embargo, aunque la supervivencia ha mejorado, ésta sigue siendo de 2 a 3 veces menor a la de la población general, siendo las causas más frecuentes de muerte la enfermedad renal, la enfermedad cardíaca y las infecciones¹². Además, son factores de peor pronóstico el

sexo masculino, la presencia de anticoagulante lúpico y la glomerulonefritis¹³. Por otro lado, los pacientes con LES presentan como morbilidades asociadas la enfermedad cardiovascular y el cáncer, lo que se relaciona con el estado de hiperinflamación crónica¹⁴.

Dado el amplio espectro de presentaciones clínicas que se encuentran en el LES, que van desde el rash y la artritis, a la anemia y trombocitopenia, serositis, nefritis, convulsiones y psicosis, se han establecido unos criterios de clasificación que permiten agrupar pacientes en grupos relativamente homogéneos.

- LES: se manifiesta como enfermedad sistémica. Es la más frecuente, y la más grave.
- LES cutáneo: o lupus eritematoso incompleto. Presenta solamente manifestaciones cutáneas. Dentro de este grupo se han descrito a su vez varios subgrupos:
 - agudo,
 - sub-agudo,
 - crónico
 - LES discoide.
 - paniculitis lúpica
 - LES hipertrófico
 - LES tímido
 - LES sabañón
 - bulloso¹⁵.

1.2.1.1. Fisiopatología

La patogénesis de esta enfermedad resulta de la interacción entre factores genéticos, epigenéticos, inmunoreguladores, étnicos, hormonales y ambientales¹⁶. Los estudios en gemelos monocigóticos muestran una concordancia de un 24%, por lo que los factores genéticos no explican por completo el desarrollo de la enfermedad¹⁷. Otros factores patogénicos importantes pueden incluir la exposición a hormonas, como el estrógeno, la infección por virus de Epstein Barr y la exposición a la luz ultravioleta. La eliminación ineficiente de los restos celulares apoptóticos y el reconocimiento de autoantígenos son también eventos esenciales para desencadenar la enfermedad¹⁸. Todos estos procesos pueden actuar de manera sinérgica para romper la tolerancia, lo que lleva al desarrollo de

autoanticuerpos y al depósito de inmunocomplejos, principales impulsores del daño orgánico y las manifestaciones clínicas.

La fuente de autoantígenos capaz de estimular esta respuesta inmune son los cuerpos apoptóticos, que en los pacientes con LES no son eliminados de manera eficiente por las células del sistema mononuclear fagocítico (principalmente monocitos y macrófagos). La eliminación de células y cuerpos apoptóticos, proceso conocido como eferocitosis, se encuentra alterado en LES tanto por defectos intrínsecos en las células fagocíticas como por defectos en moléculas facilitadoras, como son algunos factores del complemento¹⁹. De hecho, la implicación del complemento en la fisiopatología del LES se pone de manifiesto por la observación de que el déficit genético de factores del complemento (C1q, C2 y/o C4) constituye un importante factor de riesgo para el desarrollo del LES, principalmente el déficit de C1q²⁰. El déficit de C1q, ya sea genético o adquirido (por la presencia de autoanticuerpos), acrecienta aún más el problema del aclaramiento de restos apoptóticos y de inmunocomplejos, lo que incrementa la disponibilidad de fragmentos celulares que contienen DNA²¹⁻²³. La formación de inmunocomplejos de ácidos nucleicos u otro material nuclear puede conducir a la presentación de antígenos propios y la secreción de interferones (IFN) de tipo 1 y 2 por parte de las células dendríticas (*dendritic cells*, DC)^{24,25}. El C1q desempeña otro papel protector, que es dirigir los inmunocomplejos a los monocitos en lugar de a las células dendríticas productoras de IFN²⁶.

Tras la rotura de la tolerancia, el proceso autoinmune se desencadena y perpetua por la expansión de células autorreactivas preexistentes²⁷. Esto ocurre porque la presencia permanente de autoantígenos constituye un estímulo constante y un elemento de presión selectiva para las células B que expresan en superficie y secretan inmunoglobulinas con alta afinidad para este antígeno. Sin embargo, para que se de esta selección dirigida por antígeno en las células B, es necesaria la coestimulación por células T, además de por el propio antígeno. Esta función la llevan a cabo una población específica de células T: las colaboradoras foliculares (*T follicular helper cells*, T_{FH})²⁸. Estas células no sólo juegan un papel en la coestimulación de células B, sino que también son capaces de activar a las células presentadoras de antígeno (*antigen-presenting cell*, APC)¹⁶. La co-estimulación por las células T ocurre de manera más importante por contacto directo, pero también involucra secreción de citocinas (IL-21 y el factor activador de células B o *B cell activating factor*, BAFF)^{29,30}. Esta coestimulación induce la división de las células B y el cambio de isotipo de IgM a IgG²⁹. Además, promueve el cambio en la secuencia molecular de los anticuerpos secretados,

proceso conocido como maduración de afinidad³⁰. Por tanto, es la colaboración de las células T la que hace posible la producción de anticuerpos IgG de alta afinidad, estrechamente relacionados con el daño tisular en el LES³¹⁻³³. Por su parte, las células B, además de producir anticuerpos, contribuyen a la fisiopatología del LES al secretar citocinas y mediante la presentación antigénica a las células T^{34,35}. Además, tanto células B como T son también capaces de infiltrarse en los tejidos y promover la inflamación local¹⁶.

Los autoanticuerpos han sido considerados clásicamente como los mediadores esenciales de la patología del LES, particularmente cuando forman inmunocomplejos. Virtualmente todos los pacientes con LES son positivos para anticuerpos antinucleares (*antinuclear antibodies*, ANAs), y estos autoanticuerpos pueden clasificarse en función a la diana que reconozcan. En LES se reconocen principalmente: DNA y proteínas de unión al DNA, que normalmente se agregan con histonas para formar los nucleosomas; RNA y proteínas de unión a RNA (como la proteína Smith), que se agregan en partículas ribonucleoproteicas citoplasmáticas o nucleares; β 2-glicoproteína 1, en asociación a fosfolípidos; proteínas de la membrana celular, típicamente aquellas que se expresan en glóbulos rojos³⁶. De entre ellos, los anti-dsDNA y anti-Smith (anti-Sm) son los más específicos de LES. Los títulos de anti-dsDNA correlacionan con la actividad clínica y son usados como marcador de seguimiento. Estos autoanticuerpos son inicialmente de la clase IgM (algunos de ellos son incluso protectores al reaccionar con células apoptóticas e inhibir la activación de TLRs); es el cambio de clase a IgG o IgA en colaboración con las células T autorreactivas lo que marca el paso a una respuesta inmune alterada, contribuyendo a la patogénesis del LES^{37,38}. Los anticuerpos IgG tienen mayor capacidad de acceder a espacios extravasculares que los anticuerpos IgM, lo que explica el daño en tejidos³⁷. Estos autoanticuerpos se unen a su antígeno diana, formando inmunocomplejos que se depositarán en los tejidos²⁰. Una vez depositados, los inmunocomplejos unirán complemento, se producirá el reclutamiento de células mieloides y la liberación de enzimas de los gránulos de los neutrófilos y de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) por parte de los monocitos y macrófagos, lo que genera el daño orgánico^{39,40}. Por tanto, la deposición de inmunocomplejos no es suficiente para provocar el daño, sino que son necesarios los mecanismos efectores de la inmunidad innata. Además, en los últimos años, con el descubrimiento de que los inmunocomplejos de ácidos nucleicos pueden inducir directamente señalización celular y transcripción de genes tras reconocerse vía TLRs, se ha definido un papel patogénico adicional a los autoanticuerpos como inmunomoduladores⁴¹.

Por tanto, el LES está causado por una reacción autoinmune en la que el sistema inmune innato y adaptativo dirigen una respuesta inapropiada contra fragmentos celulares que contienen ácidos nucleicos. Ambos, sistema inmune innato y adaptativo, participan tanto en los eventos que conducen a la rotura de la tolerancia como al daño tisular (**Figura 2**). Las manifestaciones clínicas son, por consiguiente, un reflejo del daño tisular provocado por la activación inmune y la consecuente inflamación, junto a los mecanismos de reparación exagerados o aberrantes.

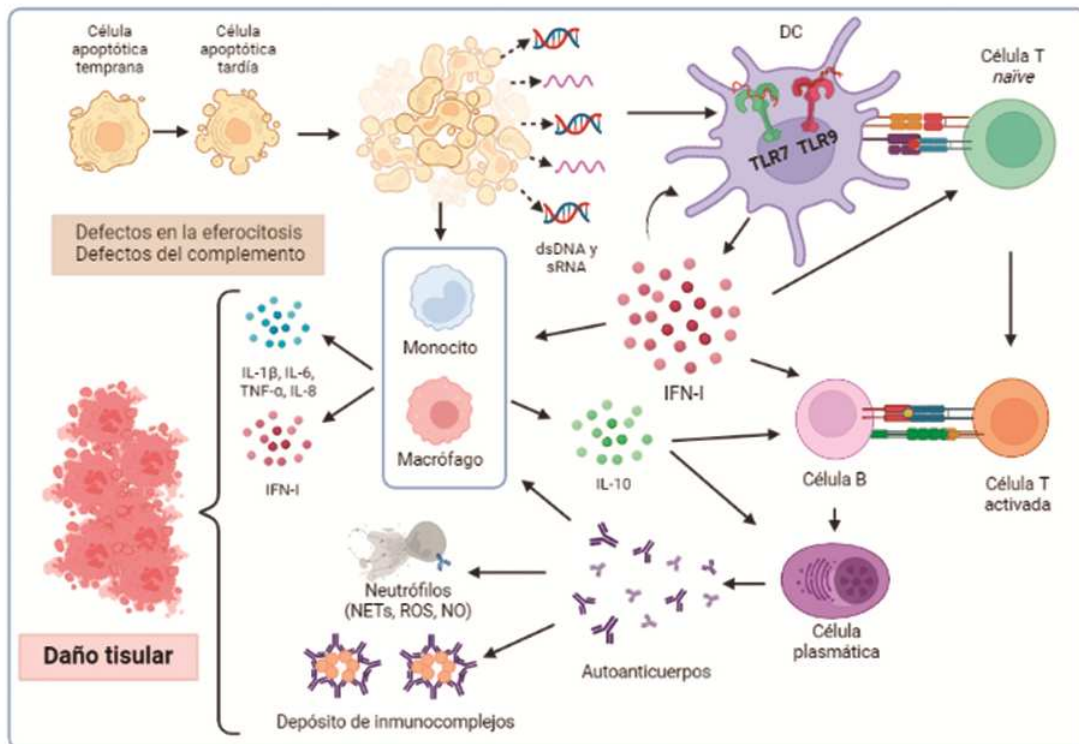


Figura 2. Fisiopatología del lupus eritematoso sistémico (LES). La falta de aclaramiento de células apoptóticas conduce a la liberación de material intracelular. Este es reconocido por células dendríticas (DC), monocitos, macrófagos y linfocitos B, lo que desencadena en última instancia la síntesis de autoanticuerpos y el daño tisular. *NETs*, *neutrophil extracellular traps*; *ROS*, *reactive oxygen species*; *NO*, *nitric oxid*. (Creada con Biorender.com).

1.2.1.2. Diagnóstico, tratamiento y monitorización

La presentación inicial del LES mimetiza con un síndrome viral: síntomas constitucionales como pérdida de peso, fatiga y febrícula, frecuentemente acompañados por artralgias o artritis. Cuando estos síntomas constitucionales con artralgias o artritis no se acompañan por otras manifestaciones características del LES, como el rash fotosensible en cara, cuello o

extremidades, se debe realizar una evaluación clínica y de laboratorio para descartar una infección antes de establecer el diagnóstico de LES¹⁵. Estas manifestaciones cutáneas son muy comunes, ocurriendo en el 75-80% de pacientes⁴². Aunque la fiebre, rash y artritis son los síntomas iniciales clásicos, también es frecuente una aparición de la enfermedad abrupta con afectación orgánica, particularmente en raza hispana (61%)⁴³.

El diagnóstico de LES debe considerarse cuando el paciente, particularmente si se trata de una mujer en edad fértil, presenta hallazgos hematológicos (citopenias), renales (hematuria, proteinuria o creatinina sérica elevada), síntomas respiratorios (tos, disnea, hemoptisis o dolor pleural) o signos del sistema nervioso central (dolor de cabeza, fotofobia o déficits neurológicos focales). Sin embargo, dado que el LES es una enfermedad multiorgánica que puede mimetizar enfermedades infecciosas, cáncer u otras EAI, el colegio americano de reumatología (*American College of Rheumatology, ACR*) estableció en 1982 unos criterios para la clasificación de los pacientes con LES, revisados en 1997^{44,45}. Para mejorar la relevancia clínica de estos criterios e incorporar los avances que se han hecho en el conocimiento de las bases inmunológicas de la enfermedad, en 2012 el grupo internacional de clínicos colaboradores en lupus eritematoso (*Systemic Lupus International Collaborating Clinics, SLICC*) revisa estos criterios y los valida enfatizando la necesidad de cumplir un criterio inmunológico para diagnosticar a un paciente con LES⁴⁴. Estos criterios facilitan un abordaje sistemático del diagnóstico al basarse en las manifestaciones clínicas y de laboratorio más frecuentes, constituyendo una herramienta muy sensible y específica para el diagnóstico de LES. Sin embargo, puede perderse el diagnóstico de pacientes con enfermedad moderada. Por ello, en la actualidad se recomienda el uso de los criterios de la ACR actualizados en colaboración con la guía de la liga europea contra el reumatismo (*European League Against Rheumatism, EULAR*)⁴⁶. Estos mantienen la necesidad de demostrar la implicación inmunológica, imponiendo como requisito de entrada la presencia de ANAs positivos. Cumpliendo esto, el diagnóstico de LES puede establecerse si se cumple al menos un criterio clínico y se obtiene al menos una puntuación de 10⁴⁶. Se incluyen 10 dominios (3 inmunológicos (presencia de anticuerpos antifosfolípidos, consumo de complemento y anticuerpos específicos de LES) y 7 clínicos (constitucional, hematológico, neuropsiquiátrico, mucocutáneo, seroso, musculoesquelético y renal) con 22 criterios, cada uno de ellos con un valor que puede variar entre 2 y 10⁴⁶. Los criterios EULAR/ACR de 2019 presentan mayor sensibilidad y especificidad que los criterios ACR-1997 y SLICC-2012, y añaden un nivel de complejidad al diagnóstico de LES; por este motivo, su aplicación se encuentra más limitada a ensayos clínicos o casos

complicados. Así, actualmente se combinan los criterios ACR y criterios EULAR/ACR para el diagnóstico del LES¹⁵.

Por tanto, el LES se diagnostica y clasifica basándose en los signos y síntomas clínicos del paciente, junto a biomarcadores de laboratorio que reflejan reactividad inmunológica e inflamación en varios órganos.

El tratamiento para el LES incluye antiinflamatorios no esteroideos, antimaláricos, glucocorticoides, inmunosupresores (incluyendo ciclofosfamida, azatriopina, metotrexate y micofenolato mofetil) y biológicos dirigidos contra células B¹⁵. El medicamento de elección está influido por la severidad de la enfermedad y la función del órgano u órganos afectados, así como por si el paciente está estable o en brote⁴⁷.

La monitorización del tratamiento se lleva a cabo en las visitas de seguimiento junto a una serie de pruebas de laboratorio que incluyen hemograma, estudio bioquímico básico y análisis de orina. Muchos clínicos incluyen la cuantificación de anti-dsDNA y los factores del complemento C3 y C4. Los valores disminuidos de C3 y C4 pueden preceder un brote, y correlacionan con la actividad de la enfermedad, especialmente en LES con brotes renales o hematológicos^{48,49}. Se deben tener también en cuenta otros parámetros de monitorización para manifestaciones clínicas particulares¹⁵. Con el fin de estandarizar los parámetros de seguimiento y contar con una herramienta para medir la actividad de la enfermedad, se desarrolló y validó un índice de actividad para el LES (*SLE Disease Activity Index*, SLEDAI) (**Tabla 1**)⁵⁰. Aunque el SLEDAI es una herramienta muy extendida en la práctica diaria, el LES es una enfermedad con un espectro muy amplio de presentaciones clínicas, por lo que es difícil tener un índice de seguimiento que sea de utilidad para todos los fenotipos clínicos. Por ello, en la práctica hay otros parámetros que se emplean adicionalmente al SLEDAI para monitorizar la enfermedad. En un subgrupo de pacientes (principalmente aquellos con serositis y/o artritis) podemos encontrar aumentados parámetros inflamatorios, como la VSG y la PCR. En estos pacientes es útil la determinación de estos parámetros en paralelo al índice SLEDAI para monitorizar la actividad de la enfermedad^{49,51}. Por otro lado, en los pacientes con nefritis lúpica es de utilidad la cuantificación de anticuerpos anti-C1q como predictor de crisis renales^{49,51}.

Tabla 1. Índice de actividad del lupus eritematoso sistémico (SLEDAI). Este índice utiliza 16 parámetros clínicos y 8 medidas de laboratorio (Adaptada de *Bombardier et al, Arthritis Rheum, 1992*).

Puntuación	Descriptor	Puntuación	Descriptor
8	Convulsiones	4	Piuria
8	Psicosis	2	Exantema nuevo
8	Síndrome orgánico-cerebral	2	Alopecia
8	Alteraciones visuales	2	Úlceras bucales
8	Alteraciones en pares craneales	2	Pleuritis
8	Cefalea lúpica	2	Pericarditis
8	Vasculitis	2	Complemento
4	Miositis	2	Anti-DNA
4	Artritis	1	Fiebre
4	Cilindros urinarios	1	Trombopenia
4	Hematuria	1	Leucopenia
4	Proteinuria		

Nota: puntúa en la escala SLEDAI si el descriptor está presente en el día de la visita o 10 días antes.

1.2.2. ARTRITIS REUMATOIDE

La AR es una enfermedad autoinmune compleja, con inflamación local y sistémica. Clínicamente se define como una poliartritis simétrica y deformante. El debut de la enfermedad puede darse a cualquier edad, pero es más frecuente entre los 40 y los 60 años, y es entre dos y tres veces más frecuente en mujeres que en hombres⁵². La prevalencia de la AR se encuentra entre los 250-1,000 casos por cada 100,000 habitantes a nivel mundial^{53,54}. Inicialmente, los pacientes presentan dolor, hinchazón y rigidez en las pequeñas articulaciones de manos y pies de una forma simétrica. Se trata de una enfermedad que, si no está bien controlada, afecta en gran medida la calidad de vida de los pacientes, que sufren de erosión ósea, lo que ocasiona deformidad y pérdida de función de las extremidades^{55,56}. La principal afectación de la AR se da en el sistema musculoesquelético: articulaciones y tendones, músculos y huesos. No obstante, los pacientes a menudo presentan síntomas extra articulares a nivel de la piel, vasculares, neurológicos, hematológicos, pulmonares, cardíacos, renales, gastrointestinales y/u oculares⁵⁷. Las principales causas de mortalidad no atribuibles directamente a la propia enfermedad son infecciones, complicaciones respiratorias y cardiovasculares y cáncer⁵⁸. En conjunto, los pacientes con AR tienen una mortalidad del doble de la población general⁵⁹.

1.2.2.1. Fisiopatología

La AR es una enfermedad multifactorial, en la que interactúan factores endógenos y ambientales que afectan a la susceptibilidad de padecer la enfermedad, así como a su severidad. Entre los factores endógenos, se ha descrito una asociación importante a determinados genes, principalmente a los genes de HLA (en concreto al HLA-DRB1*04). El peso de la contribución genética en el desarrollo de AR se ha establecido en un 50-60%, siendo de tipo poligénica, dado que los estudios en gemelos monocigóticos muestran una concordancia de un 12-15%⁵². Esta contribución es de especial relevancia en los individuos seropositivos, bajando significativamente en los seronegativos. Por tanto, en individuos genéticamente susceptibles, hay factores propios (en mujeres es tres veces más frecuente que en hombres, principalmente en periodos de postparto) y ambientales (tabaco, exposición a sílice, obesidad) que desencadenan la activación patológica del sistema inmune, con la subsecuente cascada de eventos inflamatorios que se autoperpetúan⁶⁰.

La patogénesis de la AR típicamente ocurre en las articulaciones, concretamente en la sinovia, donde tienen lugar dos cambios patogénicos importantes que conducen a la erosión ósea y a la clínica articular:

- hiperplasia de las células residentes: hay una activación e incremento en número de sinoviocitos similares a macrófagos (*macrophage-like synoviocytes*, MLS) y sinoviocitos similares a fibroblastos (*fibroblast-like synoviocytes*, FLS), lo que provoca una expansión de la íntima. Los MLS son grandes productores de citocinas, entre las que se incluyen IL-1, IL-6 y TNF- α ⁶¹. Los FLS expresan también IL-6, pero además liberan grandes cantidades de metaloproteinasas de matriz (*matrix metalloproteinases*, MMPs) y pequeños mediadores como prostaglandinas y leucotrienos⁶². Además, participan en la activación de respuestas inmunológicas al promover la formación de estructuras linfoides ectópicas en la sinovia⁶³.
- la infiltración de células inmunológicas en la sinovia, lo que conduce a la formación del “pannus” en la interfaz cartílago-hueso⁶⁴. Este “pannus” está compuesto por macrófagos, FLS, DCs, mastocitos, células plasmáticas y células T, que median el daño y la erosión en etapas más tardías de la enfermedad⁶⁴. Además, las células T pueden formar centros germinales ectópicos, donde las células B maduras pueden proliferar, diferenciarse y producir anticuerpos⁶¹. Estos centros sinoviales recuerdan a los nódulos

reumatoideos que se encuentran a menudo fuera de la sinovia, y que son un signo de progresión extraarticular de la AR⁶⁵.

Las células T juegan un papel importante en el desarrollo de la AR. Las subpoblaciones más implicadas son las células T colaboradoras 1 (*T helper 1*, Th1), Th17, T reguladoras (Treg), T_{FH} y T citotóxicas. En la sinovia articular, las Th1 producen citocinas proinflamatorias, principalmente IFN- γ , lo que induce la activación de macrófagos, mientras que las Th17 pueden causar daño directo mediante la síntesis de citocinas⁶⁶⁻⁶⁹. Hay dos tipos de células Th17: las patogénicas o proinflamatorias, productoras de IL-17A, IL-17F e IL-22 y las no patogénicas, que secretan factores inmunosupresores, como la IL-10⁷⁰. La IL-17 e IL-22 a su vez inducen la secreción de otras citocinas proinflamatorias como el TNF- α , IL-1 β e IL-6 por los sinoviocitos, fibroblastos, monocitos, macrófagos y células óseas, además de otras quimiocinas que incrementan la inflamación al reclutar neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos a la membrana sinovial⁷¹⁻⁷³. Este ambiente proinflamatorio también induce la expansión de células Treg, pero éstas se vuelven poco funcionales, e incluso anérgicas⁶⁶. Por su parte, las T_{FH} autoreactivas coestimulan a las células B para que produzcan autoanticuerpos IgG de alta afinidad.

Las células B están implicadas en la patogénesis de la AR a través de varias funciones: producción de autoanticuerpos, presentación antigénica y secreción de citocinas^{74,75}. Se han descrito varios autoanticuerpos en AR: factor reumatoide (FR), anti-péptidos citrulinados (*anti-citrullinated protein antibodies*, ACPA), anti-vimentina citrulinada, anti-proteínas carbamiladas, anti-peptidil arginina deaminasa tipo IV (PAD-4) y anti-glicosilfolfatidilinositol (GPI)⁷⁶. Los autoanticuerpos son producidos por células plasmáticas derivadas de células B autorreactivas que han sido estimuladas por ligandos para TLRs, principalmente proteínas modificadas post-transcripcionalmente (péptidos citrulinados y carbamilados en su mayoría) y otros antígenos extraños^{77,78}. Estos autoanticuerpos, en su mayor parte ACPA y FR, pasarán a ser de la clase IgG de alta afinidad tras el cambio de clase y la maduración de la afinidad. Este cambio de clase ocurre en los centros germinales, gracias a la colaboración de las células T⁷⁹. Las células B ACPA positivas pasan por múltiples rondas de respuesta en los centros germinales, lo que conduce al cambio de clase y a un alto grado de hipermutación somática, hasta convertirse en células plasmáticas de vida larga⁸⁰. Por el contrario, las células B FR positivas pasan por varias rondas de respuesta en los centros germinales, lo que conlleva solo un modesto número de mutaciones somáticas y se convierten en células plasmáticas de vida corta que dan niveles fluctuantes de FR⁸⁰. Además, estas células pueden ser activadas por mecanismos de la

inmunidad innata, mientras que las células B ACPA positivas están más restringidas a la diferenciación T-dependiente⁸⁰. El FR es un anticuerpo que reconoce la fracción constante (Fc) de las IgG y, aunque son principalmente de la clase IgM, la actividad FR puede encontrarse también en las clases IgA e IgG⁸¹. El FR puede encontrarse en un amplio número de patologías, sin embargo, títulos altos de IgM e IgA son indicativos de AR^{82,83}. Los ACPA son reconocidos por células inmunológicas con receptores Fc, desencadenándose funciones efectoras (principalmente secreción de TNF- α y formación de trampas extracelulares (*neutrophil extracellular traps*; NETs), y también activan complemento⁸⁴. Además, se ha demostrado que los inmunocomplejos de ACPA son capaces de incrementar la eficacia del reconocimiento de autoantígenos al estimular de manera simultánea los receptores Fc y TLR en monocitos y macrófagos^{85,86}. Por tanto, el principal papel de los ACPA en la patogénesis de la RA es favorecer la rotura de la tolerancia y expandir la inflamación.

Los principales eventos inmunológicos que participan en la patogénesis de la AR se ilustran en la **Figura 3**.

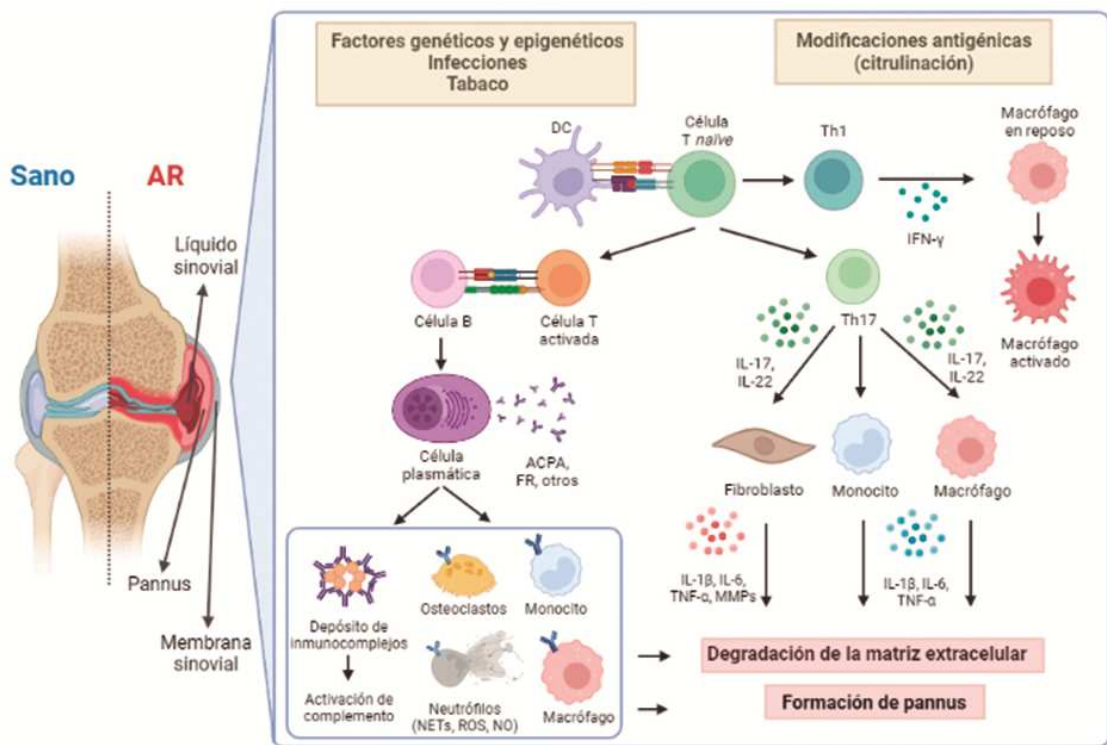


Figura 3. Fisiopatología de la artritis reumatoide. La acción de factores ambientales (tabaco) y propios (modificaciones post-traduccionales) en individuos genéticamente predispuestos provoca inflamación en la membrana sinovial, reconocimiento de antígenos propios y el reclutamiento de células del sistema inmune, lo que conlleva a la destrucción de cartílago y hueso. ACPA, *Anti-citrullinated protein antibodies*; FR, *factor reumatoide*; NETs, *neutrophil extracellular traps*; ROS, *reactive oxygen species*; NO, *nitric oxid*. (Creada con Biorender.com).

1.2.2.2. Diagnóstico, tratamiento y monitorización

La AR es una enfermedad reumática inflamatoria progresiva, en la que el diagnóstico y tratamiento precoz, así como el seguimiento estrecho son imperativos para prevenir el daño estructural y la discapacidad funcional. El diagnóstico se basa en los criterios de clasificación EULAR/ACR de 2010⁸⁷. Este es principalmente clínico, apoyado por los test serológicos: ACPA, FR y marcadores de inflamación (PCR y VSG) además de por datos radiográficos: erosión, osteopenia periarticular, hinchazón; ultrasonografía y, en algunos casos, imagen por resonancia magnética⁸⁸⁻⁹⁰. La presencia de autoanticuerpos marcan un fenotipo característico (AR seropositiva), con un curso clínico más severo y peor pronóstico^{91,92}. FR y ACPA son los más frecuentes (67% de las AR seropositivas), y pueden preceder la aparición de la sintomatología clínica^{91,92}. El FR fue el primer autoanticuerpo que se detectó en AR y que se incluyó en los criterios de clasificación de la AR de la ACR en 1987⁹³. Sin embargo, los ACPA son los que tienen un mayor valor pronóstico en los pacientes sintomáticos de reciente diagnóstico⁷⁶. Pueden estar presentes ya en la fase preclínica, años antes del desarrollo de la enfermedad⁹⁴. Los pacientes con ACPA y/o FR a títulos altos, así como aquellos con niveles de PCR elevados, tienen peor pronóstico que los pacientes seronegativos, ya que son predictores de enfermedad erosiva^{95,96}.

Las guías actuales para el manejo de la AR de nuevo diagnóstico tienen como objetivo alcanzar la baja actividad de la enfermedad. Existen varios índices para calcular la actividad de la AR: el índice basado en 28 articulaciones con 4 variables (*Disease activity score 28 joints*, DAS28-V4), que incluye un parámetro inflamatorio: VSG (DAS28-VSG) o PCR (DAS28-PCR), el número de articulaciones inflamadas (*swollen joint counts*, SJC) y tumefactas (*tender joint counts*, TJC) determinado en 28 articulaciones concretas además del estado de salud global según el paciente a partir de una escala analógica visual⁹⁷. Posteriormente se desarrolló un índice de actividad simplificado (*simplified disease activity index*, SDAI) que incluye el SJC y TJC de 28 articulaciones, la cuantificación de PCR, así como la evaluación del estado de salud global (*global activity*, GA) determinado por el paciente y por el evaluador de acuerdo a una escala analógica visual. Algunos estudios sugieren que los parámetros inflamatorios, como la VSG y la PCR no aportan valor a los otros cuatro parámetros cuando se determina el SDAI⁹⁸. Así, se define un índice aún más simplificado (*clinical disease activity index*, CDAI), en el que se omite la cuantificación de PCR. Los elementos de estos índices, así como sus fórmulas y valores de referencia para catalogar la enfermedad de alta, moderada, o baja actividad se incluyen en la **Tabla 2**⁹⁷.

Tabla 2. Cálculo e interpretación de los índices de actividad de la artritis reumatoide. (Adaptada de Futó et al, *Clin Rheumatol*, 2014).

Índice	Fórmula	Actividad			
		Alta	Moderada	Baja	Remisión
DAS28-VSG	$(0.56 \times \sqrt{\text{TJC}} + 0.28 \times \sqrt{\text{SJC}} + 0.7 \times \ln \text{VSG}) \times 1.08 + 0.16$	>5.1	≤5.1	≤3.2	≤2.6
SDAI	TJC + SJC + Paciente GA + Evaluador GA + PCR	>26	≤26	≤11	≤3.3
CDAI	TJC + SJC + Paciente GA + Evaluador GA	>22	≤22	≤10	≤2.8

*DAS28, Disease activity score 28 joints; SDAI, simplified disease activity index; CDAI, clinical disease activity index; TJC, tender joint counts; SJC, swollen joint counts; VSG, velocidad de sedimentación globular; GA, global activity.

El tratamiento de primera línea es la monoterapia con metotrexato oral, fármaco englobado dentro del grupo de los antirreumáticos modificadores de la enfermedad convencionales (*conventional disease-modifying anti-rheumatic drugs*, cDMARDs). El concepto de modificación de la enfermedad comprende una combinación de alivio de signos y síntomas; mejora o normalización de la función física, calidad de vida y capacidad social y laboral y, de forma más característica, la inhibición de la aparición o progresión del daño estructural al cartílago y al hueso. Este último distingue a los DMARDs de los meros agentes sintomáticos, como los fármacos antirreumáticos no esteroideos^{99,100}. En caso de no respuesta al metotrexato después de los 3-6 meses de su adherencia, se pasa al tratamiento de segunda línea. Este va a depender de:

- si el paciente no presenta factores de mal pronóstico (presencia de ACPA o FR a títulos altos, alta actividad de la enfermedad, daño articular precoz o fracaso de más de dos cDMARD) se cambia a otro cDMARD (hidroxicloroquina, sulfasalacina o leflunomida).
- si el paciente presenta factores de mal pronóstico la indicación es la incorporación al tratamiento de un DMARD biológico (bDMARD), o un DMARD dirigido (*target specific*, tsDMARD). Los bDMARD engloban a los inhibidores del TNF- α , de la coestimulación de células T, del receptor de la IL-6 o los anticuerpos anti-CD20. Los tsDMARD hacen referencia a los inhibidores de quinasas.

En caso de fracaso del bDMARD o tsDMARD aplicado como segunda línea se cambia a otro bDMARD o tsDMARD, siendo este el tratamiento de tercera línea^{99,100}.

1.3. RESPUESTA INMUNE INNATA EN LAS ENFERMEDADES AUTOINMUNES

La inmunidad innata (también llamada inmunidad natural o nativa) constituye la primera línea de defensa contra los microorganismos, tanto funcional como filogenéticamente. Consta de mecanismos preexistentes que pueden reaccionar con determinadas estructuras de microorganismos (patrones moleculares asociados a patógeno; *pathogen associated molecular patterns*; PAMPs) así como con productos de células propias dañadas (patrones moleculares asociados a daño; *damage associated molecular patterns*; DAMPs). Los principales componentes con los que cuenta la inmunidad innata para responder a las agresiones son:

1. barreras físicas y químicas: epitelios y sustancias químicas antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales. En los últimos años, se ha visto que los epitelios no son simples barreras físicas, sino que son capaces de detectar roturas, agresiones e incluso microorganismos, ya que las células epiteliales presentan receptores de reconocimiento de patrón (*pattern recognition receptors*; PRRs). Una vez detectado el daño, pueden secretar defensinas, así como reclutar células del sistema inmune, orquestando respuestas tisulares frente a una amenaza e iniciando una respuesta inflamatoria¹⁰¹.
2. componente celular:
 - a. células fagocíticas mononucleares (DCs, monocitos y macrófagos)
 - b. granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos)
 - c. mastocitos, células linfoides innatas;
3. proteínas circulantes: sistema del complemento y citocinas¹⁰².

La activación a través de los TLRs de células mieloides (monocitos, macrófagos, granulocitos...), células linfoides innatas (*innate-lymphoid cells*, ILCs) y células T gamma delta (T γ δ) induce la secreción de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-17, IFNs y TNF- α , contribuyendo a la fisiopatología de numerosas EAI, incluyendo LES y AR¹⁰³⁻¹⁰⁶.

Uno de los sellos de identidad de la inmunidad innata es que responde a agresiones repetidas de una forma prácticamente idéntica. Sin embargo, en los últimos años ha habido un cambio

de paradigma debido a la definición de inmunidad entrenada (“trained immunity”)¹⁰⁷. Esta describe que, de una manera similar a la memoria de la inmunidad adaptativa, las células de la inmunidad innata pueden ser preactivadas o tolerizadas. Sin embargo, a diferencia de la memoria adaptativa, esta inmunidad entrenada no ocurre por reordenamiento genético regulado ni mutación de genes somáticos, sino que involucra una reprogramación epigenética^{107,108}. Además, la memoria adaptativa es específica de antígeno, pero la respuesta de una célula inmune innata a un estímulo puede verse alterada por el “entrenamiento” previo de esa célula con un estímulo aparentemente no relacionado, lo que podría tener implicaciones en la pérdida de tolerancia y el desarrollo de autoinmunidad¹⁰⁷. Esta implicación se hace evidente en estudios de monocitos expuestos a DAMPs. Las células estresadas o dañadas en un ambiente de inflamación crónica liberan DAMPs, que se unen a receptores TLRs, como ocurre con la proteína de alta movilidad (*high mobility group box 1 protein*, HMGB1) en LES o las proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*) en AR^{109,110}. Los monocitos se preactivan hacia un perfil hiperinflamatorio cuando se exponen a bajas concentraciones de algunos DAMPs; sin embargo, se tolerizan cuando las concentraciones de DAMPs son altas¹¹¹. Este mecanismo podría ser importante en las primeras fases de una EAI “en ciernes”. Existen otros factores que incrementan esta preactivación hiperinflamatoria inducida por DAMPs (principalmente induciendo la expresión de IL-6) en los monocitos, como es la aldosterona, hormona asociada con la hipertensión, y que se ha relacionado con EAI¹¹²⁻¹¹⁵. La inmunidad entrenada podría por tanto contribuir a la correlación epidemiológica que existe entre factores ambientales (infecciones, xenobióticos, dieta) y autoinmunidad^{116,117}. Son ejemplos de esta correlación la exposición a agentes exógenos, como mercurio o sílice, que se relacionan con la aparición de LES y el humo del tabaco, que contiene miles de agentes xenobióticos y está ligado a la patogénesis de la AR¹¹⁸⁻¹²⁰.

En la patofisiología del LES, el papel central lo llevan los inmunocomplejos. Estos se forman en grandes cantidades por anticuerpos antinucleares unidos al abundante material nuclear presente en sangre y tejidos. Los inmunocomplejos no son eliminados adecuadamente debido al déficit numérico y funcional de receptores para la fracción constante de las inmunoglobulinas (FcR) así como de receptores para el complemento, depositándose en los tejidos. Una vez depositados, los inmunocomplejos activan la respuesta inmune innata mediante la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, la activación de la vía clásica del complemento y mediante la unión a FcR, lo que desencadena la inflamación¹²¹. De hecho, la mayoría de rasgos clínicos en el LES son inflamatorios (las afectaciones renal, musculoesquelética, serosas y mucocutáneas)¹²². Sin embargo, se ha demostrado que la

sobreproducción de autoanticuerpos se atribuye a una fagocitosis ineficiente de los restos celulares y células apoptóticas^{19,123,124}. Por tanto, la inmunidad innata en esta enfermedad juega un papel importante no sólo en los procesos inflamatorios, sino en la generación de los estímulos que llevan a la pérdida de la tolerancia y la generación de autoinmunidad.

Por otro lado, la AR es una enfermedad que se caracteriza por una inflamación articular persistente conducida por sinoviocitos, así como por el tráfico de neutrófilos, monocitos y linfocitos T y B en el líquido sinovial. La inflamación mantenida provoca la hipertrofia de la membrana sinovial, resultando un tejido anómalo que se conoce como “pannus”. Las células del “pannus” producen citocinas, quimiocinas y MMP que contribuyen a la destrucción progresiva de hueso y cartílago¹²⁵. En las últimas décadas se ha demostrado el papel de la respuesta inmune innata en el inicio y progresión de la AR. La activación del sistema inmune innato en la sinovia de una AR temprana es un mecanismo clave que inicia la inflamación. Diferentes células de la inmunidad innata, entre las que se incluyen monocitos, macrófagos y DCs, están involucradas en iniciar la respuesta inflamatoria por su capacidad fagocítica, presentadora de antígeno y secretora de citocinas¹²⁶. Estas células inducen además la activación del sistema inmune adaptativo, que desempeña un papel importante en estadios más tardíos de la enfermedad¹²⁷.

1.3.1. Respuesta celular

El inicio de la respuesta efectora celular se produce tras la activación de PRRs. Las células del sistema inmune innato expresan TLRs, un tipo de PRR, que reconocen diferentes PAMPs, entre ellos ácidos nucleicos provenientes de virus y bacterias, pero también pueden reconocer ácidos nucleicos propios derivados de células apoptóticas, un tipo de DAMP. Por tanto, pueden contribuir al desarrollo de respuestas autoinmunes contra antígenos nucleares¹²⁸.

En el LES, la presencia de DAMPs es consecuencia de defectos en la apoptosis, así como defectos en la eliminación de células apoptóticas. Ello conlleva a la liberación de contenido intracelular, incrementando la probabilidad de que el sistema inmune detecte autoantígenos¹²⁹⁻¹³¹. En condiciones normales, las células fagocíticas localizan células apoptóticas tempranas directamente a través de receptores o indirectamente por la opsonización mediante factores séricos, y las fagocitan. Este proceso, la fagocitosis, previene la acumulación de detritos celulares. Si los restos apoptóticos tempranos no son eliminados

por el sistema inmune, se convierten en restos necróticos, liberándose autoantígenos intracelulares¹⁹. La eliminación de células apoptóticas tempranas es un proceso inmunológicamente silente o antiinflamatorio, mientras que la eliminación de restos necróticos, que contienen DAMPs, se acompaña de inflamación y puede desencadenar en rotura de tolerancia y desarrollo de autoinmunidad^{132,133}. Así, la eliminación de complejos de ácidos nucleicos y nucleoproteínas derivados de células necróticas por las células fagocíticas inicia vías de señalización intracelulares que contribuyen a la proliferación celular, producción de citocinas y expresión de moléculas co-estimuladoras^{134,135}. Además, el reconocimiento de DAMPs por parte de los TLRs desencadena en las APC el procesamiento y presentación de estos complejos fagocitados a través de las moléculas de HLA de clase I y II a las células T. Subsecuentemente, se generan células T y B autorreactivas, lo que resulta en la producción de autoanticuerpos¹²⁴.

1.3.1.1. Células dendríticas

Las DCs son las principales centinelas en los tejidos. Fagocitan microbios y pueden desempeñar funciones importantes en las respuestas innatas a las infecciones y en la alianza entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Las DCs se dividen en dos tipos: convencionales (cDCs) y plasmacitoides (pDCs). Las primeras, que a su vez pueden subclasificarse en cDC1 y cDC2 son de origen mieloide, y presentan antígenos intracelulares o extracelulares a las células T CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente. Las pDCs no tienen un origen tan claramente establecido, y son capaces de producir grandes cantidades de IFN de tipo I tras la estimulación de sus TLR7 y 9 al reconocer ácidos nucleicos^{136,137}.

En el contexto del LES, el papel de los TLR7 y 9 es más importante que el de otros TLRs, ya que reconocen ácidos nucleicos propios derivados de células necróticas. Su activación en las pDCs conduce a la secreción de IFN- α , citocina esencial en la patogénesis del LES¹³⁸. Esta producción contribuye a disminuir el umbral de activación del receptor de células B, incrementando la autorreactividad y promoviendo la producción de autoanticuerpos^{139,140}. El IFN- α , junto al ligando de CD40 (CD40L) y los inmunocomplejos de DNA provocan la activación y diferenciación de más DCs y estimulan la producción de citocinas, por lo que el sistema se retroalimenta¹⁴¹⁻¹⁴³. Por otro lado, las cDCs son capaces de inducir la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ *naive* y memoria en células T_{FH}, capaces de estimular células B y de suprimir a

los linfocitos Treg^{144,145}. Las cDCs pueden también guiar la diferenciación de plasmablastos IgA e IgG y contribuir a la formación de estructuras linfoides ectópicas¹⁴⁶. Por tanto, las DCs no solo juegan un papel esencial en la rotura de tolerancia y el desarrollo de autoinmunidad sino también en la expansión y diferenciación de las células T¹⁴⁷.

En la AR, las DCs adquieren más importancia en la amplificación local del proceso autoinmune que en la rotura inicial de la tolerancia, ya que son las células B las principales responsables de la pérdida de tolerancia inicial¹⁴⁷. En la AR además adquiere más importancia el TLR4 sobre los TLR7 y 9^{148,149}. El TLR4 reconoce principalmente lipopolisacárido bacteriano, pero también otros ligandos microbianos y endógenos, incluyendo moléculas de la matriz extracelular¹⁵⁰. Las cDCs activadas por los ligandos de TLR, y dirigidas a un perfil inmunogénico por la acumulación de DAMPs, migran a los linfonodos, donde presentan antígenos a las células T, que migrarán a la sinovia inflamada. Las pDCs se encuentran en el líquido sinovial y producen citocinas: IFN- α , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, pero también factores de diferenciación: factor estimulador de colonias de macrófagos y factor de crecimiento de fibroblastos, que contribuyen a la patogénesis de la AR^{126,151}.

1.3.1.2. Neutrófilos

Los neutrófilos, también llamados polimorfonucleares, son la población más abundante de leucocitos circulantes (llegando a constituir hasta un 70%) y median las primeras fases de las reacciones inflamatorias. Contienen gránulos de dos tipos en su citoplasma: los gránulos específicos (mayoritarios), con enzimas como la lisozima, colagenasa y elastasa; el resto de gránulos, llamados azurófilos, son lisosomas que contienen enzimas y otras sustancias microbicidas. Un adulto produce más de 10^{11} neutrófilos al día que circularán en la sangre durante unas 6-8 horas, con un fenotipo sujeto al ritmo circadiano. Si durante este tiempo no son reclutados a una zona de inflamación, sufren apoptosis y son fagocitados por los macrófagos residentes en el hígado o el bazo¹⁰². Si son reclutados, los neutrófilos actúan en el tejido inflamado, donde sobreviven más tiempo gracias a las condiciones de hipoxia y la presencia de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento¹⁵².

Tanto ante una infección como en una EAI, los neutrófilos son las primeras y principales células que se reclutan, expandiendo aún más la inflamación. Una vez han llegado al tejido inflamado,

los DAMPs, así como inmunocomplejos y mediadores inflamatorios los activan para que ejerzan sus funciones: desgranulación, fagocitosis, producción de ROS y NETs¹⁵³.

Los neutrófilos, activados por el microambiente inflamatorio, secretan más factores proinflamatorios, retroalimentando positivamente el sistema y causando inflamación persistente¹⁵⁴. Sin embargo, es la formación de NETs la que adquiere más relevancia en el desarrollo de autoinmunidad. En ellas se atrapan y exponen autoantígenos, incluyendo cromatina, dsDNA, relevantes en el desarrollo de LES y proteínas de histonas citrulinadas, relevantes en el desarrollo de AR^{155,156}. Además, en el contexto de LES, las NETs no son eliminadas de manera eficiente, de nuevo debido a los defectos intrínsecos en la fagocitosis, constituyendo un estímulo vía TLR9 para las pDC, que producirán IFN- α ¹⁵⁷.

1.3.1.3. Monocitos

Los monocitos constituyen alrededor del 10% de los leucocitos circulantes. En condiciones fisiológicas también se encuentran en bazo, médula ósea y pulmones, desde donde pueden movilizarse a otros tejidos¹⁰².

Los monocitos constituyen una población heterogénea, en la que se pueden diferenciar tres subpoblaciones en base a la expresión en membrana de CD14, CD16 y receptores de quimiocinas (**Tabla 3**). Los monocitos clásicos (CD14^{hi}CD16⁻) constituyen casi el 90%, mientras que los intermediarios (CD14^{+/hi}CD16⁺) y no clásicos (CD14^{low}CD16^{+/hi}) constituyen el 10% restante¹⁵⁸. En general, los monocitos clásicos determinan el medio inflamatorio local, interaccionando con células efectoras y activándolas para eliminar microbios. Por otro lado, los monocitos intermediarios y no clásicos desempeñan funciones más relacionadas con la vigilancia vascular y endotelial^{159,160}. Los monocitos clásicos son reclutados a los sitios de inflamación a través del receptor de quimiocinas CCR2 (*CC-chemokine receptor 2*), que interacciona con la proteína quimiotáctica de monocitos (*monocyte chemoattractant protein-1*; MCP-1), también llamada CCL2 (*chemokine C-C motif ligand 2*). MCP-1 se expresa en sitios inflamados, y los monocitos clásicos, una vez reclutados, se diferencian a macrófagos para proteger al huésped de la infección. Alternativamente, los monocitos intermediarios y no clásicos, a través del receptor de quimiocinas CX3CR1 (*CX3C-chemokine receptor 1*) responden a la quimiocina CX3CL1 (*CX3C-chemokine ligand 1*), que se expresa en células endoteliales y tisulares en tejidos en reposo¹⁵⁹. Su función es patrullar por los vasos sanguíneos y dar

respuestas tempranas ante una posible infección¹⁶¹. También se les atribuyen funciones homeostáticas, y se asocian a procesos de reparación¹⁶². Dado que las zonas marginales de los folículos de células B son CX3CL1+, son los monocitos intermediarios y no clásicos (CD16⁺) los que se reclutan principalmente a estas zonas, donde activan a las células B y se diferencian a DCs en la pulpa blanca esplénica¹⁶³. Hay autores que proponen que las tres subpoblaciones de monocitos son distintas etapas de su diferenciación^{164,165}.

Tabla 3. Poblaciones de monocitos en humanos. (Modificada de *Monocyte development, characterization and role in disease*)¹⁶⁶.

Población	Marcadores	Receptores de quimiocinas*	Función
Clásicos	CD14 ^{hi} CD16 ⁻ CD64 ⁺ CD62L ⁺ TNFR1 ⁺ TNFR2 ^{low}	CD192 ^{hi} (CCR2 ^{hi}) CX3CR1 ^{low}	Fagocitosis y actividad anti-microbiana. Poca producción de citocinas proinflamatorias.
Intermediarios	CD14 ^{+/hi} CD16 ⁺ CD64 ⁺ HLA-DR ^{hi} TNFR1 ^{hi} TNFR2 ⁺	CD192 ^{low} (CCR2 ^{low}) CX3CR1 ^{hi} CD195 ⁺ (CCR5 ⁺)	Fagocitosis y presentación antigénica. Producen TNF-α (en respuesta a LPS), IL-1β e IL-6.
No clásicos	CD14 ^{low} CD16 ^{+/hi} CD64 ⁻ TNFR1 ^{low} TNFR2 ^{hi}	CD192 ^{low} (CCR2 ^{low}) CX3CR1 ^{hi}	Fagocitosis, función homeostática y de reparación. Producen constitutivamente IL-1RA.

*CCR, CC-chemokine receptor 2; CX3CR1, CX3C-chemokine receptor 1, TNFR1, tumor necrosis factor receptor 1; TNFR2, tumor necrosis factor receptor 2; HLA-DR, human leukocyte antigen-antigen D related; CCR5, CC-chemokine receptor 5; IL-1RA, interleukin 1 receptor A.

La homeostasis de las tres subpoblaciones de monocitos se ve alterada en infecciones o procesos inflamatorios, así como en patologías autoinmunes¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Además, en diferentes desórdenes autoinmunes se han encontrado anomalías en el fenotipo y función de los monocitos¹⁷⁰. Tanto LES como AR son dos patologías con inmunocomplejos, que son capaces de estimular a los monocitos a través de FcR. Estas señales activadoras pueden acelerar el proceso de diferenciación de los monocitos de clásicos, a intermediarios y no clásicos. De

hecho, en ambas patologías se ha encontrado una mayor proporción de monocitos diferenciados, lo que parece desempeñar un papel en la progresión de la enfermedad¹⁷¹⁻¹⁷⁷.

En LES hay una disminución global de monocitos, aunque no se conoce si es debido a un defecto en su desarrollo, un mayor grado de apoptosis o a un reclutamiento incrementado a los tejidos inflamados^{178,179}. Además del déficit numérico y las diferencias en subpoblaciones, se han descrito numerosas anormalidades fenotípicas y funcionales en los monocitos de pacientes con LES, muchas de ellas asociadas a la firma del interferón, esto es, modificaciones en la expresión génica y modificaciones epigenéticas en respuesta a IFN- α ¹⁸⁰. Estas anormalidades incluyen una menor expresión de HLA-DR y una modulación de CD80 y CD86 menos efectiva, lo que confiere a los monocitos de LES una menor capacidad de estimular células T¹⁸¹⁻¹⁸⁴. Por otro lado, presentan una expresión de CD40 y CD40L aumentadas, ambas moléculas coestimuladoras cruciales para la interacción APC-célula T, tanto en reposo como tras activación, además de participar en la maduración y cambio de isotipo de células B, lo que puede promover la estimulación de linfocitos autorreactivos y la generación de autoanticuerpos^{185,186}. Este desequilibrio de moléculas coestimuladoras parece favorecer la activación de células T autorreactivas (con un umbral de activación alto) sobre aquellas que tienen un umbral más bajo¹⁸⁷. Los monocitos de LES tienen también sobreexpresados marcadores de activación, como son la ciclooxygenasa-2, la molécula de adhesión intercelular 1 (*intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1 o CD54) y la lectina de unión a ácido siálico 1 (*Sialic Acid Binding Ig Like Lectin 1*, Siglec-1)¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. La sobreexpresión de moléculas de adhesión, como es el CD54, involucrada en la migración transendotelial y la producción de citocinas, puede conducir a una migración y activación aberrantes¹⁹¹. También se ha descrito un desequilibrio entre los receptores para la fracción Fc de la IgG (Fc γ R), con un aumento del Fc γ RI (CD64) y Fc γ RIII (CD16), pero una disminución del Fc γ RII (CD32)^{192,193}. Estos receptores se diferencian en el grado de afinidad por los inmunocomplejos de IgG (CD64 alta, CD32 media y CD16 baja), así como el tipo de señal: activadora (CD64, CD32a y CD16) o inhibidora (CD32b)¹⁹⁴. El grado de interacción de los monocitos con inmunocomplejos, que son muy abundantes en LES, está determinado por el balance de Fc γ R activadores e inhibidores. La expresión de CD64 es más notoria en pacientes con afectación renal, y correlaciona con marcadores de afectación renal y de inflamación sistémica¹⁹⁵.

Además de las alteraciones fenotípicas descritas, se han descrito también alteraciones funcionales en los monocitos de LES, que involucran principalmente la fagocitosis y la secreción de citocinas. Los monocitos de pacientes con LES tienen una menor capacidad

fagocítica, concretamente aquellas que implican el reconocimiento de “eat-me signals” y moléculas puente relacionadas con el complemento, que son las señales que conducen a la eferocitosis^{192,196–201}. Esta eferocitosis disminuida es debida tanto a defectos intrínsecos de los monocitos como a alteraciones en factores séricos en los pacientes de LES, principalmente factores del complemento, ya que se ha observado que el suero de donantes sanos es capaz de restaurar parcialmente la eferocitosis y, en contraposición, el suero de pacientes con LES es capaz de disminuir el grado de eferocitosis de monocitos sanos¹⁹⁸. Entre los factores intrínsecos al propio monocito, el hecho de que los pacientes con LES tengan una reducción en el número de monocitos circulantes, lleva a la conclusión de que la falta de eliminación eficiente de restos apoptóticos posiblemente es debida no solo a defectos cualitativos sino cuantitativos¹⁷⁹. Otro factor que explica parcialmente la eferocitosis reducida es la menor expresión de CD44, molécula implicada en uniones a otras células y a componentes de la matriz extracelular, y que es capaz de mediar la eferocitosis^{185,202}. Esta disminución es específica de monocitos de LES, no observándose en otras enfermedades como la AR¹⁷⁹. Las consecuencias de la eferocitosis sobre los monocitos también difieren entre pacientes con LES e individuos sanos, ya que en LES no se observa el incremento de CD80 y la disminución de CD86 que se observa en sanos. En cambio, disminuye la expresión del receptor *scavenger* CD36²⁰³. Además, la liberación de IL-1 β , TNF- α y CCL3 observada tras la eferocitosis en monocitos sanos no se observa en LES, y la producción de IL-10 en este contexto también es menor^{203,204}.

Otra de las grandes diferencias funcionales entre los monocitos de LES y de individuos sanos, que tiene una repercusión importante en la fisiopatología de la enfermedad, involucra a las citocinas. Los monocitos de LES tienen una capacidad de secreción de citocinas exacerbada, y una respuesta alterada a las mismas. Es probable que este exceso en la producción de citocinas se deba al reconocimiento de inmunocomplejos de ácidos nucleicos a través de TLR7 y 9. En condiciones normales, el reconocimiento de ácidos nucleicos propios está restringido debido a la rápida degradación por nucleasas endógenas durante la apoptosis y por la ubicación de estos TLRs en el retículo endoplásmico y endosomas tardíos, donde la entrada de ácidos nucleicos propios está limitada²⁰⁵. Sin embargo, la captación de inmunocomplejos que incluyen ácidos nucleicos mediante Fc γ R puede interferir con la acción de las nucleasas endógenas, resultando en la translocación de ácidos nucleicos propios a los compartimentos en los que se encuentran el TLR7 y 9. Este mecanismo induce la maduración de los monocitos, y además estimula la síntesis de citocinas proinflamatorias, como el TNF- α ^{206,207}. Es probable que este mecanismo esté aumentado por el desequilibrio previamente descrito de Fc γ R

activadores e inhibidores, así como por el retardo en la eliminación de ácidos nucleicos circulantes debido al déficit de nucleasas séricas observado en los pacientes con LES^{206,207}. Como consecuencia de estos factores y probablemente otros, los monocitos de LES producen mayores cantidades de óxido nítrico, IL-6, TNF- α , IFN- α , IL-23 y IL-10, pero menores de IL-12p70 y IL-1 β que los de donantes sanos²⁰⁸⁻²¹⁷. Los monocitos son la principal fuente de IL-6 e IL-10 en sangre periférica, por lo que el incremento en la secreción de estas citocinas tiene importantes consecuencias²¹⁸. Sin embargo, aunque produzcan más cantidad de IL-10, la capacidad de los monocitos de responder a esta citocina está reducida, por lo que los efectos más importantes del aumento de IL-10 afecta a otras células²¹⁹. También son una fuente importante de BAFF, que promueve la supervivencia y diferenciación de las células B²¹⁸. Las principales alteraciones de los monocitos de pacientes con LES se resumen en la **Figura 4**.

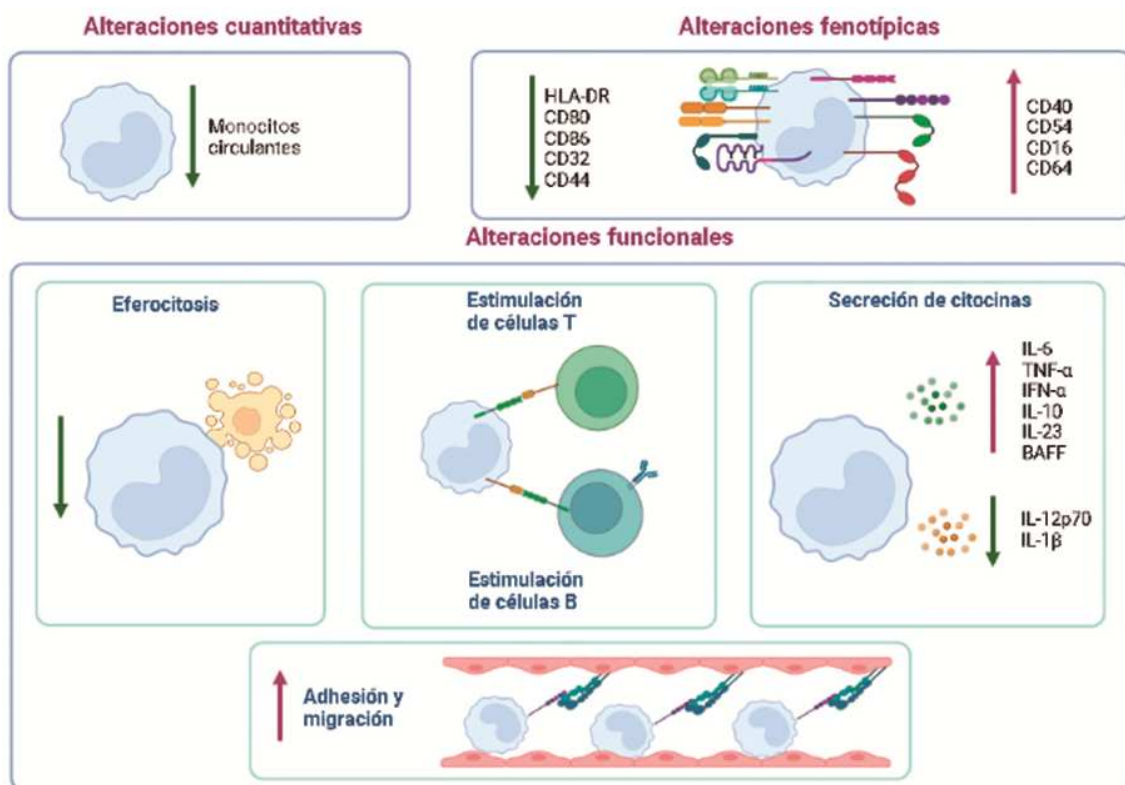


Figura 4. Alteraciones fenotípicas y funcionales de los monocitos de LES. Los pacientes con LES presentan una disminución de los monocitos circulantes (alteraciones cuantitativas), así como una serie de alteraciones en su fenotipo, que también repercutirán en su funcionalidad (creada con Biorender.com).

En AR los monocitos también juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, sobre todo como células precursoras de macrófagos y osteoclastos, que van a contribuir notablemente en: inducción de inflamación y destrucción de hueso. Se observa un mayor número de monocitos intermediarios, tanto en sangre periférica como en la sinovia^{173-177,220}. Los monocitos intermediarios producen grandes cantidades de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) en la sinovia de AR, relacionándose directamente con los títulos de FR, con los marcadores de inflamación VSG y PCR, así como con la actividad de la enfermedad^{173,174,176,220-223}. Además, la población de monocitos intermediarios y no clásicos es la principal precursora de macrófagos y osteoclastos en las articulaciones inflamadas, promoviendo inflamación de la sinovia y destrucción de cartílago y hueso^{175,224,225}. Los monocitos intermediarios también pueden activar las células Th17 por contacto directo en el tejido sinovial inflamado, promoviendo su expansión^{175,177,226}. Por otro lado, también se han observado algunas anomalías fenotípicas en los monocitos de AR. Se ha descrito una mayor expresión de integrinas pertenecientes a los complejos CD11/CD18, sobre todo a expensas de CD11b. Este, al interactuar con ligandos de células endoteliales, media la adhesión de los monocitos al endotelio activado, promoviendo su migración a la sinovia²²⁷. También tienen una mayor expresión de CD16 y CD64, lo que sugiere que están más activados y diferenciados, además de tener mayor capacidad de unir inmunocomplejos^{220,228}. De hecho, en AR, los monocitos son sensibilizados por inmunocomplejos IgG, haciéndose más hiperreactivos en condiciones inflamatorias²²⁹. Los monocitos de AR también expresan más CD147, también llamado *basigin* o inductor de MMP extracelular (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*, EMMPRIN). El CD147 los induce a producir MMP, que disgrega la matriz extracelular, mediando la destrucción de la sinovia²³⁰. También se encuentra incrementada la expresión del ligando *A proliferation-inducing ligand* (APRIL), que promueve la diferenciación y supervivencia de las células B y células plasmáticas²³¹.

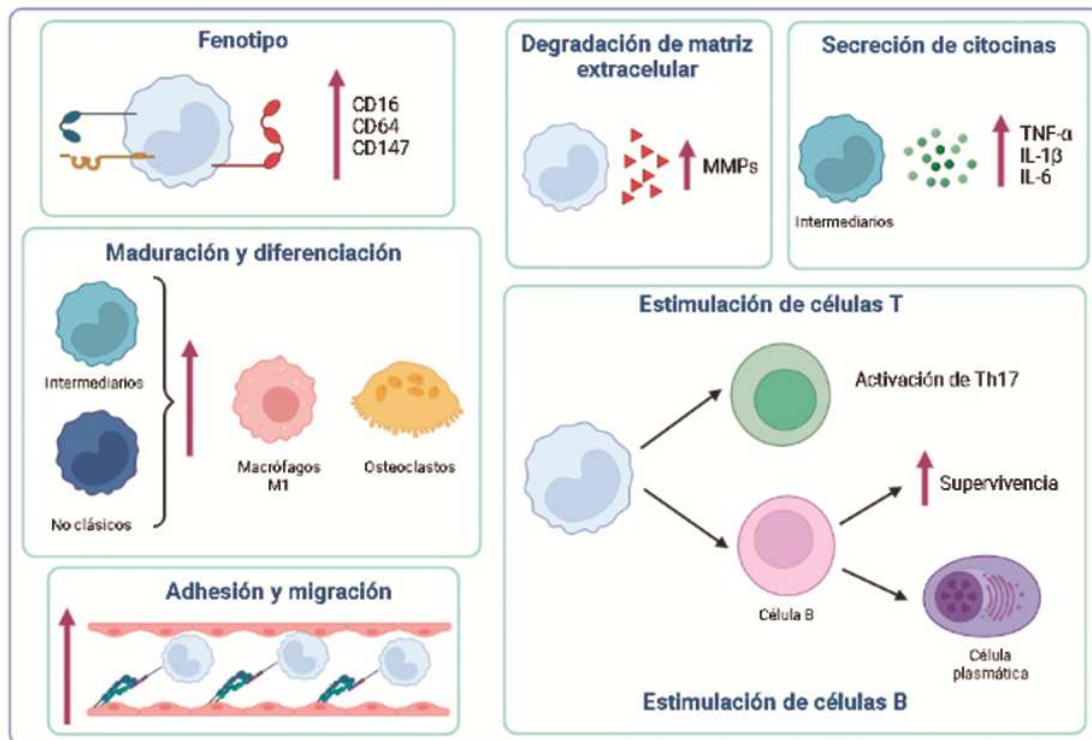


Figura 5. Papel del monocito en la fisiopatología de la AR. Los pacientes con AR presentan un mayor número de monocitos intermediarios, con una mayor capacidad de migración a la sinovia, donde tienen mayor capacidad de secreción de citocinas proinflamatorias, metaloproteinasas de matriz (MMPs), así como una mayor diferenciación a macrófagos M1 y osteoclastos (creada con *Biorender.com*).

1.3.1.4. Macrófagos

Los macrófagos son células residentes en la mayoría de tejidos humanos, donde realizan funciones homeostáticas, pero también participan en las respuestas inmunes frente a agresiones, así como en la resolución de las mismas²³².

Una parte significativa de los macrófagos proceden de la diferenciación de monocitos sanguíneos, y pueden englobarse en dos grandes grupos: activados clásicamente (M1) o activados alternativamente (M2). Los M1 producen principalmente citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-18) y quimiocinas (CCL2 e IL-8) que inducen el reclutamiento de otras células inmunológicas²³². También contribuyen directamente al daño tisular, produciendo ROS, proteasas y enzimas^{233,234}. Los M2 producen citocinas que regulan la inflamación y contribuyen a la angiogénesis, remodelación y reparación tisular (IL-4, IL-10, prostaglandina E₂, *transforming growth factor beta* (TGF- β))²³².

En condiciones normales, los macrófagos constituyen hasta un 10-15% del total de las células residentes en tejidos; sin embargo, en respuesta a infecciones o en EAI este número puede incrementarse²³⁵. Además, en EAI, la activación crónica del sistema inmune puede alterar el equilibrio entre los perfiles M1 y M2, lo que contribuye a la patogénesis²³⁵.

En LES, los macrófagos, así como los monocitos, son productores de IFN- α tras ser estimulados vía TLR7. El IFN- α , junto al TNF- α , contribuye a que la diferenciación de monocitos y macrófagos se dé hacia perfiles proinflamatorios²³⁶. En LES nefrítico, los macrófagos que infiltran los glomérulos tienen mayor expresión de *myeloid-related protein-8* (MRP-8), MRP-14 y ciclooxigenasa-2, lo que se relaciona con una mayor actividad proinflamatoria^{237,238}. Además, los macrófagos, al igual que los monocitos, presentan una menor capacidad fagocítica²³⁷⁻²⁴⁰. Los macrófagos de la zona marginal, que rodean los folículos esplénicos, son cruciales para una eliminación eficiente de células apoptóticas, así como para la inducción de tolerancia a autoantígenos. Sin embargo, es posible que no sólo la disminución de la capacidad fagocítica de monocitos y macrófagos influya en la generación de una respuesta autoinmune en los pacientes con LES, sino que es, además, la falta de señales antiinflamatorias la que conduce a una “eferocitosis inflamatoria” en el LES²⁴¹. Por tanto, los monocitos y macrófagos en LES juegan un rol fundamental, por un lado, en la rotura de la tolerancia e inicio de la autoinmunidad, principalmente por sus defectos en fagocitosis y, por otro lado, en perpetuar la enfermedad a través de una señalización anormal al coestimular células T y B autorreactivas, así como mediante el daño directo de tejidos.

En la sinovia de AR, los macrófagos, junto a los fibroblastos son los mayores productores de citocinas²⁴². Éstas son fundamentalmente proinflamatorias, dado que el ratio M1/M2 está descompensado a favor de los M1^{243,244}. Los M1 son además productores de MMP-3 y MMP-12, e implicados por tanto de manera directa en la destrucción ósea y del cartílago^{245,246}. Además, en las articulaciones inflamadas (y en general, en inflamación crónica) los M1 producen IL-23, que induce la diferenciación de células T a Th17, así como la producción de IL-17A por los propios M1²⁴⁷⁻²⁴⁹. Sin embargo, aunque el papel de los macrófagos en AR se ha considerado fundamentalmente patogénico, se ha descrito recientemente que también pueden jugar un papel beneficioso en la enfermedad. Hay un tipo de macrófagos en la sinovia de AR que no deriva de monocitos sanguíneos, sino de células mononucleares residentes y que son capaces de formar una barrera que protege físicamente las estructuras intraarticulares del daño inflamatorio²⁵⁰.

1.3.2. Factores solubles

El sistema inmune, tanto innato como adaptativo, secreta una gran cantidad de mediadores solubles, que desempeñan una infinidad de funciones. Entre estos factores, se encuentran las citocinas, moléculas solubles que, al interactuar con su receptor en la célula diana, desencadenan la transducción de señales. Esto se traduce en una serie de cambios fenotípicos y/o funcionales de la célula diana. En la **tabla 4** se enumeran las citocinas producidas por el sistema inmune innato o cuya diana son células de la inmunidad innata.

En las EAI hay un aumento de citocinas como consecuencia de la infiltración y activación de las células del sistema inmune en órganos y tejidos. El papel de estas citocinas es complejo, dado que, además de su acción directa, sus efectos están mediados por la interacción sinérgica o antagónica con otros factores solubles. En este apartado se tratará principalmente el papel de las citocinas en LES y AR. Estas están involucradas en coordinar la respuesta inmune y en el reclutamiento y activación de células efectoras, lo que resulta no sólo en inflamación, sino en daño local¹³.

Tabla 4. Citocinas producidas o con efecto sobre células de la inmunidad innata. Resaltadas en negrita las células del sistema inmune innato. (Adaptada de *Abbas, 9ª Ed. 2018*).

Citocina	Células productoras	Principales células y tejidos diana y efectos biológicos
IL-4	Th2, T _{FH} , mastocitos	Macrófagos: activación alternativa (M2) e inhibición de la activación clásica mediada por IFN- γ Células B: cambio de isotipo a IgE. Células T: diferenciación a Th2, proliferación.
IL-5	Th2, ILC2	Eosinófilos: activación, incremento de producción
IL-6	Monocitos, macrófagos, células endoteliales, células T	Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda. Células B: proliferación de células productoras de anticuerpos.
IL-9	Células T CD4 ⁺	Mastocitos, células B, células T y células tisulares: aumento de la activación y supervivencia.
IL-12: IL-12A (p35) IL-12B (p40)	Monocitos, macrófagos, DCs	Células NK: aumento de la síntesis de IFN- γ y la actividad citotóxica. Células T: diferenciación a Th1.
IL-13	Th2, células NKT y mastocitos	Macrófagos: activación alternativa. Células epiteliales: aumento de la producción de moco. Células B: cambio de isotipo a IgE.
IL-15	Monocitos y macrófagos	Células NK: proliferación. Células T: supervivencia y proliferación de células CD8 ⁺ de memoria.

IL-17A IL-17F	Th17, ILC3	Células epiteliales, monocitos y macrófagos : aumento de la producción de quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento.
IL-23: IL-23A (p19) IL-12B (p40)	Monocitos, macrófagos, DCs	Células T: diferenciación y expansión de Th17
IL-25 (IL-17E)	Células T, mastocitos, eosinófilos, monocitos, macrófagos , células epiteliales	Varios tipos celulares: aumento de la síntesis de IL-4, IL-5 e IL-13
IL-27: IL-27 (p28) EBI3 (IL-27B)	Monocitos, macrófagos, DCs	Células T: diferenciación a Th1, inhibición de la diferenciación a Th17.
Linfopoyetina estromal tímica (<i>Thymic stromal lymphopoietin</i> , TSLP)	Queratinocitos, células epiteliales bronquiales, fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales, mastocitos, monocitos, macrófagos, granulocitos y DCs	DCs : activación. Eosinófilos : activación. Mastocitos : producción de citocinas. Células T: diferenciación a Th2.
TGF-β	Monocitos, macrófagos, Treg	Macrófagos : inhibición de la activación; estimulación de factores angiogénicos. Fibroblastos: aumento de la síntesis de colágeno. Células T: inhibición de la proliferación y de funciones efectoras; diferenciación a Th17 y Treg. Células B: inhibición de la proliferación; producción de IgA.
Citocinas tipo II		
IFN-α (múltiples proteínas) (IFN tipo I)	pDCs, monocitos y macrófagos	Todas las células: estado antiviral, incremento de HLA-I. Células NK : activación.
IFN-β (IFN tipo I)	Fibroblastos, pDCs	Todas las células: estado antiviral, incremento de HLA-I. Células NK : activación.
IFN-γ (IFN tipo II)	Th1, células T CD8 ⁺	Macrófagos : activación clásica e incremento de las funciones microbicidas. Células B: cambio de isotipo a IgG. Células T: diferenciación a Th1. Múltiples células: incremento de HLA-I y II, procesamiento antigénico y presentación a células T.
IL-10	Monocitos, macrófagos, Treg, Breg	Monocitos, macrófagos y DCs : inhibición de la expresión de IL-12, moléculas co-estimuladoras y HLA-II.
IL-26	Células T, células NK, monocitos, macrófagos , células epiteliales bronquiales	Múltiples células: producción de citocinas pro-inflamatorias y aumento de la expresión de CD54 (ICAM-1).

IFN- λ (IFN tipo III)	DCs	Células epiteliales: estado antiviral.
Superfamilia del TNF		
TNF	Monocitos, macrófagos, células NK, células T	Neutrófilos: activación. Células endoteliales: activación (inflamación, coagulación). Hipotálamo: fiebre. Músculo, adipocitos: catabolismo (caquexia).
Linfotoxina- α (LT α , TNFSF1)	Células T, células B	Mismas funciones que TNF
BAFF (BlySS, CD257, TNFSF13B)	DCs, monocitos, células B	Células B: supervivencia, proliferación.
APRIL (CD256, TNFSF13)	Células T, DCs, monocitos	Mismas funciones que BAFF.
Familia IL-1		
IL-1 α	Monocitos, macrófagos, DCs, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos, hepatocitos.	Células endoteliales: activación (inflamación, coagulación). Hipotálamo: fiebre.
IL-1 β	Monocitos, macrófagos, DCs, fibroblastos, células endoteliales, queratinocitos.	Células endoteliales: activación (inflamación, coagulación). Hipotálamo: fiebre. Hígado: síntesis de proteínas de fase aguda. Células T: diferenciación a Th17.
Antagonista del receptor de la IL-1 (IL-1RA)	Monocitos, macrófagos	Células que expresan el receptor de la IL-1: antagonista competitivo de la IL-1.
IL-18	Monocitos, macrófagos, DCs, células de Kupffer, queratinocitos, condrocitos, fibroblastos sinoviales, osteoblastos	Células NK y células T: síntesis de IFN- γ . Monocitos: expresión de GM-CSF, TNF, IL-1 β . Neutrófilos: activación, liberación de citocinas.
IL-33	Células endoteliales, células musculares lisas, queratinocitos, fibroblastos	ILCs: activación de ILC2. Células T: diferenciación a Th2.

Citocinas quimiotácticas o quimiocinas

Quimiocina	Receptor	Función
Familia CC		
CCL2 (MCP-1)	CCR2	Reclutamiento de leucocitos.
CCL3 (MCP-1 α)	CCR1, CCR5	
CCL4	CCR5	Reclutamiento de células T, DCs, monocitos y células NK .
CCL5 (RANTES)	CCR1, CCR3, CCR5	Reclutamiento de leucocitos.
CCL11 (Eotaxina)	CCR3	Reclutamiento de eosinófilos, basófilos y células Th2.

CCL19 (MIP-3 β /ELC)	CCR7	Migración de células T y DCs a las zonas parafoliculares de los linfonodos.
CCL21 (SLC)	CCR7	
CCL22 (MDC)	CCR4	Reclutamiento de células T y NK .
Familia CXC		
CXCL1 (GRO α)	CXCR2	Reclutamiento de neutrófilos .
CXCL5 (ENA78)	CXCR2	
CXCL8 (IL-8)	CXCR1, CXCR2	
Familia C		
XCL1 (Linfotactina)	XCR1	Reclutamiento de células T y NK .
Familia CX3C		
CX3CL1 (Fractalquina)	CX3CR1	Reclutamiento de células T, NK y monocitos .

1.3.2.1. IFN- α

El IFN- α forma parte de los IFN de tipo I junto al IFN beta (β), omega (ω) y otros menos comunes²⁵¹. La producción de IFN- α es desencadenada por la estimulación de TLR7 y 9, siendo las pDCs las principales productoras²⁵¹. Sin embargo, como células que se estimulan también por TLR7 y 9, las cDCs, los monocitos, macrófagos y células B son también productoras de IFN- α ^{210,252}. El IFN- α induce, y a su vez su acción es regulada por factores de respuesta a interferón²⁵³. Los efectos biológicos del IFN- α ocurren a través del receptor de IFN²⁵⁴. En LES, aunque encontramos otras citocinas elevadas, los niveles circulantes de IFN- α son los que mejor se asocian a la actividad clínica²⁵⁵⁻²⁵⁷. Esta producción es exacerbada debido a la estimulación de TLR7 y 9, que está disparada tanto por factores exógenos (infecciones virales, exposición a radiación UV) como endógenos (autoanticuerpos unidos a restos de células necróticas)^{258,259}. La producción de IFN- α ocurre en las fases iniciales de la respuesta inmune innata, siendo un factor desencadenante y decisivo de los eventos posteriores de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa²⁵¹. Sin embargo, la elevación crónica del IFN- α que predispone al desarrollo de LES no se debe solo a una sobreproducción, sino a una sensibilidad incrementada y una retroalimentación negativa ineficiente^{255,256}. El papel del IFN- α en la patogénesis del LES está mediado por múltiples mecanismos, incluyendo un aumento de la maduración y presentación de autoantígenos por las DCs, el incremento de la diferenciación, proliferación y supervivencia de células T y B, alteración en el balance de citocinas pro y antiinflamatorias (inducción de IL-1 β , IL-6, IL-10, TGF- β y TNF- α e inhibición de IL-4 y la IL-12) así como la inducción de quimiocinas y receptores que promueven la migración de células inflamatorias a los tejidos^{251,260-264}.

1.3.2.2. IL-1 β , IL-6, y TNF- α

La activación de TLRs induce directa o indirectamente la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α . Además, la IL-1 β y el TNF- α inducen también la producción de IL-6, y la producción desregulada de IL-6 conlleva a un estado inflamatorio persistente^{265,266}. A su vez, la IL-6 ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la síntesis de IL-1 β y TNF- α , además de sobre la IL-12²⁶⁷. En LES nefrítico, el TNF- α , IL-1 β e IL-6, junto a la IL-18, se encuentran incrementados en riñón, y tienen relación directa con la enfermedad inflamatoria²⁶⁸. En AR la IL-1 β , producida predominantemente por monocitos y macrófagos, tiene un papel relevante en la enfermedad al promover la activación de células T, además de ser un potente inductor de MMPs⁶⁰.

La IL-6 es producida principalmente por monocitos y macrófagos (aunque también por células T, fibroblastos y células endoteliales)²⁶⁹. Para llevar a cabo sus funciones biológicas, la IL-6 se une a su receptor (IL-6R), que se expresa en la membrana de algunas células y también de forma soluble. La IL-6 unida al IL-6R, ya sea de membrana o soluble, tiene entonces afinidad por la glucoproteína 130 (gp130), que se expresa de forma ubicua²⁷⁰. Cuando se da esta unión gp130 dimeriza y se da la transducción interna de señales, que conduce a la transcripción de determinados genes²⁷⁰. La IL-6 actúa como una proteína de fase aguda, incrementando la respuesta inflamatoria, pero también desempeña funciones antiinflamatorias induciendo la reparación tisular. Muchos de sus efectos están mediados por el hígado, donde es procesada y comienza una cascada inflamatoria induciendo PCR, amiloide A sérico, fibrinógeno, haptoglobina y α 1-antitripsina, a la vez que reduce los niveles de albúmina, zinc y hierro²⁶⁶. También induce la diferenciación celular en la médula ósea, estimulando la producción de neutrófilos y megacariocitos además de incrementar la producción hepática de trombopoyetina, que estimula la diferenciación de megacariocitos a plaquetas²⁷¹. Además, la IL-6 actúa sobre la respuesta inmune innata y adaptativa. En la inmunidad innata, principalmente promueve la infiltración de monocitos y neutrófilos a los sitios inflamados, y la maduración de los primeros a macrófagos^{272,273}. En la inmunidad adaptativa actúa sobre la maduración de células T, promoviendo la polarización de Th17 sobre las Treg, y además induce la maduración de células B a células plasmáticas y la síntesis de inmunoglobulinas²⁷⁴. Se encuentra elevada en los pacientes con LES, pero no se asocia de forma permanente a actividad^{275,276}. En AR, la IL-6 juega un papel más relevante en el desarrollo de la enfermedad. Se encuentra elevada en la sinovia, y correlaciona con los hallazgos radiológicos de destrucción articular⁶⁰. De hecho, el bloqueo de la IL-6 en AR ha probado ser de gran utilidad en aquellos pacientes no respondedores a otras terapias²⁷⁷.

El TNF- α se induce directamente por la presencia de inmunocomplejos, y se encuentra elevado en LES activo, donde es un buen marcador de actividad^{275,278,279}. En AR, el TNF- α desempeña un papel central en la patogénesis. Es producido principalmente por macrófagos M1 y fibroblastos activados, pero también por monocitos circulantes (principalmente intermediarios), neutrófilos, células NK y linfocitos activados^{227,280,281}. El TNF- α promueve la activación de fibroblastos en la sinovia, que producirán factor de crecimiento del tejido conectivo, el cual induce la activación anormal de los osteoclastos que culmina en destrucción articular. El TNF- α también promueve la formación de “pannus” al activar a las células endoteliales y amplificar la producción de citocinas, lo que provoca la migración de leucocitos a la sinovia²⁸⁰. Además, cuando se encuentra en presencia de IL-1 β , el TNF- α promueve la formación de osteoclastos, favoreciendo la resorción ósea en la sinovia inflamada^{282,283}.

1.3.2.3. IL-17 e IL-23

El eje IL-17/IL-23 es crítico para el desarrollo de EAI. La IL-17 es una citocina proinflamatoria que incrementa la estimulación de células T y estimula fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y células epiteliales para que produzcan mediadores proinflamatorios: IL-1 β , IL-6, TNF- α , reactantes de fase aguda, la sintasa 2 de ácido nítrico (*Nitric oxid synthase 2*, NOS-2), MMPs y quimiocinas^{247,284}. Los receptores de IL-17 se expresan en múltiples tipos celulares, e inducen respuestas proinflamatorias a través de vías de señalización relacionadas con el sistema inmune innato (como la señalización vía TLRs). Además, la IL-17, en grandes concentraciones en la sinovia de AR, es un factor quimiotáctico para monocitos, induciendo su reclutamiento, y es también capaz de promover la osteoclastogénesis así como activar a los osteoclastos, promoviendo la destrucción de hueso^{60,285,286}. No obstante, las terapias de bloqueo de esta citocina no han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la AR⁶⁰.

La IL-23 es producida por macrófagos, DCs y un subgrupo de células T CD4⁺²⁴⁷. Activa directamente una población de macrófagos y DCs que expresan el receptor para la IL-23, lo que resulta en la producción de mediadores inflamatorios como la IL-1 β y el TNF- α ^{287,288}. Además induce la diferenciación de células T a Th17, productoras de IL-17²⁸⁹. Por tanto, la IL-23 puede inducir inflamación crónica por dos mecanismos independientes: (a) la inducción de la producción de IL-1 β e IL-6 vía activación de células mieloides y (b) la activación de células Th17.

1.3.2.4. IL-10

La IL-10 es un mediador de la respuesta inmune que ejerce efectos antiinflamatorios. Es producida por varias células, incluyendo monocitos, macrófagos, DCs, neutrófilos, células T y B²⁹⁰. Una vez secretada puede ejercer su acción sobre múltiples células diana, regulando la inmunidad innata y adaptativa²⁹¹. La respuesta celular a IL-10 es mediada por el receptor de la IL-10 (IL-10R), compuesto por dos subunidades: IL-10R1, expresado por la mayoría de leucocitos y que funciona como ligando de la IL-10, e IL-10R2, expresado constitutivamente por la mayoría de células, compartida por otros receptores de citocinas, y necesaria para que se dé la transducción de señal²⁹¹. Dado los altos niveles que presentan de IL-10R, los monocitos y macrófagos son considerados las principales dianas de la IL-10, en los cuales reduce la producción de citocinas proinflamatorias y la expresión de moléculas co-estimuladoras^{292,293}. La IL-10 también puede inhibir la respuesta de células T de forma directa o indirectamente al inhibir a las APC^{292,293}. Sin embargo, también se han descrito efectos estimuladores: sobre las células T CD8⁺ incrementa su función citotóxica, proliferación y producción de IFN- γ , y sobre las células B puede promover su supervivencia, proliferación y diferenciación²⁹⁴⁻²⁹⁶. En LES el papel de la IL-10 es controvertido²⁹⁷⁻²⁹⁹. El papel patológico que se atribuye a la IL-10 recae de forma específica en los efectos sobre la producción de anticuerpos por las células B^{300,301}. Es probable que la relación de la IL-10 con la actividad del LES se deba a la falta de respuesta de otras células de la inmunidad innata y adaptativa, ya que hay estudios que demuestran la falta de inhibición de la IL-10 sobre células mieloides, y la menor expresión de IL-10R en células T CD4⁺ y DCs³⁰²⁻³⁰⁴. Por tanto, el incremento de IL-10 puede ser un mecanismo de compensación en aquellos pacientes que menos responden a ella. En este caso, el papel patológico de la IL-10 se debe a una falta de respuesta más que a un efecto dañino de la IL-10. Además, los estudios en modelos animales indican que la IL-10 podría tener un papel beneficioso en etapas avanzadas de la enfermedad^{305,306}. Por otro lado, se ha visto que el tratamiento con anticuerpos neutralizantes anti-IL-10 reduce la actividad de la enfermedad, aunque la presencia de autoanticuerpos anti-IL-10 en pacientes con LES no se ha relacionado con la actividad de la enfermedad^{307,308}. Es necesario realizar más estudios en este aspecto, ya que los ensayos con anti-IL-10 neutralizante se han realizado en sólo 6 pacientes, y el estudio de autoanticuerpos anti-IL-10 no reveló si estos eran neutralizantes.

En AR, la IL-10 desempeña un papel protector. La producción local de IL-10 por parte de macrófagos y células T sinoviales inhibe la producción de citocinas proinflamatorias^{309,310}. Al igual que en LES, la expresión de IL-10 en AR se ha asociado a una producción incrementada de

autoanticuerpos y activación de células B³¹¹. Sin embargo, en modelos animales lo que se observa es un papel protector de la IL-10: reducción de la inflamación y destrucción articular, así como menor infiltración y producción de citocinas proinflamatorias³¹²⁻³¹⁴.

1.4. EL PAPEL DE LA PLAQUETA EN LA REGULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

Las plaquetas son componentes subcelulares anucleados discoides, de 1-3 μm de diámetro, generados en la médula ósea a partir de megacariocitos³¹⁵. Constituyen el segundo componente más abundante de la sangre, por detrás de los glóbulos rojos³¹⁵. Una vez liberadas, circulan por la sangre entre 7 y 10 días antes de ser eliminadas, principalmente por macrófagos en el hígado³¹⁶.

Las plaquetas están constituidas por una bicapa lipídica que conforma la membrana plasmática y que está asociada a citoesqueleto. En esta membrana plasmática hay numerosas aperturas y poros que forman multitud de invaginaciones, y que se conoce como sistema canalicular abierto³¹⁷. Este sistema dota a las plaquetas de una gran área superficial en relación a su tamaño. Las plaquetas también están dotadas de un sistema canalicular denominado sistema tubular denso. Este es un remanente del retículo endoplasmático liso de los megacariocitos, y almacena calcio y enzimas, implicadas en la activación de las plaquetas³¹⁸. Además, las plaquetas disponen de tres tipos de gránulos: los gránulos α , los más abundantes, entre 40 y 80 por plaqueta, los gránulos densos o δ , entre 4 y 8 por plaqueta y algunos lisosomas³¹⁸. Los gránulos α y δ contienen gran variedad de proteínas y moléculas bioactivas (**Tabla 5**), mientras que los lisosomas contienen enzimas como la fosfatasa ácida y algunas proteínas asociadas a la membrana lisosomal (*lysosomal-associated membrane proteins*, LAMP1, LAMP2 y LAMP3 (CD63))³¹⁸. La mayor parte del contenido de los gránulos es empaquetado tras su síntesis en los megacariocitos, pero también en las plaquetas maduras, procedente de la red trans-Golgi³¹⁹. Además, las plaquetas también pueden adquirir proteínas plasmáticas por endocitosis y empaquetarlas en estos gránulos³²⁰.

Tabla 5. Moléculas contenidas en los diferentes gránulos de las plaquetas. (Modificada de Smyth et al. *J Thromb haemos*, 2009).

Gránulos α	Gránulos densos o δ
B-tromboglobulina	ADP
Multimerina	ATP
Albúmina	Calcio
α -defensina 1 ³²¹	Serotonina
Transcrito 1 similar a TREM (TLT-1) ³²²	Pirofosfato
Glicoproteínas de adhesión	Guanosine diphosphate (GDP)
Fibrinógeno	Magnesio
Factor von Willebrand	Proteasa nexina I
Fibronectina	Growth Arrest Specific 6 (Gas6)
Trombospondina-1	Proteasa nexina II
Vitronectina	Inhibidor de la vía del factor tisular
Factores de coagulación	Factor XIII
Factor V	Inhibidor de la α_1 -proteasa
Proteína S	Quinínógeno de alto peso molecular
Factor XI	α_2 -macroglobulina
Factores de crecimiento	Factor de permeabilidad vascular
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	Glicoproteína rica en histidina
Factor de crecimiento de células endoteliales (EGF)	Inmunomoduladores
Factor de crecimiento similar a insulina I (IGF-I)	Inhibidor 1 del complemento
Factores angiogénicos	Citocinas y quimiocinas
Angiopoyetina-1	IL-1 β
Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	MIP-1 α
Inhibidor de PF4	RANTES
Inhibidores fibrinolíticos	Monocyte chemotactic protein 3 (MCP-3)
Inhibidor de α_2 -plasmina	CXCL1 / GRO α
Inhibidor del activador de plasminógeno	PF4
Proteínas específicas de la membrana del gránulo	CXCL5 / ENA-78
P-Selectina / CD62P	CXCL7 / NAP-2
CD63 / lysosomal associated membrane glycoprotein-3 (LAMP-3)	CXCL8 / IL-8
33-kDa platelet alpha-granule membrane protein (GMP-33)	Thymus activation-regulated chemokine (TARC)
Inmunomoduladores	
CD40L soluble (sCD40L)	
High-mobility group box 1 (HMBG1)	
Histamina	
Inmunoglobulinas	
Citocinas y quimiocinas	
IL-1 β	
IL-7	
TGF- β	
Factor plaquetario 4 (PF4 o CXCL4)	
CXCL1 / Growth-regulated oncogene α (GRO α)	
CXCL5 / Epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78 (ENA-78)	
CXCL7 / neutrophil-activating peptide-2 (NAP-2)	
CXCL8 (IL-8)	
CXCL12 / stromal cell-derived factor 1 (SDF-1 α)	

CCL2 / Macrophage inflammatory protein 1 (MIP-1)	
CCL3 / MIP-1 α	
CCL5 / Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted (RANTES)	
Proteínas del sistema del complemento	
C3	
C4a	
C1-inhibidor	
Factor H	

Las plaquetas se forman a partir del citoplasma de los megacariocitos, que residen en la médula ósea. Los megacariocitos son las células más grandes, pero también una de las más infrecuentes de la médula ósea, donde constituyen alrededor del 0.01% de las células nucleadas. Para formar y liberar plaquetas, los megacariocitos sufren endomitosis (replican su DNA sin dividirse), por lo que se vuelven poliploides. En este estado se someten a un proceso de maduración en el que la mayor parte de su citoplasma se empaqueta formando de 10 a 20 proplaquetas, y el núcleo se extruye. Cada proplaqueta comienza como una protuberancia roma que con el tiempo se alarga, se adelgaza y se ramifica repetidamente. Las plaquetas se forman selectivamente en las puntas de las proplaquetas. En la primera etapa de la formación de las plaquetas, la maduración de megacariocitos, participan diferentes factores de crecimiento, y el citoplasma de los megacariocitos se llena de los gránulos específicos que luego contendrán las plaquetas maduras. Este proceso, está sujeto por tanto a la regulación del microambiente, afectando al repertorio de plaquetas maduras que contendrá un individuo³¹⁵. De hecho, en un ambiente inflamatorio, la maduración de los megacariocitos se ve afectada por la presencia de IL-1 β y la estimulación vía TLRs, lo que repercute en el repertorio molecular que forma a pasar parte de las plaquetas^{323,324}.

A la heterogeneidad de las plaquetas contribuye no solamente el ambiente durante su formación, sino también aquel al que se ven expuestas una vez están circulando. Además de los mediadores que contienen en los gránulos, las plaquetas también pueden captar moléculas del exterior, procesar proteínas o incluso sintetizarlas *de novo* a partir de preRNAm derivados de megacariocitos^{325,326}. Estas propiedades hacen que las plaquetas no constituyan una población homogénea: su contenido varía de acuerdo a su tamaño. Son ejemplos de ello la observación de que, en personas sanas, las plaquetas más pequeñas portan más transcritos inflamatorios que aquellas más grandes^{327,328}. Durante una infección, se incrementa la cantidad de proteínas antivirales en las plaquetas, proceso que comienza ya en los megacariocitos^{329,330}.

También se han observado niveles incrementados de citocinas en las plaquetas de pacientes con cáncer, lo que indica una captación activa de estas citocinas del medio, o bien cambios en la megacariopoyesis relacionados con la enfermedad^{331,332}.

Las plaquetas tienen un papel crucial en hemostasis y coagulación. Se activan cuando hay un daño vascular, en respuesta al cual se adhieren a estos sitios dañados. La activación más potente se observa con la unión de trombina, colágeno o ADP³³³⁻³³⁵. Estas plaquetas activadas son capaces de reclutar más plaquetas, así como a leucocitos, induciendo la formación de trombos³³⁶. Las plaquetas no sólo se activan por daño vascular, sino también por la presencia de patógenos o cuando hay inflamación. Así, las plaquetas pueden activarse con ligandos de TLRs o citocinas, y ante la presencia de determinados autoanticuerpos, como ACPA, anti- β 2-glicoproteína o anti-D4GDI en EAI³³⁷⁻³⁴². Al activarse, liberan el contenido de los gránulos a la circulación y su membrana cambia, incrementándose el número de integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ (glicoproteína (GP) IIb-IIIa) y exponiéndose en superficie CD62P (P-selectina), lo que incrementa la capacidad de adhesión de las plaquetas³⁴³. El CD62P es una proteína transmembrana almacenada en los gránulos α de las plaquetas y en los cuerpos de Weibel-Palade de las células endoteliales³⁴⁴. La translocación de CD62P a la superficie de las plaquetas activadas media procesos inflamatorios al interactuar con el PSGL-1 en leucocitos y células endoteliales, pero también en otras plaquetas³⁴⁴.

Por tanto, las plaquetas no solamente participan en la coagulación, sino que son elementos inmunoreguladores, además de ser capaces de modular otros procesos como la angiogénesis, la aterosclerosis, el desarrollo linfático o el crecimiento tumoral³⁴⁵.

1.4.1. Las plaquetas como elemento de la inmunidad innata

Con una concentración de $150-400 \times 10^9$ por litro de sangre, las plaquetas superan en número a los leucocitos. Esto las hace unos excelentes centinelas, dada la alta probabilidad de encontrar patógenos circulantes. Para ello, están dotadas de elementos que le permiten reconocer microorganismos invasores, y potencialmente patógenos.

Las plaquetas humanas contienen transcritos para los 10 TLRs, además de para otros PRRs, como la proteína NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing protein 2*) o DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercelular adhesión molecule-3-grabbing non-integrin*)³⁴⁶⁻³⁴⁸.

Sin embargo, no todos estos transcritos son funcionales. El primer TLR que se demostró ser funcional en plaquetas fue el TLR4, pero también expresan TLR2, que es capaz de reconocer lipoproteínas bacterianas, así como la envuelta de algunos virus³⁴⁹⁻³⁵¹. Las plaquetas también disponen de TLRs endosomales funcionales, en concreto los TLR7 y 9, este último expresado tanto en el interior de las plaquetas como en su superficie³⁵²⁻³⁵⁴. Además, constan de FcγRIIIa en su membrana, de manera que pueden reconocer inmunocomplejos de IgG³⁵⁵.

Una vez reconocido el patógeno, las plaquetas pueden realizar su función defensiva a través de varios mecanismos. Uno de ellos es la internalización del patógeno a través de su sistema canalicular abierto que, aunque no conduce a su destrucción directa, sí que favorece su destrucción indirecta, ya estas plaquetas activadas con patógenos en su interior pueden unirse a células fagocíticas, como los monocitos³⁵⁶. Este es por tanto un mecanismo que favorece la fagocitosis, pero que puede conducir a trombocitopenia, fenómeno que se observa frecuentemente en enfermedades infecciosas. Otro de los efectos que se desencadena en las plaquetas es la desgranulación y liberación de mediadores solubles. La activación de plaquetas vía TLR4 resulta en un incremento de CD62P y CD40L en su superficie y la liberación de ATP, TNF-α e IL-1β, este último a través de micropartículas derivadas de plaquetas (*platelet-derived microparticles*, PMPs)³⁵⁷⁻³⁵⁹. Las PMPs generadas tras la activación del TLR4 activan a las células endoteliales, incrementando la permeabilidad de las barreras endoteliales, lo que permitirá la extravasación de otras células inmunológicas³⁶⁰. La activación por TLR2 resulta también en un incremento de CD62P y CD40L en superficie y la liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como RANTES (*regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted*), factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor*, PDGF) y PF4, pero también en la activación de α_{2b}β₃, lo que incrementa su agregación y la interacción con células endoteliales³⁶¹⁻³⁶³. La activación de TLR7 induce la secreción de gránulos α y la liberación del factor de complemento C3 mientras que la activación de TLR9 conduce a la exocitosis de gránulos α y δ, lo que incrementa la adhesión a monocitos y neutrófilos^{352-354,364}. Por otro lado, la ligación de FcγRIIIa en las plaquetas desencadena su desgranulación, así como la activación de integrinas, pero además pueden internalizar y eliminar bacterias opsonizadas por IgG^{355,365}.

Además de las funciones anteriores, las plaquetas pueden activar (y ser activadas) por el sistema del complemento³⁶⁶. Las plaquetas contienen C3, C4a, C1-inhibidor y factor H en sus gránulos α, y pueden liberar los dos últimos tras ser estimuladas con colágeno o trombina^{358,367-369}.

Por tanto, las plaquetas evitan la diseminación de los patógenos, bien al eliminarlos directamente o atraparlos para favorecer su eliminación (**Figura 6**) o, como se describe en el siguiente apartado, mediante la modificación fenotípica y/o funcional que provocan al interactuar con células inmunológicas.

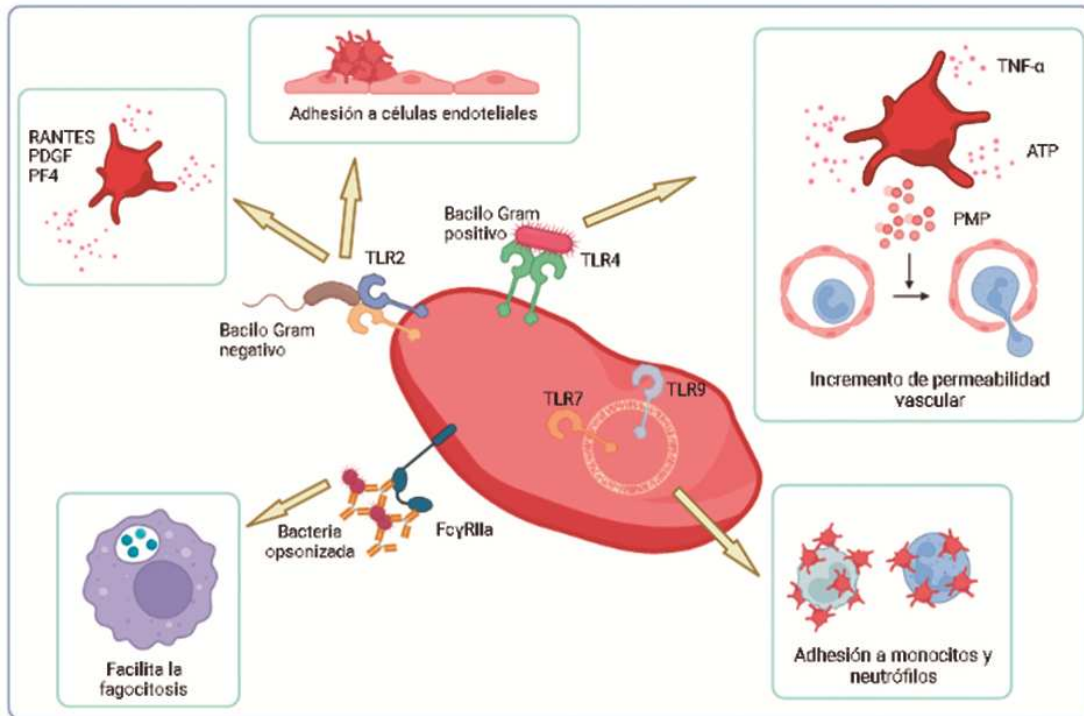


Figura 6. Funciones de las plaquetas como elemento de la inmunidad innata. Las plaquetas están dotadas de receptores de la inmunidad adaptativa, mediante los cuales pueden reconocer y responder a microbios. *TLR*, Toll-like receptor; *TNF*, tumoral necrosis factor; *PMP*, platelet-derived microparticles. (Creada con Biorender.com).

1.4.2. Interacción de las plaquetas con células de la inmunidad innata

La interacción de plaquetas con células de la inmunidad innata (además de con células de la inmunidad adaptativa) ha sido descrita ampliamente en los últimos años^{336,370,371}. La formación de complejos entre plaquetas y células inmunológicas ocurre en condiciones de homeostasis, pero puede modificarse, ya sea cuantitativa o cualitativamente, en infecciones u otras patologías. La interacción de plaquetas y leucocitos se ve incrementada en determinados procesos patológicos: enfermedades cardiovasculares, condiciones de inflamación tanto aguda como crónica y EAI³⁷²⁻³⁷⁷. Esta interacción incrementada o bien la desregulación de algunos de los efectos inmunomoduladores de las plaquetas sobre las células de la inmunidad innata podrían ser uno de los factores que contribuyen al desarrollo o la progresión de EAI.

De forma general, cuando se daña un vaso sanguíneo, las plaquetas se activan, se adhieren, cambian de forma y secretan el contenido de sus gránulos³⁷⁸. Las plaquetas activadas se caracterizan por exponer CD62P en su membrana, y esta es crítica tanto en los procesos hemostáticos como en las interacciones directas con las células inmunológicas³⁷⁹. La unión de las plaquetas con las células de la inmunidad innata ocurre predominantemente con neutrófilos y monocitos. Esta unión tiene consecuencias bidireccionales: la unión de plaquetas activadas inducen la activación de las células inmunológicas y éstas a su vez son capaces de incrementar aún más el estado activado de las plaquetas unidas³⁸⁰.

La interacción inicial y más importante tiene lugar por la unión de CD62P en la membrana de las plaquetas activadas con el PSGL-1 en la superficie de neutrófilos y monocitos^{381,382}. Además de este par de moléculas, también pueden interactuar GPIIb/Mac-1, en el caso de neutrófilos y monocitos y CD40-CD40L, GPIIb/IIIa-Mac-1, EMMPRIN (CD147/basigin)-CD147/GPVI, TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells*)-ligando de TREM-1 y PADGEM (*platelet activation dependent granule-external membrane protein*) en el caso de los monocitos (**Figura 7**)³⁸³⁻³⁸⁹. Además, las plaquetas activadas también pueden interactuar con monocitos a través de moléculas puente, como el fibrinógeno y la trombospondina^{390,391}. Una vez establecida la unión con el neutrófilo o el monocito, las plaquetas son capaces de ejercer efectos sobre ellas, señalizando intracelularmente por la activación de las propias moléculas que han interactuado, mediante la secreción de PMPs y/o por la secreción de mediadores solubles. La interacción por una u otras moléculas puede verse influida (además de por la expresión basal las propias moléculas en neutrófilos, monocitos y plaquetas) por el microentorno celular, que a su vez va a definir el tipo de efecto que provoque en los monocitos y en las mismas plaquetas. La interacción con las plaquetas puede potenciar en monocitos y neutrófilos una respuesta inflamatoria o inducir en ellos respuestas antiinflamatorias y de resolución de la inflamación, con el fin de modular respuestas excesivas o incontroladas. Esta hipótesis se ve reforzada por estudios en los que se observa que las plaquetas potencian la producción de TNF- α y la inflamación en ratones tratados con LPS a bajas dosis, pero a dosis altas de LPS, las plaquetas inhiben la secreción de citocinas proinflamatorias, mejorando la progresión clínica³⁹²⁻³⁹⁵.

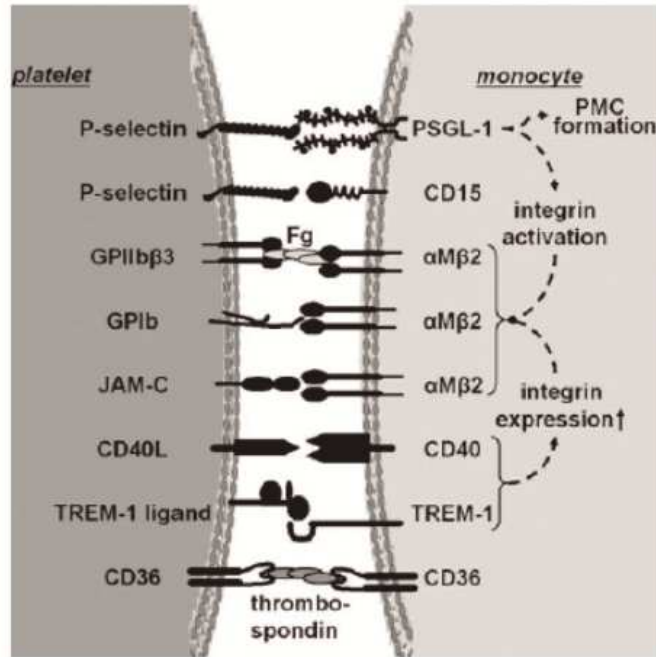


Figura 7. Interacciones moleculares entre la plaqueta y el monocito. (Van Gils et al, J Leukoc Biol, 2009).

1.4.2.1. Migración y extravasación

La unión de CD62P en las plaquetas activadas con el PSGL-1 en los neutrófilos induce la expresión de las $\beta 2$ -integrinas Mac-1 (CD11b/CD18 o CR3) y LFA-1 (*lymphocyte function associated 1*)³⁹⁶. Sin embargo, la interacción vía GPIb conduce a una disminución de la expresión de Mac-1³⁹⁵. Los gránulos α contienen potentes activadores para los neutrófilos, principalmente PF4 y CXCL7 que, al igual que CD62P, inducen la expresión de integrinas en los neutrófilos. Los gránulos δ liberan ADP y ATP, que activan receptores purinérgicos en los neutrófilos, induciendo también su extravasación^{377,397-400}. Además, una vez han sido reclutados, las plaquetas incrementan la supervivencia de los neutrófilos mediante la liberación de TGF- β ⁴⁰¹.

La capacidad de adhesión y migración de los monocitos puede verse incrementada por la interacción directa con las plaquetas, al inducirse en los primeros un incremento en la expresión de moléculas que participan en adhesión y migración: CD40, PSGL-1, CD11b y CCR2^{123,402}. Esta capacidad de migración también puede verse aumentada por factores solubles secretados por las plaquetas. La deposición de CCL5 (RANTES) en el endotelio inflamado induce el reclutamiento de monocitos, y el PF4 reduce la expresión de los receptores de

quimiocinas CCR1, CCR2 y CCR5, interfiriendo por tanto en la capacidad de migración de los monocitos^{403,404}. La secreción de PF4 también incrementa la supervivencia de los monocitos^{405,406}.

1.4.2.2. Fagocitosis y formación de NETs

La interacción directa entre plaquetas y neutrófilos, así como las PMPs, provocan un incremento en la fagocitosis y destrucción bacteriana por parte de los neutrófilos⁴⁰⁷⁻⁴¹⁰. Los factores solubles liberados por plaquetas activadas también son capaces de incrementar la eficiencia de la fagocitosis. El sCD40L estimula la producción de ROS mientras que la HMGB1 induce la translocación de mieloperoxidasa (MPO), enzima lisosomal con actividad microbicida, a la membrana del neutrófilo^{411,412}.

Las plaquetas también facilitan la generación del estallido respiratorio endógeno en los monocitos, lo que permite la eliminación de los patógenos fagocitados. La producción de ROS inducida por las plaquetas se produce tanto por interacción directa, a través de la unión Mac-1 con CD40L, como por factores solubles, concretamente el PF4^{413,414}. La secreción de PF4 incrementa no solo el estallido respiratorio de los monocitos, sino también su capacidad fagocítica^{405,406}.

La formación de NETs por parte de los neutrófilos puede ser inducida por el contacto directo vía P-selectina/PSGL-1, GPIb/Mac-1 o a través de mediadores solubles: HMGB1, ADP y ATP^{398-400,415-418}. Las NETs facilitan la destrucción de patógenos, pero también son un elemento que colabora en la finalización de la inflamación, al secuestrar citocinas y quimiocinas, por lo que la inducción de NETs por parte de las plaquetas podría considerarse un mecanismo antiinflamatorio⁴¹⁹.

1.4.2.3. Fenotipo y diferenciación de monocitos

Las plaquetas afectan a las funciones de los monocitos al modular su activación, polarización y diferenciación. Las plaquetas se unen de manera preferente a los monocitos que expresan CD16, pero además, mediante contacto directo pueden inducir el cambio fenotípico de

monocitos clásicos a monocitos intermediarios o no clásicos, que expresan CD16⁴²⁰. La interacción directa de plaquetas con monocitos también induce un incremento en la expresión de CD40, PSGL-1, CD11b y CCR2 en la superficie de los monocitos^{421,422}. Los efectos de la unión de las plaquetas sobre los monocitos se resumen en la **Figura 8**.

Los factores solubles liberados por las plaquetas también pueden afectar a la expresión de moléculas en la superficie del monocito. El TGF- β induce una mayor expresión de CD16, mientras que el PF4 induce la diferenciación de monocitos a macrófagos HLA-DR^{406,423}. Además, el PF4, cuando está en presencia de IL-4, induce la diferenciación de monocitos a unas APC especializadas con características fenotípicas y funcionales diferentes a macrófagos y DCs⁴²⁴. Estas células estimulan de forma preferente la proliferación de linfocitos y la actividad lítica de las células NK⁴²⁴.

1.4.2.4. Secreción de citocinas

La unión de plaquetas activadas a monocitos a través de la P-selectina/PSGL-1 induce la expresión de MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 y la proteína inflamatoria de macrófagos (*macrophage inflammatory protein 1 β* , MIP-1 β)^{425,426}. Según el tipo de estímulo (si es reconocido por TLR2 o 4), el efecto sobre la secreción de citocinas es diferente^{427,428}. Por tanto, en inflamación aguda, el efecto de las plaquetas sobre la liberación de citocinas proinflamatorias por parte de los monocitos parece depender del tipo de patógeno. Sin embargo, se desconoce el efecto que puedan tener las plaquetas sobre los monocitos en un ambiente inflamatorio crónico, en el que la maduración de los megacariocitos a plaquetas, así como la propia maduración de los monocitos puede verse alterada.

La interacción de plaquetas y monocitos a través de pares de moléculas diferentes a P-selectina/PSGL-1 podrían desencadenar efectos distintos. Las plaquetas pueden inducir funciones antiinflamatorias en los monocitos a través de la interacción GPIIb/IIIa-Mac-1³⁵⁶. También la interacción a través del CD40L/CD40, así como el sCD40L liberado por las plaquetas activadas, induce la secreción de IL-10 mientras que reduce la de TNF- α e IL-6 en monocitos estimulados por TLRs⁴²⁹. Por otro lado, la interacción de plaquetas opsonizadas con IgG a través de Fc γ R en monocitos en presencia de componentes bacterianos tiene un efecto inmunomodulador, provocando un incremento en la producción de IL-10 y una disminución de IL-1 β e IL-12⁴³⁰. Estas observaciones in vitro se ven apoyadas por estudios en ratones con

sepsis, en los que la inducción de trombocitopenia incrementa la mortalidad, mientras que la infusión de plaquetas la reduce^{356,395,430}.

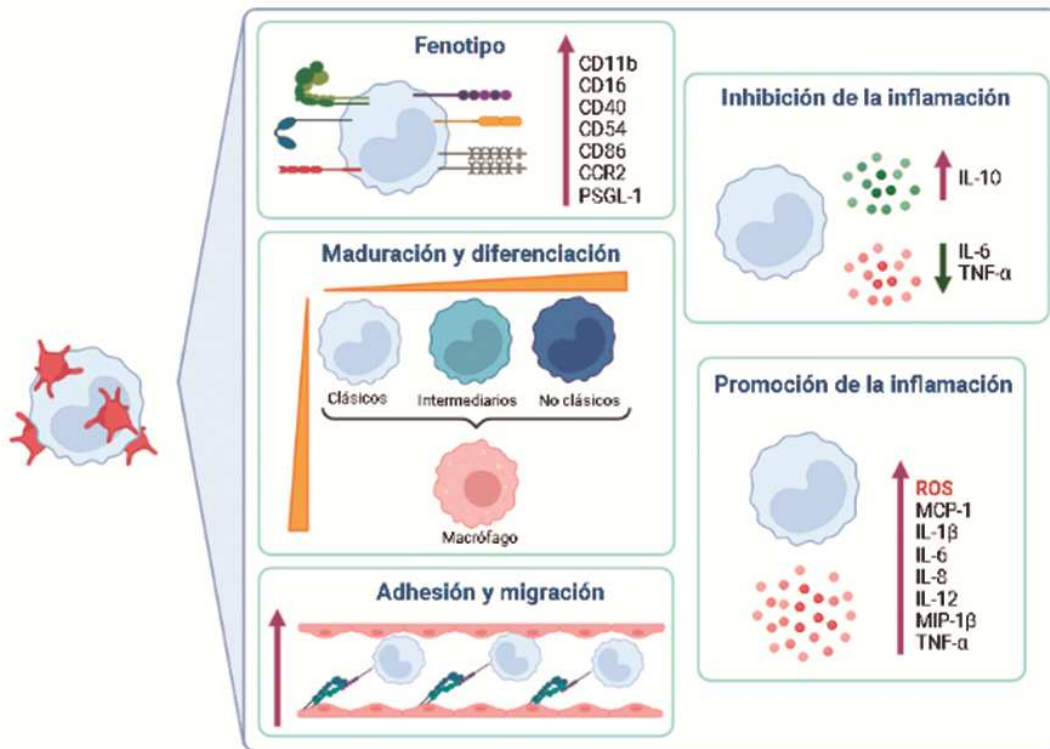


Figura 8. Consecuencias de la unión de la plaqueta al monocito. Las plaquetas son capaces de inducir o incrementar funciones pro o antiinflamatorias. (Creada con *Biorender.com*).

1.4.3. El papel de la plaqueta y su interacción con la inmunidad innata en LES y AR

En EAI, como LES y AR, las plaquetas están hiper-activadas^{431,432}. En LES el papel de las plaquetas es controvertido. Por un lado, participan en el aclaramiento de inmunocomplejos de IgG a través del FcγRIIa⁴³³. Sin embargo, a través del CD40L, las plaquetas estimulan la producción de IFN-α por parte de las pDCs y la producción de autoanticuerpos por las células plasmáticas⁴³⁴. En AR los inmunocomplejos formados por ACPA o FR son capaces de activar a las plaquetas. Se ha observado una correlación entre el porcentaje de ACPA respecto al total de IgG con la activación de plaquetas y con la actividad de la enfermedad³⁴². De hecho, dado que las plaquetas activadas expresan vimentina y fibrinógeno en su superficie, podrían ser una fuente de autoantígenos, ya que ambas proteínas son susceptibles a citrulinación⁴³². También la exposición a componentes de la matriz extracelular (principalmente colágeno) en las articulaciones inflamadas activa a las plaquetas a través del receptor de la GPVI, provocando

que éstas liberen PMPs con alto contenido en IL-1 β ⁴³⁵. Además, en AR hay un incremento de plaquetas circulantes, lo que se explica por una disminución del tiempo en que están circulando y una megacariopoyesis incrementada, en gran parte estimulada por IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α y factores de crecimiento que están aumentados en pacientes con AR^{432,436}. Esto hace que las plaquetas circulantes en AR sean más “jóvenes”: plaquetas más grandes y con mayor capacidad de activación⁴³⁷. De hecho, se han observado niveles incrementados de factores solubles derivados de plaquetas, como el CD62P soluble (sCD62P) o el PF4, que correlacionan con la actividad de la enfermedad⁴³⁸. Finalmente, las plaquetas pueden contribuir a la sinovitis en RA al activar a las células endoteliales, lo que mantiene la permeabilidad de la microvasculatura sinovial, permitiendo la migración celular⁴³⁹.

La unión de plaquetas a neutrófilos se ha visto incrementada en varias EAI, y esta unión se correlaciona con la activación de los neutrófilos³⁸⁹. La unión de plaquetas a monocitos se ha visto incrementada en varias EAI y procesos inflamatorios: aterosclerosis, diabetes tipo 1, artritis psoriásica, LES y AR^{386,440–443}. Esta unión puede tener en el monocito consecuencias pro o antiinflamatorias, dependiendo de la patología^{444–447}. En LES este incremento tiene consecuencias hasta el momento desconocidas. En AR se ha descrito que las plaquetas de pacientes pueden inducir la secreción de TNF- α y IL-6 en monocitos sanos específicamente a través de la ligación del CD147³⁸⁶. Sin embargo, las consecuencias de la unión de la plaqueta al monocito en el paciente de AR son también por el momento desconocidas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Cuando las plaquetas están activadas tienen una mayor capacidad de unión a células del sistema inmune, sobre todo a monocitos. En algunas patologías autoinmunes (entre ellas LES y AR), donde la proporción de plaquetas activadas es más elevada, se ha observado un incremento en el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas circulantes. Por otro lado, tanto en LES como en AR, los monocitos presentan un fenotipo más activado y diferenciado que los individuos sanos. Es posible que la unión de las plaquetas esté relacionada con estas diferencias en el fenotipo y/o función de los monocitos de los pacientes. Una posible consecuencia sería que la unión de las plaquetas a los monocitos, alterando su función, influiría en el estado inflamatorio de los pacientes y, por tanto, la actividad de la enfermedad, su evolución y la respuesta al tratamiento.

La hipótesis principal de esta tesis es que el contexto inflamatorio crónico generado en las EAI favorecería la unión de las plaquetas a los monocitos. A su vez, esta mayor unión de plaquetas a monocitos, podría influir en la inflamación. Además, las terapias inmunomoduladoras, que regulan la inflamación en los pacientes, podrían también regular la unión de las plaquetas a los monocitos.

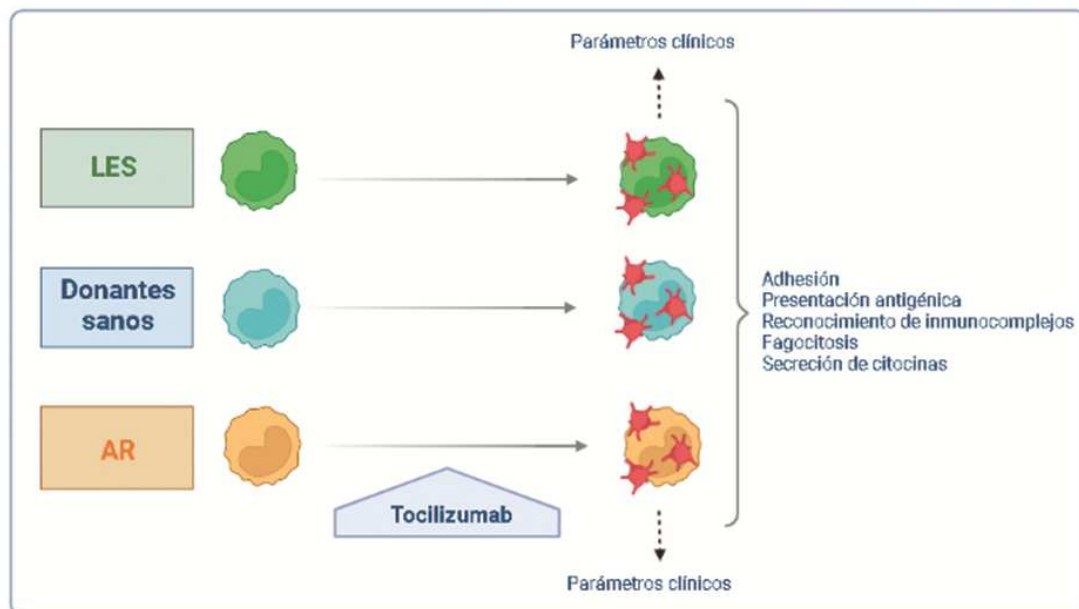


Figura 9. Esquema de la hipótesis. Marcado en azul los parámetros valorados en los objetivos de la tesis. (Creada con *Biorender.com*).

3.2. OBJETIVOS

GENERAL:

Comparar el número y la función de los monocitos con plaquetas unidas en individuos sanos y en pacientes con patologías autoinmunes, con el fin de establecer si hay diferencias y si existe relación entre los monocitos con plaquetas y los parámetros de actividad clínica de la enfermedad y de respuesta al tratamiento.

ESPECÍFICOS:

1. Determinar la proporción de monocitos con plaquetas unidas en individuos sanos y en pacientes con LES y AR.
2. Determinar los niveles de la principal molécula de unión del monocito a las plaquetas (PSGL-1) en individuos sanos y en pacientes con LES y AR.
3. Asociar el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en LES y AR con los parámetros clínicos e inmunológicos que constituyen los índices de actividad de la enfermedad.

En pacientes con LES con bajas dosis de tratamiento inmunosupresor (glucocorticoides <10 mg/día):

1. Evaluar las diferencias fenotípicas que presentan los monocitos con plaquetas unidas a los monocitos sin plaquetas unidas en individuos sanos y en pacientes con LES.
2. Determinar las variaciones funcionales a nivel de fagocitosis y de secreción de citocinas que presentan los monocitos con plaquetas unidas en individuos sanos y en pacientes con LES.

En pacientes con AR refractarios al tratamiento con DMARDs convencionales, y candidatos a tratamiento con tocilizumab:

1. Estudiar los cambios en los porcentajes de monocitos con plaquetas unidas y en la expresión de PSGL-1 en los monocitos en pacientes con AR tras el tratamiento con tocilizumab.
2. Relacionar los cambios en los porcentajes de monocitos con plaquetas unidas y en la expresión de PSGL-1 en los monocitos con la respuesta clínica al tratamiento con tocilizumab.

4. PUBLICACIONES

4.1. ARTÍCULO I

Phenotypic and Functional Consequences of PLT Binding to Monocytes and Its Association with Clinical Features in SLE

Anaís Mariscal, Carlos Zamora, Berta Magallares, Tarek Carlos Salman-Monte, Cesar Díaz-Torné, Iván Castellví, Héctor Corominas and Silvia Vidal.

International Journal of Molecular Sciences. 2021, Apr 29;22(9):4719.

Factor de impacto 5.924, Primer cuartil



Article

Phenotypic and Functional Consequences of PLT Binding to Monocytes and Its Association with Clinical Features in SLE

Anaís Mariscal ^{1,†}, Carlos Zamora ^{2,†}, Berta Magallares ³, Tarek Carlos Salman-Monte ⁴, M^a Àngels Ortiz ², Cesar Díaz-Torné ³, Iván Castellví ³, Héctor Corominas ³ and Silvia Vidal ^{2,*}

- ¹ Immunology Department, Hospital de la Santa Creu I Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), 08041 Barcelona, Spain; amariscal@santpau.cat
- ² Laboratory of Inflammatory Diseases, Hospital de la Santa Creu I Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), 08041 Barcelona, Spain; czamora@santpau.cat (C.Z.); mortiz@santpau.cat (M.À.O.)
- ³ Rheumatology Department, Hospital de la Santa Creu I Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; bmagallares@santpau.cat (B.M.); cdiazts@santpau.cat (C.D.-T.); icastellvi@santpau.cat (I.C.); hcorominas@santpau.cat (H.C.)
- ⁴ Rheumatology Department, Parc de Salut Mar/Hospital del Mar-IMIM, 08003 Barcelona, Spain; tareto4@gmail.com
- * Correspondence: svidal@santpau.cat
- † These authors contribute equally.



Citation: Mariscal, A.; Zamora, C.; Magallares, B.; Salman-Monte, T.C.; Ortiz, M.À.; Díaz-Torné, C.; Castellví, I.; Corominas, H.; Vidal, S. Phenotypic and Functional Consequences of PLT Binding to Monocytes and Its Association with Clinical Features in SLE. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4719. <https://doi.org/10.3390/ijms22094719>

Academic Editor: Isabella Russo

Received: 18 March 2021

Accepted: 26 April 2021

Published: 29 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Platelets (PLTs) can modulate the immune system through the release of soluble mediators or through interaction with immune cells. Monocytes are the main immune cells that bind with PLTs, and this interaction is increased in several inflammatory and autoimmune conditions, including systemic lupus erythematosus (SLE). Our aim was to characterize the phenotypic and functional consequences of PLT binding to monocytes in healthy donors (HD) and in SLE and to relate it to the pathogenesis of SLE. We analyzed the phenotypic and functional features of monocytes with non-activated and activated bound PLTs by flow cytometry. We observed that monocytes with bound PLTs and especially those with activated PLTs have an up-regulated HLA-DR, CD86, CD54, CD16 and CD64 expression. Monocytes with bound PLTs also have an increased capacity for phagocytosis, though not for efferocytosis. In addition, monocytes with bound PLTs have increased IL-10, but not TNF- α , secretion. The altered phenotypic and functional features are comparable in SLE and HD monocytes and in bound PLTs. However, the percentages of monocytes with bound PLTs are significantly higher in SLE patients and are associated with undetectable levels of anti-dsDNA antibodies and hematuria, and with normal C3 and albumin/creatinine levels. Our results suggest that PLTs have a modulatory influence on monocytes and that this effect may be highlighted by an increased binding of PLTs to monocytes in autoimmune conditions.

Keywords: platelets; monocytes; lupus; immune modulation

1. Introduction

Platelets (PLTs) have recently been recognized as immunoregulatory elements [1,2] that can modulate immune system responses by releasing soluble mediators (TGF- β , IL-1 β , PF4, RANTES or MIP1 α) or through interaction with immune cells [1,3–6]. In healthy individuals, PLTs preferentially bind to monocytes [7–10], mainly through P-selectin (CD62P)-PSGL-1 [11]. One consequence of this interaction is the promotion of cellular extravasation [12] via the up-regulation of expression and the functionality of integrins [13]. Another consequence is the induction of the expression and secretion of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and IL-8 [14]. Monocyte–PLT interaction decreases monocyte apoptosis [15] and leads to a phenotypic change of CD14+CD16- towards CD14+CD16+ monocytes [16] and to monocyte differentiation into macrophages [17]. However, it has recently been described that PLTs can also dampen inflammatory responses by

increasing IL-10 and decreasing IL-6 and TNF- α release by monocytes [18,19]. These opposed effects of PLTs on innate immune cells may be ruled by the PLT activation state [20,21] or by the blood flow microenvironment [22].

It is well known that monocytes and PLTs play a crucial role in SLE pathology. On the one hand, a decreased number of circulating monocytes and an increased ratio of non-classical vs. classical monocytes were observed in SLE patients [23,24]. SLE monocytes also have an altered phenotype and function: an increased expression of adhesion molecules [25], Fc receptors for IgG and co-stimulatory proteins, and a dysregulated cytokine secretion (decreased production of IL-1 [26] but an increased production of TNF- α [27], IL-6 [28] and IL-10 [12,13]). The phagocytosis of apoptotic cell material is also impaired in monocytes from SLE patients [29] and correlates negatively with the activity index and anti-dsDNA antibodies. The failed monocyte/macrophage clearance of apoptotic cells leads to secondary necrosis and the release of novel autoantigen clusters to trigger and/or sustain autoimmunity in SLE [30]. On the other hand, SLE PLTs are involved in the Fc γ RIIA-mediated clearance of IgG immune complexes [31]. In fact, PLTs express CD40L, which in SLE patients triggers the production of type I interferon, promoting the production of autoantibodies by plasma cells [32].

In addition to CD62P-PSGL-1, there are other ligands that can be involved in the binding of PLTs to monocytes: GPIIb-CD11b [33], CD40-CD40L [34], GPIIb/IIIa-CD11/CD18 [35], EMMPRIN (CD147/basigin)-CD147/GPIV [36,37], TREM-1-TREM-1 ligand [38] and PADGEM [39]. Most of these molecules are expressed on the surface of PLTs when they activate, and increased leukocyte-PLT complexes therefore suggest PLT activation [40]. However, each pair of molecules triggers different events in monocytes: an inflammatory function for CD62P-PSGL-1 and EMMPRIN (CD147/basigin)-CD147/GPIV ligation [36,37,41], while the triggering of anti-inflammatory functions is carried out through CD40L-CD40 [18].

Circulating monocytes with bound PLTs have been seen in healthy donors (HD) with unknown functional consequences. One possible consequence of the binding of PLTs to cells is to collaborate with monocytes/macrophages in eradicating bacterial infections. This mechanism has been proposed by Wong et al. as a transient “touch-and-go” interaction of PLTs with Kupffer cells [42]. In addition, there is an increased percentage of monocytes with bound PLTs in several inflammatory and autoimmune conditions, including atherosclerosis [43], type 1 diabetes [44], rheumatoid arthritis [37] and psoriatic arthritis [45]. Increased percentages of monocyte-PLT complexes in SLE have also been observed [8]. With the objective of determining the consequences of PLT binding to monocytes, we firstly studied the phenotypic and functional characteristics of monocytes with and without bound PLTs or activated PLTs in HD. Secondly, we compared the phenotypic and functional characteristics of monocytes with bound PLTs in HD and SLE patients, and finally, we associated monocytes with bound PLTs with the clinical and laboratory features of SLE patients. We found that monocytes with bound PLTs have altered phenotype and functions in both HD and SLE patients. SLE patients have higher percentages of monocytes with bound PLTs, and these are related to clinical features.

2. Results

2.1. Comparison of Phenotype and Function of Monocytes with and without Bound PLTs in HD

We observed higher percentages of PLT+ and PLT+CD62P+ in CD14+CD16+ and CD14loCD16++ than in CD14+CD16- (Figure 1A–C).

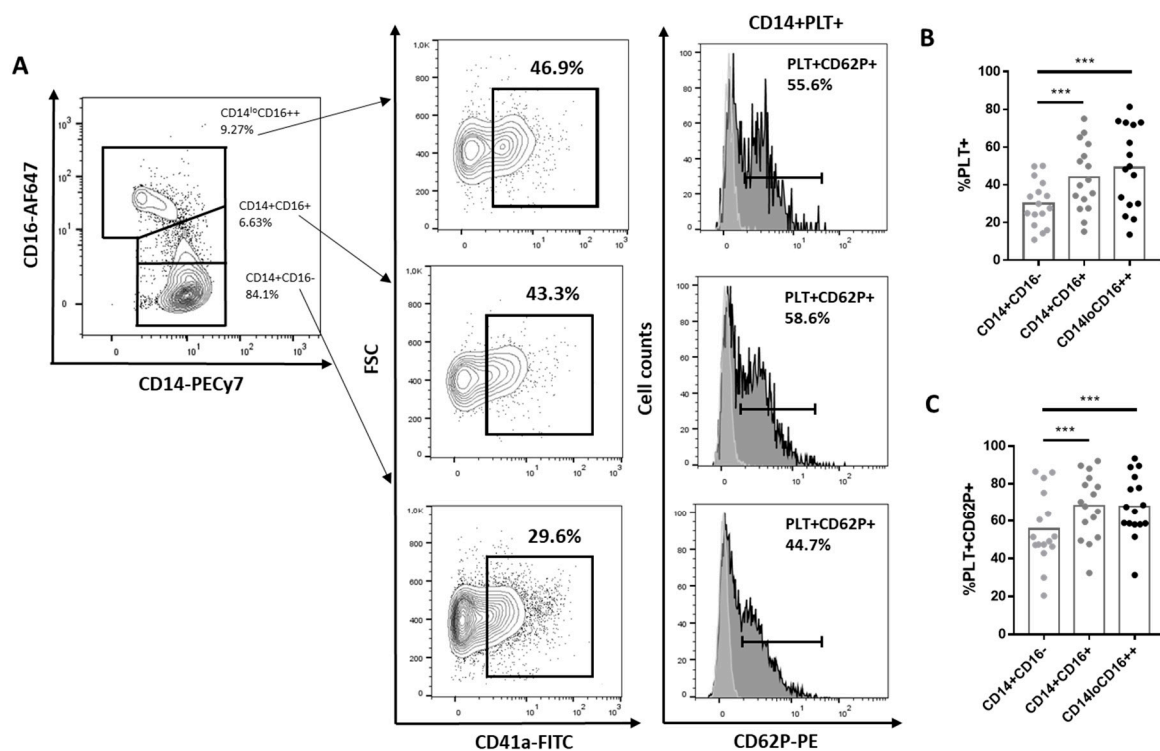


Figure 1. Percentage of CD14+CD16⁻, CD14+CD16⁺ and CD14+CD16⁺⁺ with bound platelets. (A) A representative experiment showing the gating strategy for identifying monocyte subsets CD14+CD16⁻, CD14+CD16⁺ and CD14+CD16⁺⁺. CD14⁺ with bound PLTs (CD14+CD41a⁺) and monocytes with activated bound platelets (CD14+CD41a⁺CD62P⁺) (dark histograms). Light grey histograms represent CD62P expression on each subpopulation of monocytes without PLTs. (B). Percentage of CD14+PLT⁺ in each monocyte subset from 16 independent experiments (C). Percentage of monocytes with activated bound platelets (PLT+CD62P⁺) in each CD14+PLT⁺ monocyte subset from 16 independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. *** $p < 0.001$.

When we compared CD14+PLT⁺ and CD14+PLT⁻, we did not find differences in the expression of chemokine receptors (CD15, CCR2), complement receptor (CD35) and certain adhesion molecules (CD31, CD49d, CD52, CD62L). However, CD14+PLT⁺ had a higher expression of antigen presentation molecules (HLA-DR, CD86), adhesion molecule CD54 and Fc receptors (CD16, CD64) than CD14+PLT⁻ (HLA-DR: 6.12 ± 2.28 , $p < 0.001$; CD86: 3.39 ± 1.04 , $p = 0.007$; CD54: 2.33 ± 1.36 , $p = 0.008$; CD16: 2.59 ± 1.53 , $p < 0.001$; CD64: 1.22 ± 0.57 , $p < 0.001$). CD14+PLT⁺CD62P⁺ and CD14+PLT⁺CD62P⁻ monocytes had a higher expression of CD86, CD54, CD16 and CD64 than CD14 + PLT⁻. CD14+PLT⁺CD62P⁺ monocytes had a more elevated expression of HLA-DR and CD54 than CD14+PLT⁺CD62P⁻ (Table S1, Figure S1).

When we analyzed the phagocytic function, we found that CD14+PLT⁺ showed a greater capacity for the phagocytosis of *E. coli* bioparticles than CD14+PLT⁻ (Figure 2A,B). However, we did not observe differences in efferocytosis (the phagocytosis of apoptotic neutrophils) between CD14+PLT⁺ and CD14+PLT⁻ (Figure 2C).

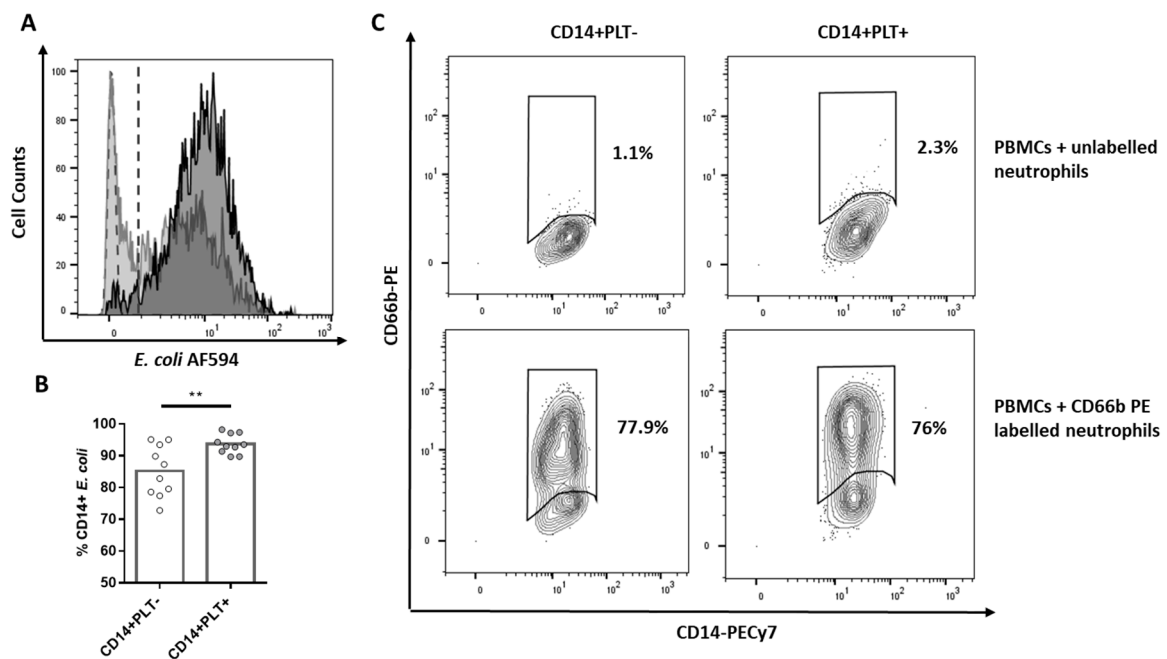


Figure 2. *E. coli* phagocytosis of HD monocytes with or without bound platelets. PBMCs were cultured with *E. coli* bioparticles stained with Alexa Fluor 594. (A) The representative overlapping histogram plot is shown with the phagocytosis of CD14+PLT- in light gray and of CD14+PLT+ in dark gray. PBMCs without *E. coli* (light green dotted histogram) are the control to set up threshold of negative cells. Dotted line indicates positivity threshold. (B) Phagocytosis of *E. coli* by CD14+PLT- and CD14+PLT+ from 10 independent experiments. (C) Phagocytosis of apoptotic neutrophils (efferocytosis). A representative experiment is shown ($n = 8$) from 6 independent experiments. Data are expressed as percentages of gated monocytes. The statistical analysis was performed using the paired *t*-test. ** $p < 0.01$.

After culturing monocytes with LPS, we found that CD14+PLT+CD62P+ and CD14+PLT+CD62P- secreted more IL-10 than CD14+PLT- (Figure 3A,C). However, there were no differences in the secretion of TNF- α between CD14+PLT+CD62P+, CD14+PLT+CD62P- and CD14+PLT- monocytes (Figure 3B,D).

2.2. Comparison of Phenotype and Function of Monocytes with Bound PLTs in HD and SLE Patients

In line with recent reports [21], we found that patients with SLE had a lower percentage of CD14+CD16- (88.49 ± 5.9 for SLE vs. 92.72 ± 2.59 for HD, $p = 0.017$) and a higher percentage of CD14^{lo}CD16⁺⁺ (6.21 ± 3.1 for SLE vs. 3.74 ± 1.19 for HD, $p = 0.017$) than HD. Interestingly, each subset of SLE monocytes had a higher percentage of monocytes with bound PLTs (Figure 4A), and the percentages of classical and intermediate monocytes with activated bound PLTs were also higher in SLE patients than in HD (Figure 4B). When we compared absolute counts, there were fewer monocytes (459.2 ± 176.8 monocytes/ μ L for SLE vs. 742.6 ± 94.5 monocytes/ μ L for HD, $p < 0.001$) and fewer monocytes without PLTs (201 ± 49.8 CD14+PLT-/ μ L for SLE vs. 425.9 ± 53.29 CD14+PLT-/ μ L for HD, $p < 0.001$) in SLE patients than in HD, but comparable levels of CD14+PLT+ counts (data not shown). No correlation was found between the percentages of CD14+PLT+ and PLT counts ($r = 0.130$, $p = 0.412$). However, we observed a significant correlation between the percentage of CD14+PLT+ and CD14+PLT+CD62P+ ($r = 0.940$, $p < 0.001$ for SLE; $r = 0.856$, $p = 0.006$ for HD) and between the percentages of CD14+PLT+ and free PLT CD62P+ in SLE patients and HD (Figure 4C). We also found a tendency towards a higher percentage of free PLT CD62P+ in SLE patients than in HD (12.04 (6.73–18.93) for SLE vs. 8.01 (4.75–12.24) for HD, $p = 0.06$).

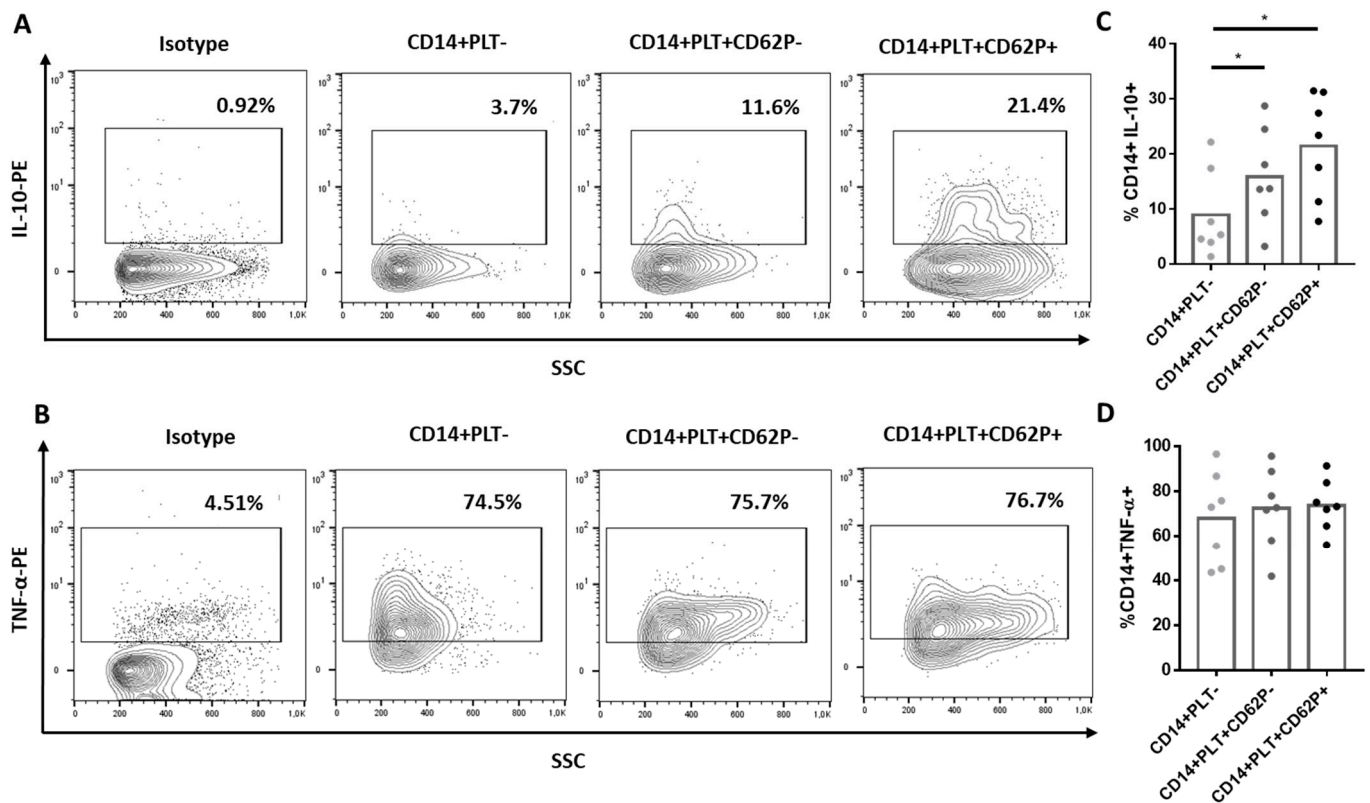


Figure 3. Cytokine production by monocytes without platelets (CD14+PLT⁻) and with non-activated (CD14+PLT+CD62P⁻) or activated (CD14+PLT+CD62P⁺) bound platelets. PBMCs were stimulated with LPS for 4 hours, and the secretion of IL-10 and TNF- α was analyzed by flow cytometry. A representative experiment is shown here ($n = 7$). The percentage of (A) IL-10⁺ or (B) TNF- α ⁺ cells on CD14+PLT⁻, CD14+PLT+CD62P⁻ or CD14+PLT+CD62P⁺ is shown. A comparison between percentages of (C) IL-10⁺ or (D) TNF- α ⁺ cells on CD14+PLT⁻, CD14+PLT+CD62P⁻ and CD14+PLT+CD62P⁺ is shown from 7 independent experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. * $p < 0.05$.

As in HD, a higher expression of HLA-DR, CD86, CD54, CD16 and CD64 was found on CD14+PLT+CD62P⁺ and CD14+PLT+CD62P⁻ than on CD14+PLT⁻ (Table S1). There were no differences in HLA-DR, CD54 and CD16 expression on monocytes between SLE patients and HD (data not shown). However, CD64 expression was higher on CD14+PLT⁻ from SLE patients than from HD (1.18 ± 0.49 for SLE vs. 0.88 ± 0.29 for HD, $p = 0.021$), and CD86 expression was lower on CD14+PLT+CD62P⁺ from SLE patients than from HD (2.9 ± 0.9 for SLE vs. 3.87 ± 1.36 for HD, $p = 0.023$).

Although there were no differences in *E. coli* phagocytosis between monocytes from SLE patients and HD, we found, similarly to HD, a higher percentage of CD14+PLT+ than CD14+PLT⁻ phagocytosed *E. coli* in SLE (Figure S2A). On the other hand, monocytes from SLE patients showed less efferocytosis than HD monocytes but without differences between CD14+PLT⁺ and CD14+PLT⁻ (Figure S2B).

Higher levels of plasma IFN- α , but not of IL-6 and IL-10, were observed in SLE patients than in HD (54.35 ± 23.04 for SLE vs. 7.3 ± 3.8 for HD, $p = 0.029$). No correlation between IFN- α , IL-6 or IL-10 with the percentage of CD14+PLT⁺ in SLE patients or in HD was observed (data not shown). Although there were no differences in the percentage of IL-10⁺ monocytes from SLE patients and HD, we found higher percentages of IL-10⁺ in CD14+PLT+CD62P⁻ and CD14+PLT+CD62P⁺ than in CD14+PLT⁻ monocytes (Figure S2C).

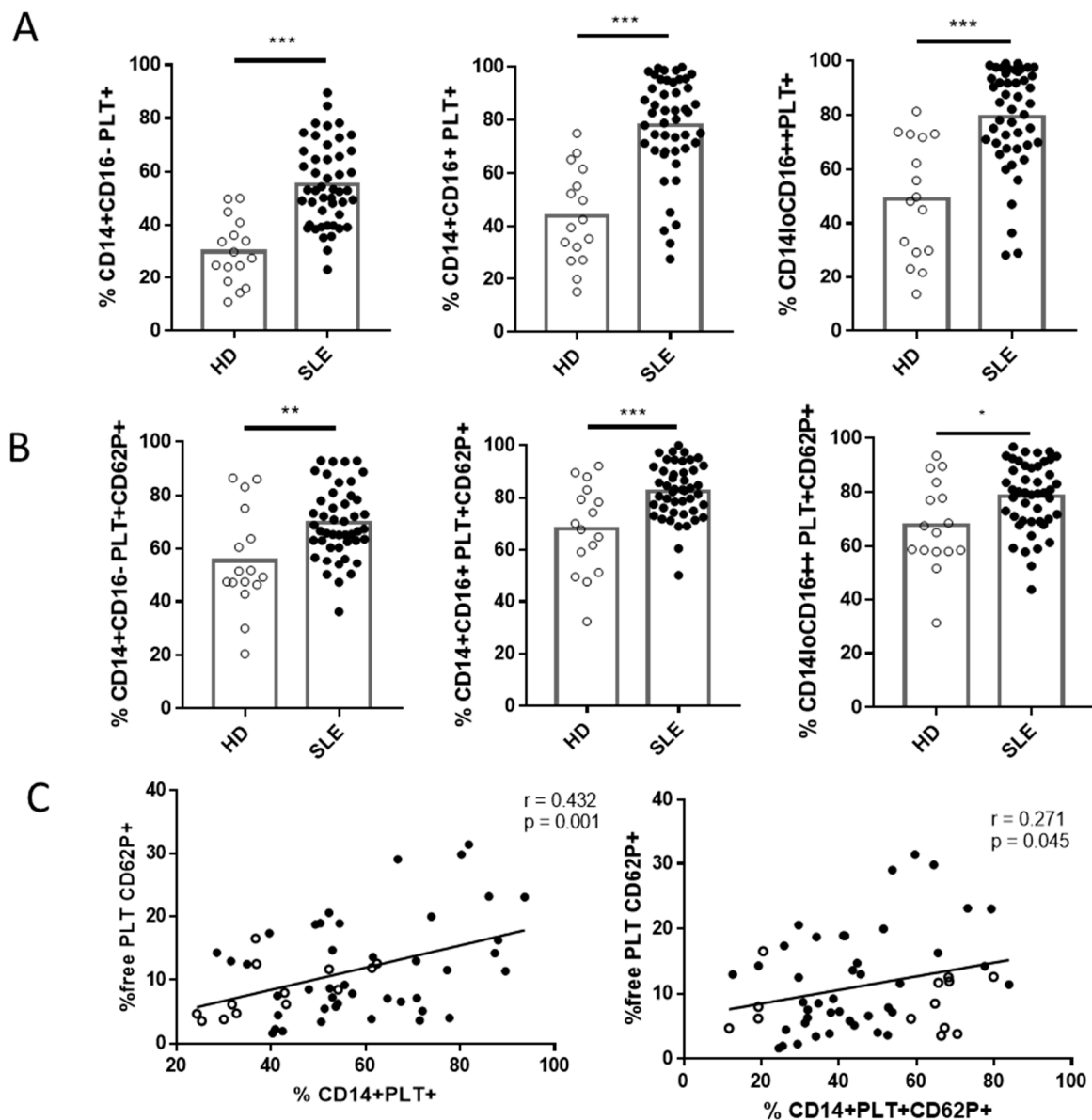


Figure 4. Monocytes with bound platelets and their relationship with free platelets in HD and SLE patients. (A) Percentage of monocyte subsets with bound platelets (PLT+) in HD and SLE patients. (B) Percentage of monocyte subsets with activated bound platelets (PLT+CD62P+) in HD and SLE patients. (C) Correlation between the percentage of CD14+PLT+ and CD14+PLT+CD62P+ with the percentage of free activated platelets (free PLT CD62P+) in HD and SLE patients. White circles represent HD ($n = 16$), and black circles represent SLE patients ($n = 49$). Statistical analysis was performed using the unpaired t -test (CD14+PLT+, CD14+PLT+CD62P+) for comparisons between HD and SLE and Spearman's correlation for correlation analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

2.3. Correlation of PSGL-1 and CD40 and Their Ligands sCD62P and sCD40L with CD14+PLT+ in SLE Patients and HD

We observed lower levels of PSGL-1 expression on monocytes from SLE than HD but no differences in the plasmatic sCD62P levels of SLE patients and HD. Differences in PSGL-1 expression between CD14+PLT-, CD14+PLT+CD62P- and CD14+PLT+CD62P+ were not observed in HD nor in SLE patients (data not shown). The percentage of CD14+PLT+ in SLE, but not in HD, correlated inversely with the expression levels of PSGL-1 and directly with plasma sCD62P levels (Figure 5A). The percentage of CD14+PLT+CD62P+ did not correlate with the expression of PSGL-1 on monocytes or plasma sCD62P in SLE patients or HD (data not shown).

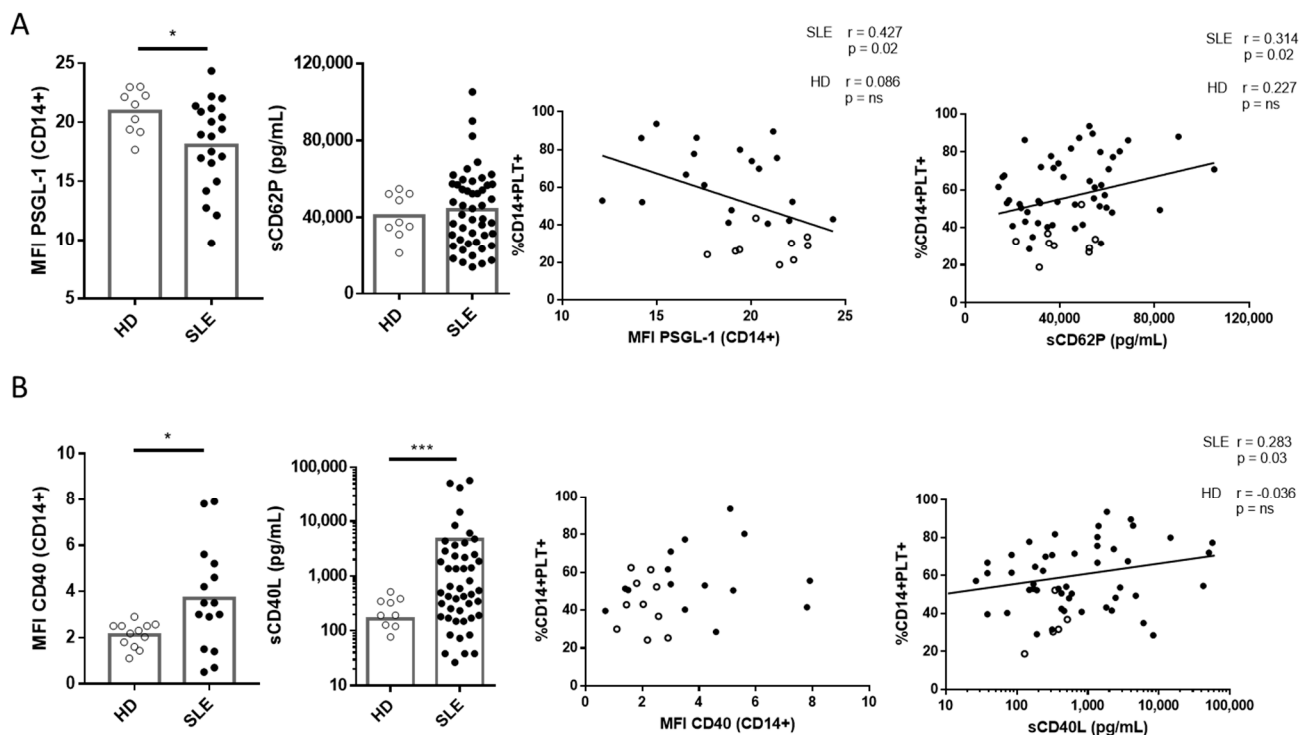


Figure 5. Expression of PSGL-1 and CD40 on monocytes and quantification of soluble CD62P (sCD62P) and CD40L (sCD40L) in plasma from HD and SLE patients and their association with the percentage of monocytes with bound platelets (CD14+PLT+). (A) PSGL-1 gMFI of monocytes from HD ($n = 9$) and SLE patients ($n = 20$). Levels of sCD62P in plasma from HD ($n = 9$) and SLE patients ($n = 49$). PSGL-1 and sCD62P correlations with the percentage of CD14+PLT+. (B) CD40 MFI of monocytes from HD ($n = 12$) and SLE patients ($n = 15$). Levels of sCD40L in plasma from HD ($n = 9$) and SLE patients ($n = 49$). CD40 and sCD40L correlations with the percentage of CD14+PLT+. White circles represent HD, and black circles represent SLE patients. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test for comparisons between HD and SLE and Pearson’s (PSGL-1 and sCD62P) or Spearman’s (CD40 and sCD40L) correlation for correlation analysis. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

We found higher levels of CD40 on monocytes from SLE patients than HD and higher plasmatic sCD40L levels in SLE patients than in HD. No correlation was found between CD40 expression on monocytes and the percentage of CD14+PLT+ or CD14+PLT+CD62P+ in SLE patients or HD (Figure 5B and data not shown). However, we observed that plasmatic sCD40L levels correlated with CD14+PLT+ but not with CD14+PLT+CD62P+ in SLE patients (Figure 5B and data not shown).

2.4. Relationship between CD14+PLT+ and Clinical Features in SLE Patients

We did not find any association between CD14+PLT+ and SLEDAI score ($r = 0.19$; $p = 0.18$). However, as SLEDAI is an activity index that integrates different parameters, we then analyzed them independently. SLE patients with anti-dsDNA antibodies had a lower percentage of CD14+CD16-PLT+ and CD14loCD16++PLT+ than those with undetectable levels of anti-dsDNA antibodies (Figure 6A). A negative correlation was found between the levels of anti-dsDNA antibodies and the percentage of CD14+CD16+PLT+, CD14loCD16++PLT+, CD14+CD16+PLT+CD62P+ and CD14loCD16++PLT+CD62P+ (Figure S4). SLE patients with anti-Sm antibodies had a lower percentage of the three monocyte subsets with bound PLTs (Figure S3A). SLE patients with anti-C1q antibodies also had a lower percentage of CD14+CD16+ and CD14loCD16++ with bound PLTs (Figure S3B). There were no differences in the percentage of CD14+PLT+ when patients were segregated according to the presence of anti-SSA, anti-SSB, anti-U1RNP or anti-phospholipid antibodies (data not shown). There were no differences either in the percentage of CD14+PLT+CD62P+ when

segregated according to anti-dsDNA (Figure S3C), anti-Sm, anti-C1q, anti-SSA, anti-SSB, anti-U1RNP or anti-phospholipid antibodies (data not shown).

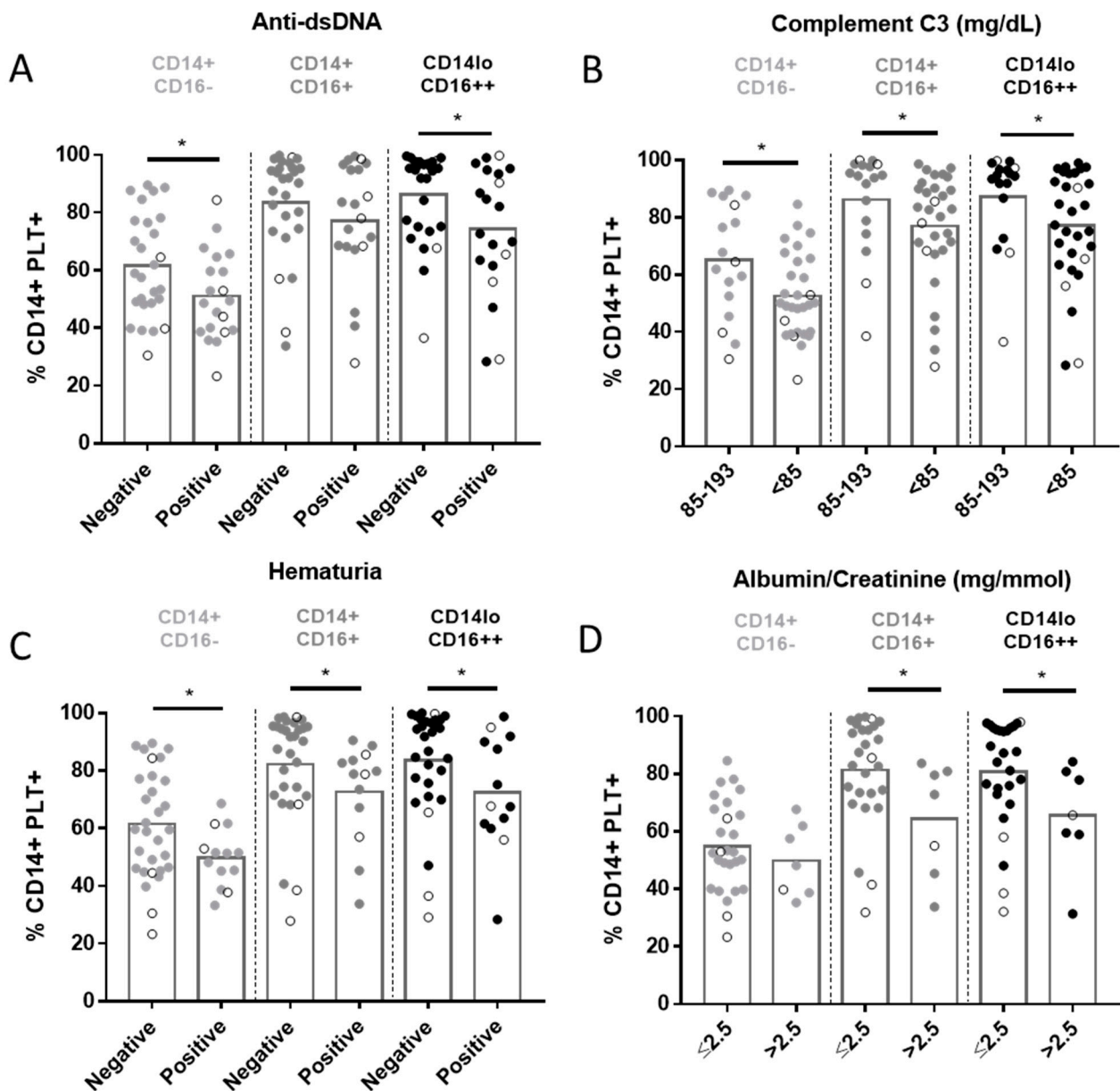


Figure 6. Percentage of monocyte subsets with bound platelets in SLE patients and clinical features. Comparisons of the percentages of monocyte subsets with bound platelets (CD14+PLT+) in SLE patients segregated according to (A) positive or negative anti-dsDNA, (B) <85 or 85–193 mg/dL of C3, (C) positive or negative hematuria and (D) >2.5 or ≤2.5 mg/mmol of albumin/creatinine are shown ($n = 49$). Patients undergoing treatment with mycophenolate are marked with white circles. The statistical analysis was performed using the unpaired t -test. * $p < 0.05$.

SLE patients with low C3 levels (<85 mg/dL) and those with hematuria had lower percentages of the three subsets of CD14+PLT+ than patients with normal C3 levels (85–193 mg/dL) and those without hematuria (Figure 6B,C), respectively. There were no differences in the percentage of CD14+PLT+CD62P+ when segregating according to C3 levels (Figure S3E). SLE patients with hematuria had lower percentages of CD14+CD16+PLT+CD62P+ than SLE patients without hematuria (Figure S3D).

SLE patients with albumin/creatinine levels >2.5 mg/mmol showed lower percentages of CD14+CD16+PLT+, CD14loCD16++PLT+ and CD14+CD16+PLT+CD62P+ than

those with normal levels (≤ 2.5 mg/mmol) (Figure 6D and Figure S3F). Comparable percentages of each subset of CD14+PLT+ were observed when SLE patients were segregated according to cutaneous or articular manifestations or according to prednisone, hydroxychloroquine and azathioprine medication. Interestingly, lower percentages of CD14+PLT+ were observed when SLE patients were segregated according to treatment with or without mycophenolate (48.08 ± 15.32 treated patients; 62.31 ± 15.5 not-treated patients; $p = 0.028$).

3. Discussion

Our results showed that PLTs can bind to monocytes, altering their phenotype and function. HD and SLE monocytes with bound PLTs and, especially, with activated bound PLTs showed an up-regulation of co-stimulation, adhesion and Fc receptor molecules, and an increased phagocytosis and IL-10 secretion. However, the percentages of monocytes with bound PLTs and with activated bound PLTs were higher in SLE than in HD. In addition, we found that monocytes from HD and SLE had a different expression of the key molecules responsible for PLT binding to monocytes, suggesting that each binding generates a characteristic signaling. The association of monocytes with PLTs with SLE clinical characteristics suggests that the increased binding and different signaling of PLTs to monocytes may be factors contributing to SLE pathology.

We showed that CD14+PLT+, and especially CD14+PLT+CD62P+, had an increased expression of HLA-DR, CD86, CD54, CD16 and CD64, suggesting, in line with other studies, an increased activation state [14,46], antigen presentation, adhesion capacity and phagocytosis of opsonized particles [47,48]. These findings are in concordance with other authors that previously reported an up-regulation of CD86 and CD16 on monocytes with bound PLTs compared with those without bound PLTs in HD [16,18]. However, with current experiments we are not able to conclude whether the binding of PLTs to monocytes induces the up-regulation of these markers or whether PLTs bind to monocytes with an activated state.

Although we found that CD14+PLT+ had an increased phagocytosis of *E. coli*, monocytes with bound PLTs did not have more efferocytosis ability than CD14+PLT-. It has been described that PLTs can recognize bacteria and their products via TLR4 and opsonize them, inducing subsequent phagocytosis [49–52]. Therefore, it is likely that the increased phagocytosis of CD14+PLT+ is due to an enhanced adhesion caused by the additional TLR4 expression from the PLTs. It remains to be determined whether the monocyte and/or the bound PLTs are responsible for *E. coli* binding. This explanation cannot be applied to efferocytosis because the “eat-me signals” responsible for efferocytosis are recognized by a series of membrane and soluble receptors that are not on PLTs.

Our results showed that CD14+PLT+, especially CD14+PLT+CD62P+, had an increased percentage of IL-10-secreting cells compared with CD14+PLT-. Previous studies have found that CD14+CD16+ monocytes are the main IL-10 producers [53]. Since we observed that CD14+CD16+ monocytes were the subset of monocytes with the most bound PLTs, this fact could explain the greater IL-10 production by CD14+PLT+. Previous studies have described an increase in IL-10 production by monocytes when PBMCs were co-cultured with PLT-rich plasma [18]. These authors found that soluble factors are the main molecules responsible for the increase in IL-10. However, in our experimental system, where there was no external supply of activated PLTs, we detected that both bound PLT+CD62P- and PLT+CD62P+ are associated with a higher IL-10 secretion by monocytes. Despite the IL-10 differences, we found comparable percentages of TNF- α -secreting cells between CD14+PLT+ and CD14+PLT-. Gudbrandsdottir et al. described a reduction in TNF- α secretion by PBMCs co-cultured with activated PLTs. They hypothesized that increased production of IL-10 by PBMCs down-regulates TNF- α secretion. It is possible that, in our experiments, without additional activated platelets, the amount of IL-10 was not enough to down-regulate TNF- α . Furthermore, Gudbrandsdottir et al. measured the released TNF- α in culture supernatants, and differences in methodology may also explain the discrepancies in results.

We found that the three monocyte subsets of SLE patients had an increased percentage of bound PLTs and activated PLTs compared with HD. In line with this, Joseph et al. described an increase in CD14+PLT+ and higher PLT activation in SLE patients [54]. Both our findings and those of Joseph et al. are consistent with previous observations arguing that the percentage of CD14+PLT+ is a marker of PLT activation [40].

Upon analyzing the molecules that may be involved in the binding of PLTs to monocytes, we found that SLE monocytes with and without platelets have a lower expression of PSGL-1 than HD. Some authors have reported the down-regulation of PSGL-1 on myeloid innate cells in an inflammatory context. Marsik et al. found that endotoxin down-regulates PSGL-1 expression on human monocytes [55]. Other authors have observed a down-regulation of PSGL-1 on monocytes from HIV patients or after leukocyte activation [56,57]. Further experiments will reveal whether the lower expression of PSGL-1 on monocytes in all these pathologies is due to a down-regulation or to an increased shedding. Interestingly, in SLE patients, this PSGL-1 expression is inversely correlated with the percentage of CD14+PLT+. In our experimental system we cannot rule out that the lower expression of PSGL-1 may be due to a misdetection due to PLT binding. However, this explanation is unlikely because in HD we did not find any correlation between PSGL-1 and the percentage of CD14+PLT+. Additionally, since we found a decreased detection of PSGL-1 on monocytes from SLE patients, we can speculate that other molecules could be contributing to monocyte–PLT interaction. Thus, we found a higher expression of CD40 on monocytes in SLE patients compared with HD. This finding, along with the lower PSGL-1 expression on SLE monocytes and the higher activation of PLTs (by the surrogate marker sCD40L), suggests that CD40–CD40L is another pair that contributes to the binding of PLTs to monocytes in SLE patients. In line with this, Gudbrandsdottir et al. found that activated PLTs had anti-inflammatory properties related to the interaction between CD40L and CD40 [18]. It has been hypothesized that an aberrant expression of CD40 on SLE monocytes may promote the proliferation of autoreactive lymphocytes and the generation of autoantibodies through excess CD40–CD40L interactions [58]. Therefore, it is tempting to speculate that the ligation of CD40 on monocytes with CD40L on PLTs prevents monocyte–lymphocyte interaction and the generation of autoantibodies.

Regarding PLT activation, we found a tendency towards a higher percentage of free PLT CD62P+ and higher percentages of monocytes with bound PLTs in SLE than in HD, which are two markers of PLT activation [40]. Although we did not find differences in sCD62P plasma levels between SLE and HD, Joseph et al. observed increased plasma sCD62P in SLE [8]. This apparent discrepancy may be due to differences between the two cohorts of patients, since the patients in Joseph et al. were younger than those in our cohort, and PLT activation status is thought to be affected by age [59]. In line with PLT activation, we also observed an increased concentration of plasma sCD40L in patients with SLE than in HD. Although lymphocytes also secrete sCD40L [60], sCD40L increase is more likely due to PLT activation. Some authors have reported an increased activation of PLTs from SLE patients [61].

The lowest percentages of CD14+PLT+ were found in SLE patients with active disease and renal manifestations. This seems to contradict our previous studies, which showed that SLE patients with active disease and renal manifestations had the highest percentages of B and T lymphocytes with bound PLTs [62]. However, we found no correlation between the percentages of myeloid and lymphoid cells with bound PLTs (Figure S5) in these patients. There are at least two possible explanations for this discrepancy. First, monocytes are more sensitive to PLT activation than lymphocytes [63]. Second, numerous pairs of molecules have been identified as participating in the binding of PLTs to monocytes, while only a few have been identified in the binding of PLTs to lymphocytes (CD62P–PSGL-1, GPIIb–CD11b, CD40–CD40L, GPIIb/IIIa–CD11/CD18) [64]. We can therefore speculate that there is a different functional consequence of PLT binding to myeloid or lymphoid cells when caused by a different signaling molecule.

Although we found an association of monocytes with bound PLTs with more IL-10 production but with less autoantibodies, we did not find an association of IL-10 with autoantibodies or disease activity. Concordantly, other studies have not shown IL-10 association with disease activity [65]. Furthermore, treatment with anti-IL-10 antibody causes joint and cutaneous improvement, but not anti-dsDNA decrease [66], and anti-IL-10 autoantibodies are related to increased serum IgG levels [67]. However, others have described that IL-10 acts as a growth, differentiation [68] and anti-apoptotic factor on B lymphocytes [69] and that this cytokine correlates with disease activity and dsDNA titers [70]. The apparent contradiction between IL-10 and autoantibodies in different reports of SLE could be explained by different treatments, disease activity or demographic characteristics as well as different quantification methods. Further studies taking into account all these factors should be performed to establish a definitive relationship between IL-10 and autoantibodies in SLE.

Our study has some limitations. One is that we did not analyze the influence of monocytes with bound PLTs over other leukocytes. We could speculate that the binding of PLTs to monocytes could regulate membrane and soluble molecules involved in neutrophil attraction and stimulation and/or lymphocyte activation. Another limitation of our study is that we excluded patients receiving a dose of glucocorticoids higher than 10 mg/day in order to avoid the influence of this treatment on results. This exclusion may have biased the cohort to a less severe one, and it may explain the low frequency of patients with anti-dsDNA antibodies compared with other cohorts [71]. With our current approach, we cannot discriminate whether the increased percentage of CD14+PLT+ is involved in the development of SLE or if it is a consequence of the disease status. Further studies analyzing the same patient in terms of flare and remission will reveal whether monocyte-PLT complexes are a useful tool for following up SLE activity and clinical manifestations. Nevertheless, our findings suggest that a better understanding of monocyte-PLT interaction would be beneficial for the therapeutic regulation of autoimmunity.

4. Materials and Methods

4.1. Study Subjects and Sample Collection

Whole blood from 16 HD and 49 SLE patients was collected in heparin-BD vacutainer tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). SLE diagnosis was based on 1982 revised ACR criteria [72]. To assess disease activity, Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI) was calculated at the time of sample collection [73]. The demographic, clinical and laboratory data of SLE patients enrolled in this study are shown in Table 1. Written informed consent was obtained and ethical approval for the study was granted by the Hospital de la Santa Creu I Sant Pau Institutional Ethics Committee.

4.2. Staining of Whole Blood Cells and Flow Cytometry Analysis

Whole blood (100 μ L) was incubated with anti-CD16 AF647 clone 3G8, anti-CCR2 AF647 clone K036C2 (BioLegend, San Diego, CA, USA), anti-CD15 PE clone MEM-158, anti-CD31 PE clone MEM-05, anti-CD35 FITC clone UT11, anti-CD41a-FITC, anti-CD41a-APC clone HIP8, anti-CD52 PE clone HI186, anti-CD62P-PE, anti-CD62P-APC clone HI62P, anti-HLA-DR-FITC clone MEM-12, anti-CD54-PE clone 1H4 (Immunotools, Friesoythe, Germany), anti-CD14-PECy7 clone M5E2, anti-CD49d FITC clone 9F10, anti-CD62L APC clone DREG-56, anti-CD64-PE clone 10.1 and anti-CD86-PE clone 2331 (FUN-1) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Red blood cells were lysed and white cells were fixed using BD FACS lysing solution (BD Biosciences) to be analyzed by flow cytometry. Samples were acquired with the MACS-Quant Analyzer 10 flow cytometer (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and we determined the count of cells/ μ L, the percentages of cells and the geometric mean fluorescence intensity (gMFI) using FlowJo vX. CD41a+ PLTs/ μ L were quantified by flow cytometry. Activated PLTs were identified as CD41a+CD62P+. Monocytes were gated according to the expression of CD14. Three subsets of monocytes were gated according to the expression of CD14 and CD16 [74]: classical (CD14+CD16-),

intermediate (CD14+CD16+) and non-classical monocytes (CD14loCD16++). Monocytes with bound PLTs were identified as CD41a+, and those with bound activated PLTs were identified as CD41a+CD62P+.

Table 1. Demographic, clinical and laboratory characteristic data of study patients.

General Conditions	SLE Patients	Healthy Donors
Age in years, mean \pm SD	50.4 \pm 15.29	52.2 \pm 17.7
Gender, % (<i>n</i>) women	93.75 (45)	90 (18)
Years of development, median (IQR)	9 (3–17)	
SLEDAI, mean (range)	2.89 (0–10)	
Laboratory parameters		
C3 (mg/dL, median (IQR))	75.1 (63.03–100.8)	
Decreased C3 or C4, % (<i>n</i>)	66.7 (32)	
Positive anti-dsDNA, % (<i>n</i>)	41.7 (20)	
Positive ANA, % (<i>n</i>)	91.7 (44)	
Positive anti-Sm, % (<i>n</i>)	23 (11)	
Positive anti-C1q, % (<i>n</i>)	43 (20)	
Positive anti-SSB-La, % (<i>n</i>)	16 (7)	
Positive anti-SSA-Ro, % (<i>n</i>)	44 (20)	
Positive anti-U1-RNP, % (<i>n</i>)	30 (14)	
Positive antiphospholipid antibody, % (<i>n</i>)	27 (13)	
Leukopenia and/or lymphopenia, % (<i>n</i>)	37.5 (18)	
Clinical features, % (<i>n</i>)		
Renal involvement	41.7 (20)	
Hematuria	27.1 (13)	
Albumin/creatinine > 2.5	14.6 (7)	
Cutaneous involvement	18.8 (9)	
Arthritis	14.6 (7)	
Treatment, % (<i>n</i>)		
None	6 (3)	
Mycophenolate	17 (8)	
Prednisone	37 (18)	
Hydroxychloroquine	79 (38)	
Azathioprine	8 (4)	

4.3. IL-10 and TNF- α Secretion Assays

IL-10 or TNF- α production was analyzed on CD14 +PLT-, CD14 +PLT+CD62P-, and CD14+PLT+CD62P+ monocytes after ultrapure TLR4 agonist lipopolysaccharide (LPS) (Invivogen, San Diego, CA, USA) stimulation using the IL-10 or TNF- α secretion assay (MiltenyiBiotec), as previously described [62]. Briefly, after 4 hours of LPS stimulation (1 μ g/mL), PBMCs were labeled with IL-10- or TNF- α -specific catch reagent and incubated under slow rotation. Cells were washed and labeled with the IL-10-PE or TNF- α -PE detection antibody, CD14-PECy7 (BD Biosciences), CD41a-FITC and CD62P-APC (Immuntools), and the viability marker LIVE/DEAD fixable Violet Dead Cell Stain kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Membrane IL-10 or TNF- α was analyzed by flow cytometry.

4.4. Phagocytosis Assays

PBMCs were incubated with *E. coli* bioparticles conjugated with Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at a proportion of 1:5 for 2 hours at 37 °C and at 4 °C. Cells were then surface stained with anti-CD14-PECy7 and anti-CD41a-APC and analyzed by flow cytometry. We included two negative controls. One was samples incubated at 4 °C, a condition to abolish metabolism for discarding surface binding. The second negative control was samples incubated at 37 °C without *E. coli* Alexa Fluor 488, to establish cell autofluorescence. Then, *E. coli* phagocytosis was established as the percentage of CD14+ cells that were positive for Alexa Fluor 488 at 37 °C.

4.5. Apoptosis Analysis of Neutrophils and Efferocytosis Assays

Neutrophils were collected from the pellet after Ficoll centrifugation (Ficoll-Hypaque gradient centrifugation). Red blood cells were removed by RBC Lysis Buffer (Biolegend). Neutrophils (1×10^6 cells/mL) were left for 48 hours in 5% CO₂ at 37 °C in complete medium. Apoptotic and necrotic neutrophil rates were analyzed by flow cytometry after staining with anti-CD66b-PE (BD Biosciences), FITC-conjugated Annexin V (Immunotools) and Propidium-Iodide (Bender medsystems, ebioscience, San Diego, CA, USA), as previously described [75]. PBMCs were co-cultured for four hours at 37 °C at a 1:4 ratio with apoptotic neutrophils previously stained with anti-CD66b-PE or unstained for fluorescence minus one (FMO) control. To discard surface binding, the co-culture of neutrophils and PBMCs was also performed at 4 °C. After co-culture, cells were washed twice with PBS and surface stained with anti-CD14-PECy7, anti-CD41a-FITC and anti-CD62P-APC. We did not observe CD14+CD66b+ cells in samples incubated at 4 °C. Monocytes that had engulfed apoptotic neutrophils were identified as CD14+CD66b+ cells by flow cytometry according to FMO control.

4.6. Determination of IFN- α , IL-6, IL-10, sCD62P and sCD40L Levels

Plasma concentrations of IFN- α (Mabtech, Stockholm, Switzerland), IL-6 (Immuno-tools), IL-10 (Immuno-tools), sCD62P (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and sCD40L (Peprotech, London, UK) were determined using specific ELISA kits according to the manufacturers' instructions and using the specific standard curves of recombinant molecules. The limits of detection were as follows: 2 pg/mL for IFN- α , 8 pg/mL for IL-6, 16 pg/mL for IL-10, 125 pg/mL for sCD62P and 31.25 pg/mL for sCD40L.

4.7. Quantification of Autoantibodies, C3, Albumin/Creatinine and Hematuria

Anti-dsDNA, Sm, SSB-La, SSA-Ro and U1-RNP levels were determined in serum using BIO-FLASH®chemiluminescence (Werfen, Barcelona, Spain). Anti-C1q levels in serum were quantified by Quanta Lite Anti-C1q ELISA (Inova Diagnostic, San Diego, CA, USA). Anti-histone presence in serum was established using Euroline ANA Perfil (Euroimmune, Lübeck, Germany). Levels of C3 in serum were determined using the Nephelometry System (Beckman Coulter Diagnostics, Nyon, Switzerland). Albumin/creatinine ratio was determined in serum by the turbidimetry system (Abbott, Chicago, IL, USA). The presence of hematuria was determined by the Combur test (Roche, Basilea, Switzerland). Anti-dsDNA antibodies were considered positive when levels were >35 UI/mL. Sm, SSB-La, SSA-Ro and U1-RNP antibodies were considered positive when levels were >20 Chemo-luminescence Units and C1q when levels were >20 U/mL according to manufacturer's study. C3 levels were considered decreased when they were below 85 mg/dL according to manufacturer's study. Microalbuminuria was considered when albumin/creatinine ratio was >2.5 mg/mmol.

4.8. Statistics

Statistical analyses were performed using Graph PadPrism 7 software. The Kolmogorov–Smirnov test was applied to test the data for normal distribution. Normally distributed variables were then reported as mean \pm SD, and non-parametric distributed variables were reported as median (interquartile range) (IQR). SLEDAI was expressed as mean (range). Comparisons of 3 groups were tested with one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc test. Comparisons between 2 groups were tested with the student's (paired or unpaired) *t*-test, Mann–Whitney test, or Wilcoxon test according to Gaussian distribution. Correlation analyses were carried out with Pearson's or Spearman's correlation according to Gaussian distribution. *p*-values < 0.05 were considered significant.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22094719/s1>, Figure S1. Phenotype of monocytes without platelets (CD14+PLT-) and with non-activated (CD14+PLT+CD62P-) or activated (CD14+PLT+CD62P+) platelets in HD. Figure S2.

Functional characterization of monocytes with bound platelets in SLE patients. Figure S3. Percentage of monocyte subsets with bound platelets and activated bound platelets in SLE patients according to clinical features. Figure S4. Correlation of monocyte subsets with bound platelets and activated bound platelets with anti-dsDNA titers in SLE patients. Figure S5. Correlation of monocytes with bound platelets and lymphocytes with bound platelets in SLE patients. Table S1. Expression of HLA-DR, CD86, CD54, CD16 and CD64 on monocytes without bound platelets (CD14+PLT⁻) and monocytes with non-activated (CD14+PLT+CD62P⁻) or activated bound platelets (CD14+PLT+CD62P⁺) in HD and SLE patients.

Author Contributions: Conceptualization, C.Z. and S.V.; methodology, A.M. and M.À.O.; software, A.M.; validation, A.M., C.Z. and S.V.; formal analysis, A.M.; resources, B.M., T.C.S.-M., C.D.-T., I.C. and H.C.; writing—original draft preparation, A.M.; writing—review and editing, C.Z. and S.V.; visualization, C.Z. and S.V.; supervision, C.Z. and S.V.; project administration, S.V.; funding acquisition, S.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study is supported by Instituto de Salud Carlos III and Fondos FEDER (PI17/00072 and PI20/00184).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of Biomedical Research Insitute Sant Pau IIBSP-PLT-2018-004 date of approval 3/19/2018).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to ethical restriction.

Acknowledgments: Silvia Vidal was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) and is a participant in the Program for the Stabilization of Investigators of the Direcció d'Estrategia i Coordinació del Departament de Salut, Generalitat de Catalunya. This work was performed within the Ph.D. Immunology Program of Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Semple, J.W.; Italiano, J.E.; Freedman, J. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 264–274. [[CrossRef](#)]
2. Tunjungputri, R.N.; van der Ven, A.J.; Riksen, N.; Rongen, G.; Tacke, S.; van den Berg, T.N.A.D.; Fijnheer, R.; Gomes, M.E.; Dinarello, C.A.; van de Veerdonk, F.L.; et al. Differential effects of platelets and platelet inhibition by ticagrelor on TLR2- and TLR4-mediated inflammatory responses. *Thromb. Haemost.* **2015**, *113*, 1035–1045. [[PubMed](#)]
3. Gros, A.; Ollivier, V.; Ho-Tin-Noé, B. Platelets in inflammation: Regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kral, J.B.; Schrottmaier, W.C.; Salzmann, M.; Assinger, A. Platelet Interaction with Innate Immune Cells. *Transfus. Med. Hemotherapy* **2016**, *43*, 78–88. [[CrossRef](#)]
5. Herter, J.M.; Rossaint, J.; Zarbock, A. Platelets in inflammation and immunity. *J. Thromb. Haemost.* **2014**, *12*, 1764–1775. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Morrell, C.N.; Aggrey, A.A.; Chapman, L.M.; Modjeski, K.L. Review Article Emerging roles for platelets as immune and in inflammatory cells. *Blood* **2014**, *123*, 2759–2767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Ahn, K.C.; Jun, A.J.; Pawar, P.; Jadhav, S.; Napier, S.; McCarty, O.J.T.; Konstantopoulos, K. Preferential binding of platelets to monocytes over neutrophils under flow. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *329*, 345–355. [[CrossRef](#)]
8. Joseph, J.E.; Harrison, P.; Mackie, I.J.; Isenberg, D.A.; Machin, S.J. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br. J. Haematol.* **2001**, *115*, 451–459. [[CrossRef](#)]
9. Li, N.; Hu, H.; Lindqvist, M.; Wikström-Jonsson, E.; Goodall, A.H.; Hjerdahl, P. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 2702–2708. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Zamora, C.; Riudavets, M.; Anguera, G.; Alserawan, L.; Sullivan, I.; Barba, A.; Serra, J.; Ortiz, M.A.; Gallardo, P.; Perea, L.; et al. Circulating leukocyte-platelet complexes as a predictive biomarker for the development of immune-related adverse events in advanced nonsmall cell lung cancer patients receiving anti-PD-(L)1 blocking agents. *Cancer Immunol. Immunother.* **2021**, 1–14.
11. Zarbock, A.; Müller, H.; Kuwano, Y.; Ley, K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *86*, 1119–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kuligowski, M.P.; Kitching, A.R.; Hickey, M.J. Leukocyte Recruitment to the Inflamed Glomerulus: A Critical Role for Platelet-Derived P-Selectin in the Absence of Rolling. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 6991–6999. [[CrossRef](#)]

13. Da Costa Martins, P.A.; van Gils, J.M.; Mol, A.; Hordijk, P.L.; Zwaginga, J.J. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *79*, 499–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Weyrich, A.S.; Elstad, M.R.; McEver, R.P.; McIntyre, T.M.; Moore, K.L.; Morrissey, J.H.; Prescott, S.M.; Zimmerman, G.A. Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* **1996**, *97*, 1525–1534. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lang, D.; Dohle, F.; Terstesse, M.; Bangen, P.; August, C.; Pauels, H.-G.; Heidenreich, S. Down-Regulation of Monocyte Apoptosis by Phagocytosis of Platelets: Involvement of a Caspase-9, Caspase-3, and Heat Shock Protein 70-Dependent Pathway. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 6152–6158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Passacquale, G.; Vamadevan, P.; Pereira, L.; Hamid, C.; Corrigan, V.; Ferro, A. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25595. [[CrossRef](#)]
17. Ammon, C.; Kreutz, M.; Rehli, M.; Krause, S.W.; Andreesen, R. Platelets induce monocyte differentiation in serum-free coculture Abstract: Terminal maturation of blood monocytes (MO) in vitro and in vivo into macrophages connections that may be important for MO differentiation and/or with platelets. Ammon C, Kreutz M, Rehli M, Krause SW, Andreesen R. Platelets induce monocyte differentiation in serum-free coculture. *J. Leukoc. Biol.* **1998**, *63*, 469–476. [[PubMed](#)]
18. Gudbrandsdottir, S.; Hasselbalch, H.C.; Nielsen, C.H. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF- α secretion by monocytes. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 4059–4067. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Schwartzkopff, F.; Petersen, F.; Grimm, T.A.; Brandt, E. CXC chemokine ligand 4 (CXCL4) down-regulates CC chemokine receptor expression on human monocytes. *Innate Immun.* **2012**, *18*, 124–139. [[CrossRef](#)]
20. Linke, B.; Schreiber, Y.; Picard-Willems, B.; Slattery, P.; Nüsing, R.M.; Harder, S.; Geisslinger, G.; Scholich, K. Activated Platelets Induce an Anti-Inflammatory Response of Monocytes/Macrophages through Cross-Regulation of PGE2 and Cytokines. *Mediators Inflamm.* **2017**, *2017*, 1463216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Bournazos, S.; Rennie, J.; Hart, S.P.; Dransfield, I. Choice of anticoagulant critically affects measurement of circulating platelet-leukocyte complexes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2008**, *28*, 2–4. [[CrossRef](#)]
22. Takeda, Y.; Marumo, M.; Nara, H.; Feng, Z.-G.; Asao, H.; Wakabayashi, I. Selective induction of anti-inflammatory monocyte-platelet aggregates in a model of pulsatile blood flow at low shear rates. *Platelets* **2016**, *27*, 583–592. [[CrossRef](#)]
23. Sümegi, A.; Antal-Szalmás, P.; Aleksza, M.; Kovács, I.; Sipka, S.; Zeher, M.; Kiss, E.; Szegedi, G. Glucocorticosteroid therapy decreases CD14-expression and CD14-mediated LPS-binding and activation of monocytes in patients suffering from systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* **2005**, *117*, 271–279. [[CrossRef](#)]
24. Mukherjee, R.; Kanti Barman, P.; Kumar Thatoi, P.; Tripathy, R.; Kumar Das, B.; Ravindran, B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Fuentes Q., E.; Fuentes Q., F.; Andrés, V.; Pello, O.M.; de Mora, J.F.; Palomo G., I. Role of platelets as mediators that link inflammation and thrombosis in atherosclerosis. *Platelets* **2012**, *24*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Alcocer Varela, J.; Laffon, A.; Alarcon Segovia, D. Defective monocyte production of, and T lymphocyte response to, interleukin-1 in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* **1984**, *55*, 125–132.
27. Yuan, W.; Dimartino, S.J.; Redecha, P.B.; Ivashkiv, L.B.; Salmon, J.E. Systemic lupus erythematosus monocytes are less responsive to interleukin-10 in the presence of immune complexes. *Arthritis Rheum.* **2011**, *63*, 212–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Linker-Israeli, M.; Deans, R.J.; Wallace, D.J.; Prehn, J.; Ozeri-Chen, T.; Klinenberg, J.R. Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* **2015**, *147*, 117–123.
29. Herrmann, M.; Voll, R.E.; Zoller, O.M.; Hagenhofer, M.; Ponner, B.B.; Kalden, J.R. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **1998**, *41*, 1241–1250. [[CrossRef](#)]
30. Munoz, L.E.; Gaip, U.S.; Franz, S.; Sheriff, A.; Voll, R.E.; Kalden, J.R.; Herrmann, M. SLE - A disease of clearance deficiency? *Rheumatology* **2005**, *44*, 1101–1107. [[CrossRef](#)]
31. Huang, Z.Y.; Chien, P.; Indik, Z.K.; Schreiber, A.D. Human platelet Fc γ RIIA and phagocytes in immune-complex clearance. *Mol. Immunol.* **2011**, *48*, 691–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Linge, P.; Fortin, P.R.; Lood, C.; Bengtsson, A.A.; Boilard, E. The non-haemostatic role of platelets in systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2018**, *14*, 195–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Simon, D.I.; Chen, Z.; Xu, H.; Li, C.Q.; Dong, J.F.; McIntire, L.V.; Ballantyne, C.M.; Zhang, L.; Furman, M.I.; Berndt, M.C.; et al. Platelet glycoprotein Iba α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 193–204. [[CrossRef](#)]
34. Lindmark, E.; Tenno, T.; Siegbahn, A. Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 2322–2328. [[CrossRef](#)]
35. Silverstein, R.L.; Asch, A.S.; Nachman, R.L. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J. Clin. Invest.* **1989**, *84*, 546–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Schulz, C.; Von Brühl, M.L.; Barocke, V.; Cullen, P.; Mayer, K.; Okrojek, R.; Steinhart, A.; Ahmad, Z.; Kremmer, E.; Nieswandt, B.; et al. EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *J. Thromb. Haemost.* **2011**, *9*, 1007–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Rong, M.; Wang, C.; Wu, Z.; Zeng, W.; Zheng, Z.; Han, Q.; Jia, J.; Li, X.; Zhu, P. Platelets induce a proinflammatory phenotype in monocytes via the CD147 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, 478. [[CrossRef](#)]

38. Van Gils, J.M.; Zwaginga, J.J.; Hordijk, P.L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *85*, 195–204. [[CrossRef](#)]
39. Larsen, E.; Celi, A.; Gilbert, G.E.; Furie, B.C.; Erban, J.K.; Bonfanti, R.; Wagner, D.D.; Furie, B. PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* **1989**, *59*, 305–312. [[CrossRef](#)]
40. Michelson, A.D.; Barnard, M.R.; Krueger, L.A.; Valeri, C.R.; Furman, M.I. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: Studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. *Circulation* **2001**, *104*, 1533–1537. [[CrossRef](#)]
41. Christersson, C.; Johnell, M.; Siegbahn, A. Tissue factor and IL8 production by P-selectin-dependent platelet-monocyte aggregates in whole blood involves phosphorylation of Lyn and is inhibited by IL10. *J. Thromb. Haemost.* **2008**, *6*, 986–994. [[CrossRef](#)]
42. Wong, C.H.Y.; Jenne, C.N.; Petri, B.; Chrobok, N.L.; Kubes, P. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 785–792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Sarma, J.; Laan, C.A.; Alam, S.; Jha, A.; Fox, K.A.A.; Dransfield, I. Increased platelet binding to circulating monocytes in acute coronary syndromes. *Circulation* **2002**, *105*, 2166–2171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Harding, S.A.; Sommerfield, A.J.; Sarma, J.; Twomey, P.J.; Newby, D.E.; Frier, B.M.; Fox, K.A.A. Increased CD40 ligand and platelet–monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* **2004**, *176*, 321–325. [[CrossRef](#)]
45. Pamuk, G.E.; Nuri Pamuk, Ö.; Örum, H.; Arican, Ö.; Turgut, B.; Demir, M. Elevated platelet-monocyte complexes in patients with psoriatic arthritis. *Platelets* **2009**, *20*, 493–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Suzuki, J.; Hamada, E.; Shodai, T.; Kamoshida, G.; Kudo, S.; Itoh, S.; Koike, J.; Nagata, K.; Irimura, T.; Tsuji, T. Cytokine secretion from human monocytes potentiated by P-selectin-mediated cell adhesion. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **2013**, *160*, 152–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Da Costa Martins, P.; Van Den Berk, N.; Ulfman, L.H.; Koenderman, L.; Hordijk, P.L.; Zwaginga, J.J. Platelet-Monocyte Complexes Support Monocyte Adhesion to Endothelium by Enhancing Secondary Tethering and Cluster Formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 193–199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hawley, K.L.; Cruz, A.R.; Benjamin, S.J.; La Vake, C.J.; Cervantes, J.L.; LeDoyt, M.; Ramirez, L.G.; Mandich, D.; Fiel-Gan, M.; Caimano, M.J.; et al. IFN γ enhances CD64-potentiated phagocytosis of *Treponema pallidum* opsonized with human syphilitic serum by human macrophages. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1–18. [[CrossRef](#)]
49. Andonegui, G.; Kerfoot, S.M.; McNagny, K.; Ebbert, K.V.J.; Patel, K.D.; Kubes, P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* **2005**, *106*, 2417–2423. [[CrossRef](#)]
50. Semple, J.W.; Aslam, R.; Kim, M.; Speck, E.R.; Freedman, J. Brief report Platelet-bound lipopolysaccharide enhances Fc receptor-mediated phagocytosis of IgG-opsonized platelets. *Blood*. **2007**, *109*, 4803–4806. [[CrossRef](#)]
51. Ståhl, A.L.; Svensson, M.; Mörgelin, M.; Svanborg, C.; Tarr, P.I.; Mooney, J.C.; Watkins, S.L.; Johnson, R.; Karpman, D. Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic *Escherichia coli* binds to platelets through TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with hemolytic uremic syndrome. *Blood* **2006**, *108*, 167–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Zhang, G.; Han, J.; Welch, E.J.; Ye, R.D.; Voyno-Yasenetskaya, T.A.; Malik, A.B.; Du, X.; Li, Z. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 7997–8004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Skrzeczyńska-Moncznik, J.; Bzowska, M.; Loseke, S.; Grage-Griebenow, E.; Zembala, M.; Pryjma, J. Peripheral blood CD14^{high} CD16⁺ monocytes are main producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* **2008**, *67*, 152–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hirose, S.; Lin, Q.; Ohtsui, M.; Nishimura, H.; Verbeek, J.S. Monocyte subsets involved in the development of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.* **2019**, *31*, 687–696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Marsik, C.; Mayr, F.; Cardona, F.; Schaller, G.; Wagner, O.F.; Jilma, B. Endotoxin down-modulates P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) on neutrophils in humans. *J. Clin. Immunol.* **2004**, *24*, 62–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Liang, H.; Duan, Z.; Li, D.; Li, D.; Wang, Z.; Ren, L.; Shen, T.; Shao, Y. Higher levels of circulating monocyte-platelet aggregates are correlated with viremia and increased sCD163 levels in HIV-1 infection. *Cell. Mol. Immunol.* **2015**, *12*, 435–443. [[CrossRef](#)]
57. Davenpeck, K.L.; Brummet, M.E.; Hudson, S.A.; Mayer, R.J.; Bochner, B.S. Activation of Human Leukocytes Reduces Surface P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1, CD162) and Adhesion to P-Selectin In Vitro. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 2764–2772. [[CrossRef](#)]
58. Li, Y.; Lee, P.Y.; Reeves, W.H. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **2010**, *58*, 355–364. [[CrossRef](#)]
59. Le Blanc, J.; Lordkipanidzé, M. Platelet Function in Aging. *Front. Cardiovasc. Med.* **2019**, *6*, 1–8. [[CrossRef](#)]
60. Katsiari, C.G.; Liossis, S.N.C.; Souliotis, V.L.; Dimopoulos, A.M.; Manoussakis, M.N.; Sfrikakis, P.P. Aberrant expression of the costimulatory molecule CD40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* **2002**, *103*, 54–62. [[CrossRef](#)]
61. Boilard, E.; Blanco, P.; Nigrovic, P.A. Platelets: Active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 534–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Zamora, C.; Toniolo, E.; Diaz-Torné, C.; Cantó, E.; Magallares, B.; Ortiz, M.A.; Perea, L.; Corominas, H.; Vidal, S. Association of Platelet Binding to Lymphocytes with B Cell Abnormalities and Clinical Manifestations in Systemic Lupus Erythematosus. *Mediators Inflamm.* **2019**, *2019*, 1–12. [[CrossRef](#)]

63. Morel, Y.; Truneh, A.; Sweet, R.W.; Olive, D.; Costello, R.T. The TNF Superfamily Members LIGHT and CD154 (CD40 Ligand) Costimulate Induction of Dendritic Cell Maturation and Elicit Specific CTL Activity. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 2479–2486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Li, N.; Ji, Q.; Hjendahl, P. Platelet-lymphocyte conjugation differs between lymphocyte subpopulations. *J. Thromb. Haemost.* **2006**, *4*, 874–881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Llorente, L.; Richaud-Patin, Y.; Wijdenes, J.; Alcocer-Varela, J.; Maillot, M.C.; Durand-Gasselin, I.; Fourrier, B.M.; Galanaud, P.; Emilie, D. Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Eur. Cytokine Netw.* **1993**, *4*, 421–427. [[PubMed](#)]
66. Llorente, L.; Richaud-Patin, Y.; García-Padilla, C.; Claret, E.; Jakez-Ocampo, J.; Cardiel, M.H.; Alcocer-Varela, J.; Grangeot-Keros, L.; Alarcón-Segovia, D.; Wijdenes, J.; et al. Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic Lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **2000**, *43*, 1790–1800. [[CrossRef](#)]
67. Uchida, M.; Ooka, S.; Goto, Y.; Suzuki, K.; Fujimoto, H.; Ishimori, K.; Matsushita, H.; Takakuwa, Y.; Kawahata, K. Anti-IL-10 antibody in systemic lupus erythematosus. *Open Access Rheumatol. Res. Rev.* **2019**, *11*, 61–65. [[CrossRef](#)]
68. Go, N.F.; Castle, B.E.; Barrett, R.; Kastelein, R.; Dang, W.; Mosmann, T.R.; Moore, K.W.; Howard, M. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: Unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J. Exp. Med.* **1990**, *172*, 1625–1631. [[CrossRef](#)]
69. Levy, Y.; Brouet, J.C. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *J. Clin. Investig.* **1994**, *93*, 424–428. [[CrossRef](#)]
70. Houssiau, F.A.; Vanden Berghe, M.; Devogelaer, J.P.; Lefebvre, C.; Lambert, M.; Renauld, J.C. Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity. *Lupus* **1995**, *4*, 393–395. [[CrossRef](#)]
71. Conti, F.; Ceccarelli, F.; Perricone, C.; Massaro, L.; Marocchi, E.; Miranda, F.; Spinelli, F.R.; Truglia, S.; Alessandri, C.; Valesini, G. Systemic Lupus Erythematosus with and without Anti-dsDNA Antibodies: Analysis from a Large Monocentric Cohort. *Mediators Inflamm.* **2015**, *2015*, 328078. [[PubMed](#)]
72. Satoh, M.; Hamamoto, T.; Shibata, T.; Katoh, M.; Ashihara, M.; Takahashi, M.; Ishitani, K.; Natsume, I.; Abe, Y.; Yoshida, S.; et al. An Evaluation on the 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Jpn. J. Clin. Immunol.* **1987**, *10*, 186–193. [[CrossRef](#)]
73. Guzmán, J.; Cardiel, M.H.; Arce-Salinas, A.; Sánchez-Guerrero, J.; Alarcón-Segovia, D. Measurement of disease activity in systemic lupus erythematosus. Prospective validation of 3 clinical indices. *J. Rheumatol.* **1992**, *19*, 1551–1558. [[PubMed](#)]
74. Ziegler-Heitbrock, L.; Hofer, T.P.J. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 1–5. [[CrossRef](#)]
75. Zamora, C.; Cantó, E.; Nieto, J.C.; Angels Ortiz, M.; Juarez, C.; Vidal, S. Functional consequences of CD36 downregulation by TLR signals. *Cytokine* **2012**, *60*, 257–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

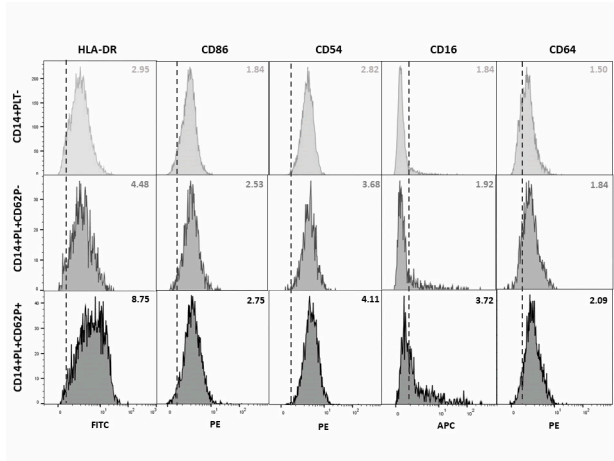


Figure S1. Phenotype of monocytes without platelets (CD14+PLT-) and with non-activated (CD14+PLT+CD62P-) or activated (CD14+PLT+CD62P+) platelets in HD. Expression of HLA-DR, CD86, CD54, CD16 and CD64 on CD14+PLT- (light grey), CD14+PLT+CD62P- (dark grey) or CD14+PLT+CD62P+ (black). Dotted line indicates positivity threshold. Representative experiment is shown from 16 independent experiments. Data are expressed as gMFI (geometric mean fluorescence intensity) of gated monocytes.

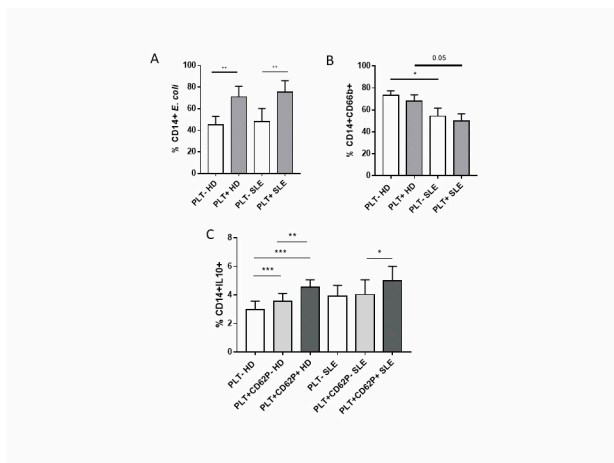


Figure S2. Functional characterization of monocytes with bound platelets in SLE patients. (A) Phagocytosis of *E. coli* (n=8), (B) Efferocytosis (n=8) and (C) IL-10 secretion (n=9). Error bars correspond to SEM. Data are shown for 3 (A), 8 (B) and 6 (C) independent experiments. Statistical analysis was performed using the paired t-test for comparison between monocytes from HD or from SLE patients and t-test or the one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test for comparison between HD and SLE patients. *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

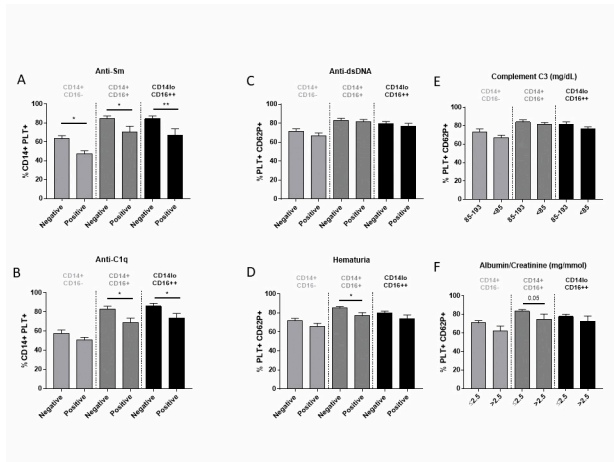


Figure S3. Percentage of monocyte subsets with bound platelets and activated bound platelets in SLE patients according to clinical features. Comparison of percentages of monocyte subsets with bound platelets (CD14+PLT+) in SLE patients segregated according to (A) positive or negative anti-Sm, (B) positive or negative anti-C1q. Comparison of percentages of monocyte subsets with activated bound platelets (PLT+ CD62P+) in SLE patients segregated according to (C) positive or negative anti-dsDNA, (D) positive or negative haematuria, (E) <85 or 85-193 mg/dl of C3 and (F) >2.5 or ≤2.5 mg/mmol of albumin/creatinine are shown (n=49). Error bars correspond to SEM. Statistical analysis was performed using the t-test. *p <0.05, **p<0.01.

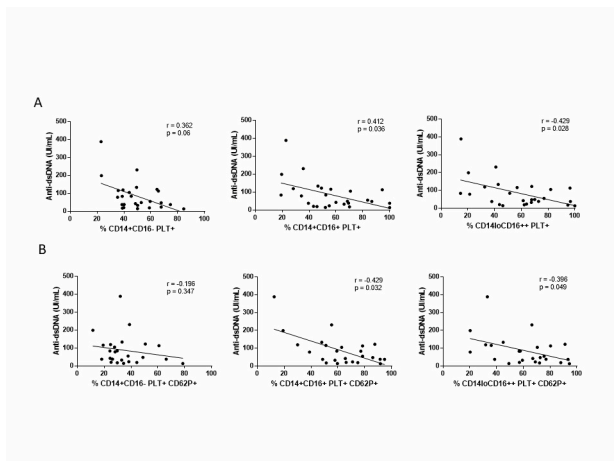


Figure S4. Correlation of monocyte subsets with bound platelets and activated bound platelets with anti-dsDNA titers in SLE patients. (A) Correlation of the percentage of monocyte subsets with bound platelets (PLT+) with anti-dsDNA titers in SLE patients (n=26). (B) Correlation of percentage of monocyte subsets with activated bound platelets (PLT+ CD62P+) with anti-dsDNA titers in SLE patients (n=26). Statistical analysis was performed using Pearson's correlation.

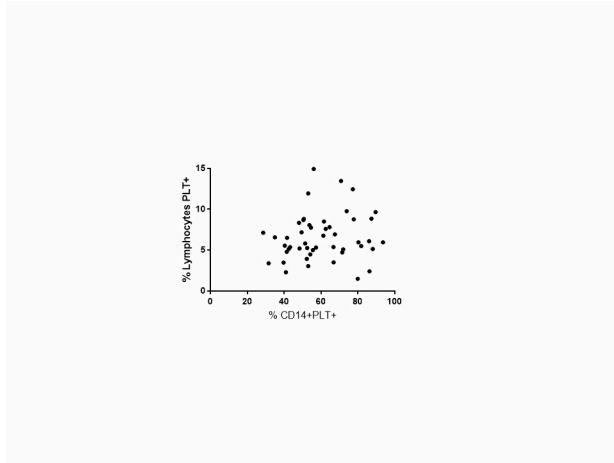


Figure S5. Correlation of monocyte with bound platelets and lymphocytes with bound platelets in SLE patients. (n=48) Statistical analysis was performed using Pearson's correlation.

Table S1. Expression of HLA-DR, CD86, CD54, CD16 and CD64 on monocytes without bound platelets (CD14+PLT-), monocytes with non-activated (CD14+PLT+CD62P-) or activated bound platelets (CD14+PLT+CD62P+) in HD and SLE patients. Data are expressed as the mean \pm SD values of gMFI of 35 independent experiments (16 HD and 35 SLE patients). Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. gMFI, geometric mean fluorescence intensity, SD, standard deviation.

		CD14+PLT- (gMFI, $\bar{x} \pm SD$) (a)	CD14+PLT+CD62P- (gMFI, $\bar{x} \pm SD$) (b)	CD14+PLT+CD62P+ (gMFI, $\bar{x} \pm SD$) (c)	ANOVA	(a) Vs. (b)	(a) Vs. (c)	(b) Vs. (c)
HLA-DR	HD	4.27 \pm 1.34	4.64 \pm 1.66	7.67 \pm 2.8	<0.01	ns	<0.01	<0.01
	SLE	4.18 \pm 1.25	4.37 \pm 1.5	7.63 \pm 2.4	<0.01	ns	<0.01	<0.01
CD86	HD	2.43 \pm 0.58	2.87 \pm 0.56	3.87 \pm 1.36	0.07	<0.01	<0.01	ns
	SLE	2.14 \pm 0.65	2.41 \pm 0.65	2.9 \pm 0.9	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
CD54	HD	1.87 \pm 0.5	2.25 \pm 0.8	2.92 \pm 1.66	0.04	<0.01	<0.01	ns
	SLE	2.06 \pm 0.63	2.41 \pm 0.69	2.83 \pm 0.69	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
CD16	HD	1.7 \pm 0.89	2.33 \pm 1.25	2.8 \pm 1.85	0.01	0.04	0.02	ns
	SLE	1.84 \pm 1.08	2.48 \pm 2.05	2.6 \pm 1.55	0.03	ns	<0.01	ns
CD64	HD	0.88 \pm 0.29	1.12 \pm 0.51	1.18 \pm 0.4	0.01	ns	<0.01	ns
	SLE	1.18 \pm 0.49	1.26 \pm 0.45	1.43 \pm 0.49	<0.01	0.01	<0.01	<0.01

4.2. ARTÍCULO II

Increase of Circulating Monocyte–Platelet Conjugates in Rheumatoid Arthritis Responders to IL-6 Blockage

Anaís Mariscal, Carlos Zamora, César Díaz-Torné, M^a Àngels Ortiz, Juan José de Agustín, Delia Reina, Paula Estrada, Patricia Moya, Héctor Corominas and Sílvia Vidal

International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23(10), 5748.

Factor de impacto 5.924, Primer cuartil



Article

Increase of Circulating Monocyte–Platelet Conjugates in Rheumatoid Arthritis Responders to IL-6 Blockage

Anaís Mariscal ^{1,†} , Carlos Zamora ^{2,†}, César Díaz-Torné ³ , M^a Àngels Ortiz ² , Juan José de Agustín ⁴, Delia Reina ⁵, Paula Estrada ⁵, Patricia Moya ³ and Sílvia Vidal ^{2,*}

- ¹ Immunology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), 08041 Barcelona, Spain; amariscal@santpau.cat
- ² Laboratory of Inflammatory Diseases, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Biomedical Research Institute Sant Pau (IIB Sant Pau), 08041 Barcelona, Spain; carlosza@g86mail.com (C.Z.); mortiz@santpau.cat (M.À.O.)
- ³ Rheumatology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain; cdiaz@santpau.cat (C.D.-T.); pmoyaa@santpau.cat (P.M.); hcorominas@santpau.cat (H.C.)
- ⁴ Rheumatology Department, Hospital Vall d'Hebrón, 08035 Barcelona, Spain; jjagor@hotmail.com
- ⁵ Rheumatology Department, Hospital Moisès Broggi, Sant Joan Despí, 08970 Barcelona, Spain; deliareinasanz@gmail.com (D.R.); paulavestradaa@gmail.com (P.E.)
- * Correspondence: svidal@santpau.cat
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Platelets (PLT) bind to a significant percentage of circulating monocytes and this immunomodulatory interaction is increased in several inflammatory and autoimmune conditions. The therapeutic blockage of IL-6 with Tocilizumab (TCZ) alters PLT and the phenotype and function of monocytes in rheumatoid arthritis (RA). However, the relationship between monocyte–PLT conjugates (CD14+PLT+) and clinical and immunological variables and the regulation of this interaction by IL-6 blockage are still unknown. Here, we compared the presence of monocyte–PLT conjugates (CD14+PLT+) and membrane CD162 expression using flow cytometry, and, by ELISA, the markers of PLT activation (sCD62P and sCD40L) in healthy donors (HD) and patients with long-standing RA before TCZ (baseline). We found higher percentages and absolute counts of CD14+PLT+, and higher plasmatic levels of sCD62P and sCD40L but lower CD162 expression on monocytes from RA patients than those from HD. Additionally, the levels of CD14+PLT+ inversely correlated with inflammatory parameters. Interestingly, 95% of patients with lower percentages of CD14+PLT+ and only 63% of patients with higher percentages of CD14+PLT+ achieved a EULAR-defined response at four weeks ($p = 0.036$). After TCZ, the percentage of CD14+PLT+ increased in 92% of RA patients who achieved 12 w-remission ($p < 0.001$). Our results suggest that the binding of PLTs has a modulatory effect, accentuated by the increased binding of PLTs to monocytes in response to the therapeutic blockage of IL-6.

Keywords: platelets; monocytes; rheumatoid arthritis; tocilizumab; immune modulation; inflammation; immunity



Citation: Mariscal, A.; Zamora, C.; Díaz-Torné, C.; Ortiz, M.À.; Agustín, J.J.d.; Reina, D.; Estrada, P.; Moya, P.; Corominas, H.; Vidal, S. Increase of Circulating Monocyte–Platelet Conjugates in Rheumatoid Arthritis Responders to IL-6 Blockage. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5748. <https://doi.org/10.3390/ijms23105748>

Academic Editor: Isabella Russo

Received: 7 April 2022

Accepted: 17 May 2022

Published: 20 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory joint disease characterized by persistent systemic inflammation, with extra-articular manifestations that can affect up to 41% of patients [1]. Neutrophils, mast cells, T and B lymphocytes, and monocytes/macrophages are involved in the development of inflammation in RA [2]. In particular, monocytes play an important role in the initiation, maintenance and the degree of activity of synovial inflammation [3]. In RA, activated monocytes possess increased adherent abilities [4]. They massively infiltrate inflammatory sites, where they differentiate into tissue macrophages and type A synoviocytes [5,6]. The activation of these cells can also lead to the production of TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-8, which are effector molecules involved in inflammation [4,7].

Platelets (PLTs) are also involved in inflammatory processes through the secretion of inflammatory mediators or through a direct interaction with leukocytes [8–11]. PLTs circulate in an inactive state and can respond to a wide variety of stimuli, releasing cytokines, chemokines, and growth factors that are stored in granules [12–15]. PLTs from RA patients express higher P-selectin (CD62P) levels and produce greater amounts of soluble CD40 ligand (sCD40L), both of which are markers of PLT activation [16,17]. One of the factors involved in this increased PLT activation is anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) [13].

Circulating activated PLTs can bind to other PLTs and leukocytes, setting off a cascade of events that contribute to the development, evolution, and resolution of systemic inflammatory response. PLT adhesion to circulating leukocytes enhances leukocyte rolling on the endothelial wall, facilitating the transport of PLTs to joint space [18,19]. In healthy donors (HD), P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1 or CD162) on leukocytes seems to be the main molecule involved in the interaction of PLTs and leukocytes when it binds to CD62P on activated PLTs [20,21]. However, other ligands can be involved in the binding of PLTs to monocytes: GPIIb-CD11b [22], CD40-CD40L [23], GPIIb/IIIa-CD11/CD18 [24], EMMPRIN (CD147/basigin)-CD147/GPIV [25,26], TREM-1-TREM-1 ligand [27] and PADGEM [28]. We previously described an increased percentage of monocytes with bound PLTs in SLE patients. However, SLE monocytes have a decreased expression of CD162, suggesting that other molecules contribute to this binding [29]. Other authors have also reported the down-regulation of CD162 on myeloid innate cells in an inflammatory context or after leukocyte activation [30–33]. In HD, monocyte–PLT interaction decreases monocyte apoptosis, increases the expression of co-stimulatory molecules and Fc gamma receptors, and leads to a phenotypic shift in CD14+CD16- towards CD14+CD16+ and a monocyte differentiation into macrophages [29,34–36]. Furthermore, monocytes with bound PLTs have increased phagocytosis ability [29]. PLTs can also dampen inflammatory responses by increasing IL-10 and decreasing IL-6 and TNF- α release by monocytes [37,38]. Like other authors, we have reported an increased percentage of monocytes with bound PLTs in several inflammatory and autoimmune conditions, including RA [19,26,29,32,39–43]. Depending on the disease, these monocyte–PLTs aggregates can play pro- [44], or anti-inflammatory roles [29,32,45]. Specifically, PLTs from RA patients can induce HD monocytes to synthesize pro-inflammatory cytokines (TNF α and IL-6) through CD147 engagement [26].

Although RA methotrexate (MTX), a conventional synthetic disease-modifying antirheumatic drug (DMARDs), is the first-line treatment, not all patients achieve remission. Tocilizumab (TCZ) is indicated in patients who have failed two courses with conventional synthetic DMARDs or who have adverse prognostic markers [46]. TCZ is a humanized anti-human IL-6 receptor antibody that blocks the binding of IL-6 to its receptor, thereby preventing signalling. It has been shown that TCZ induces apoptosis, downregulates the expression of CD80 and suppresses the expression of IL-6 on stimulated monocytes from HD [47]. Additionally, in more than 10% of patients, PLTs have been affected by TCZ [48,49]. Therefore, the main goal of this study is to decipher whether a new mechanism of action of TCZ on RA regulates the binding of PLT to monocytes. First, we analysed monocyte–PLT conjugates, as well as markers of PLT activation, in a cohort of long-lasting RA patients that are refractory to standard treatment with DMARDs. Second, we studied the association between the frequency of monocytes with bound PLTs and the clinical and laboratory features of RA patients before TCZ treatment. Third, we investigated whether monocytes with bound PLTs can function as biomarkers of TCZ treatment response. Finally, we clarified the functional consequences of both IL-6 signalling and TCZ treatment over PLTs binding to monocytes in *in vitro* cultures.

2. Results

2.1. Circulating CD14+PLT+ in RA Patients

We observed higher percentages and absolute counts of circulating CD14+PLT+ in RA than in HD (Figure 1A,B and Figure S1B). However, we did not find differences in absolute counts of monocytes between RA patients and HD (201.08 ± 77.12 CD14+/ μ L in

RA patients vs. 208.44 ± 54.23 CD14+/ μL in HD; $p = 0.8$). We also found a direct correlation between the percentage and absolute counts of CD14+PLT+ in both RA patients and HD (Figure 1C). When we compared membrane CD162 (mCD162) expression, we found that monocytes from RA patients had a lower expression of mCD162 than HD (Figure 1D and Figure S1B). In addition, mCD162 expression directly correlated with the percentage of CD14+PLT+ in HD (Figure 1E) but correlated inversely in RA patients (Figure 1F). mCD162 expression did not correlate with absolute counts of circulating CD14+PLT+ in RA patients ($r = -0.199$; $p = 0.284$) or in HD ($r = 0.34$; $p = 0.306$). Monocytes with or without bound PLTs had similar mCD162 expressions (Figure 1G). There were no differences in soluble CD162 (sCD162) between RA patients and HD (Figure 1H).

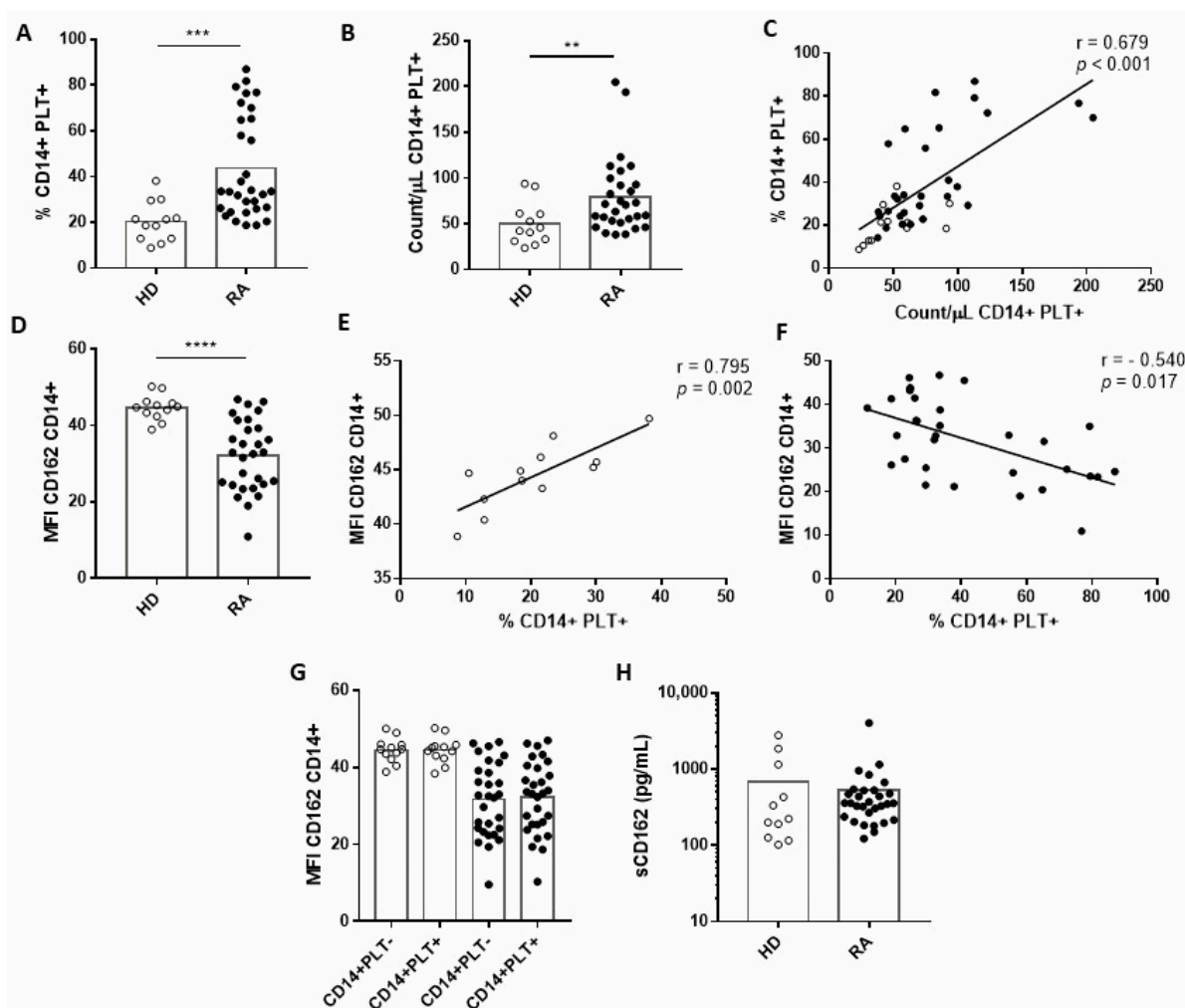


Figure 1. Monocytes with bound platelets and CD162 expression on monocytes from healthy donors (HD) and rheumatoid arthritis (RA) patients. (A) Percentage and (B) absolute numbers of monocytes with bound platelets (CD14+PLT+) in HD and RA patients. (C) Correlation between percentage and absolute number of CD14+PLT+ in HD and RA patients. (D) CD162 expression on monocytes from HD and RA patients. (E) Correlation between CD162 expression and percentage of CD14+PLT+ in HD and (F) RA patients. (G) CD162 expression on CD14+PLT- or CD14+PLT+ in HD and RA patients. (H) Quantification of soluble CD162 (sCD162) in plasma from HD and RA patients. White circles represent HD, and black circles represent RA patients. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test for comparisons between HD and RA and Spearman’s correlation for correlation analysis. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

We did not find any association between the percentage or absolute counts of CD14+PLT+ and the plasmatic concentrations of IL-6, sIL-6R, IL-10, IL-22, LBP and VEGF (data not

shown). However, we found that the percentage, but not the absolute counts, of CD14+PLT+ correlated with plasmatic IL-17 levels in RA patients but not in HD ($r = 0.505$; $p = 0.006$ and $r = 0.163$; $p = 0.407$ respectively).

We next analysed surrogate soluble markers of PLT activation: sCD40L and sCD62P [16]. Although we found that both molecules were higher in RA patients than in HD (Figure S2), no association was found between sCD40L or sCD62P and the percentage of CD14+PLT+ in RA patients or in HD (Figure S2C,D). In addition, we did not observe any association between sCD40L and sCD62P in RA patients or in HD (Figure S2E).

2.2. Relationship between CD14+PLT+ and mCD162 Expression on Monocytes with Clinical RA Parameters

We found no association between the percentages or the absolute counts of CD14+PLT+ and mCD162 expression on monocytes and DAS28, SDAI, or CDAI scores before TCZ treatment. Since those disease activity indexes integrate different parameters, we then analysed each parameter independently. We found that absolute counts of CD14+PLT+ were inversely correlated with inflammatory markers CRP (Figure 2A) and ESR (Figure 2B), but CD14+PLT+ percentages did not correlate with CRP and ESR ($r = -0.4$; $p = 0.054$ with CRP and $r = -0.33$; $p = 0.09$ with ESR). mCD162 expression on monocytes correlated with joint US scores (Figure 2C) and health assessment questionnaire scores (HAQ) (Figure 2D).

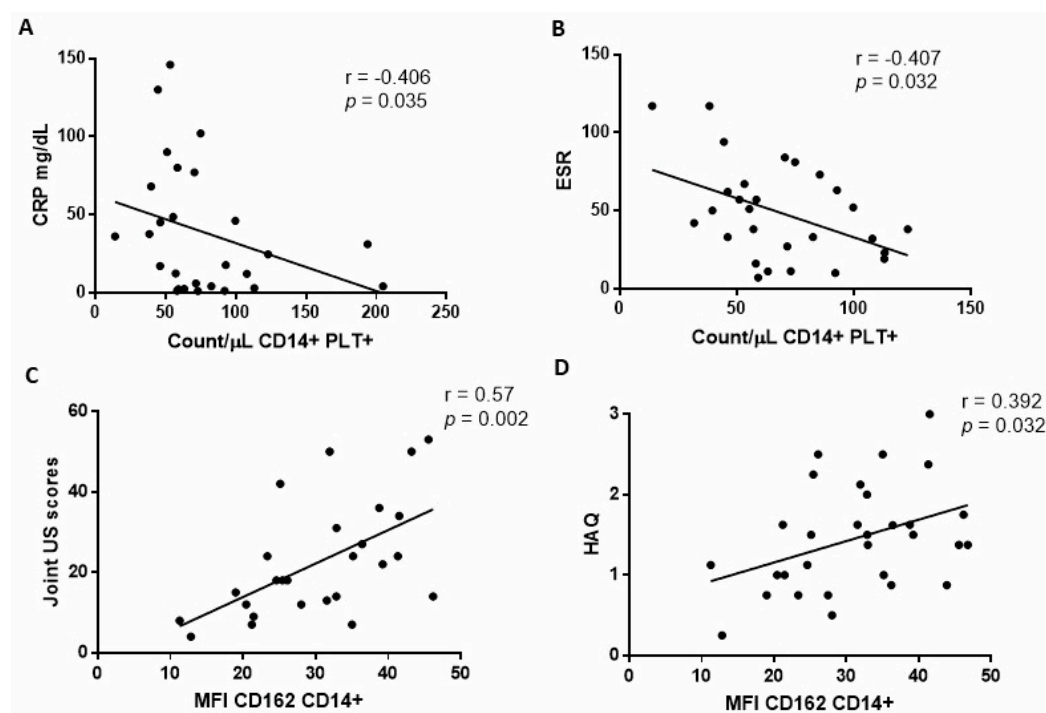


Figure 2. Association of monocytes with bound platelets and CD162 expression on monocytes with baseline clinical and laboratory parameters in rheumatoid arthritis (RA) patients. (A) Absolute number of monocytes with bound platelets (CD14+PLT+) correlation with CRP and (B) ESR. (C) CD162 expression on monocytes correlation with joint ultrasound (US) scores and (D) health assessment questionnaire (HAQ). Statistical analysis was performed using Spearman's correlation.

We also observed a correlation between sCD40L and RF titers ($r = 0.544$; $p = 0.013$). In addition, we found that sCD40L levels between ACPA+ and ACPA- patients (839 (389.1–1794) pg/mL in ACPA+ vs. 332.9 (64.7–1551) pg/mL in ACPA-; $p = 0.08$) were not significantly different.

2.3. Relationship between CD14+PLT+ and mCD162 Expression on Monocytes with Clinical Outcome in RA Patients after TCZ Treatment

We found that the percentage of CD14+PLT+ increased, while mCD162 expression on monocytes decreased 4 and 12 weeks after initiating TCZ treatment (Figure 3A,B).

sCD62P also decreased at four weeks (Figure S3A), while sCD40L did not change after TCZ treatment (data not shown).

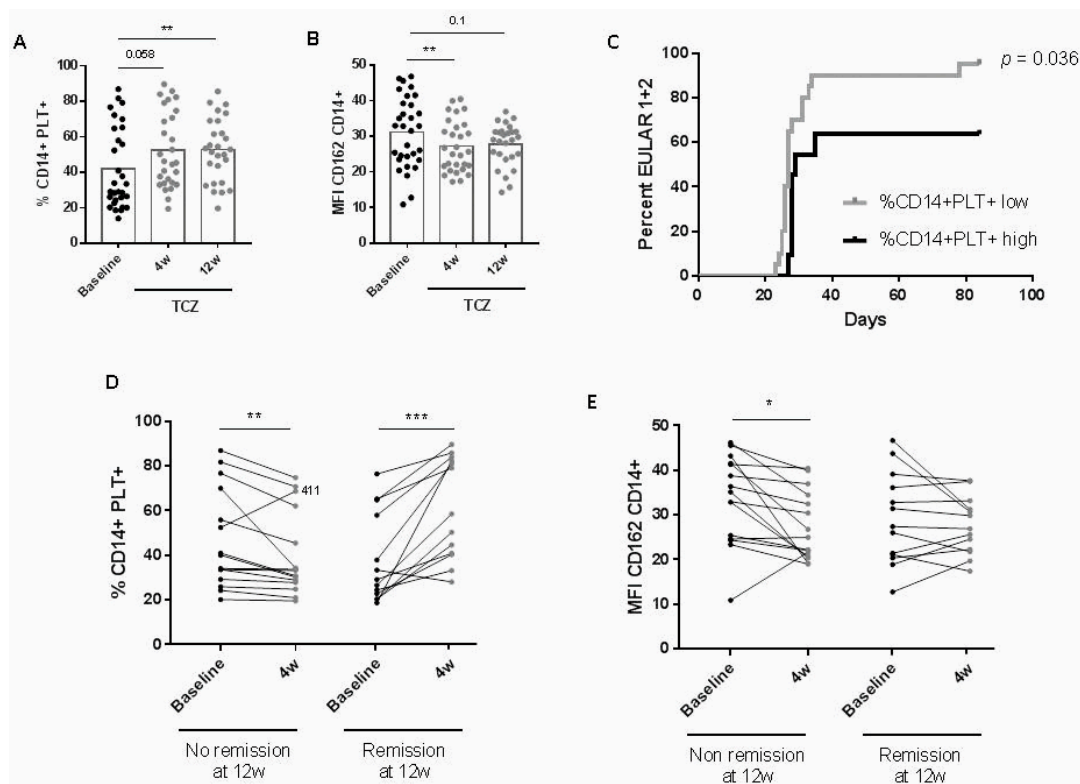


Figure 3. Changes in monocytes with bound platelets and CD162 expression after tocilizumab treatment and association with clinical response in rheumatoid arthritis (RA) patients. (A) Percentage of monocytes with bound platelets (CD14+PLT+) and (B) CD162 expression on monocytes before (Baseline) and four weeks (4 w) and twelve weeks (12 w) after tocilizumab (TCZ) treatment. (C) Kaplan-Meier curve for EULAR response. Percentage of patients with low or high %CD14+PLT+ achieving 1 (moderate) or 2 (good) EULAR response (days). (D) Changes in the percentage of CD14+PLT+ and (E) CD162 expression after 4 w of TCZ treatment in rheumatoid arthritis patients with no remission or remission at 12 w (left). Black circles represent RA patients before TCZ treatment, and grey circles RA patients after TCZ treatment. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test for comparisons between baseline and 4 w or 12 w after TCZ treatment and log-rank Mantel–Cox test for the analysis of EULAR response during follow-up. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

The segregation of patients into those with low or high percentages or absolute counts of CD14+PLT+ was established by calculating cut-offs with a confidence interval of 95% for HD values, as explained in the Material and Methods section. A higher percentage of patients with lower percentages or absolute counts of CD14+PLT+ at baseline achieved a good (2) or moderate (1) EULAR response compared to patients with higher percentages or absolute counts of CD14+PLT+ (%CD14+PLT+ low: HR = 2.68 when compared to %CD14+PLT+ high) (Figure 3C and data not shown). A decreased percentage of CD14+PLT+ at four weeks after TCZ was found in patients who did not achieve remission at 12 weeks. In contrast, an increased percentage of CD14+PLT+ at four weeks after TCZ was found in patients who achieved remission at 12 weeks (Figure 3D). A decreasing mCD162 expression four weeks after TCZ was found only in patients who did not achieve remission (Figure 3E). Regarding sCD62P, there were no significant changes in patients who did not achieve remission, while decreasing changes were found in patients who achieved remission (Figure S3B). Interestingly, in the group of patients who achieved remission, changes in CD14+PLT+ were inversely correlated with changes in sCD62P ($r = -0.582$, $p = 0.04$). No correlation was found in the non-responder group (data not shown).

We also analysed the association between changes in the percentage of CD14+PLT+, mCD162 expression on monocytes and sCD62P at four weeks with changes in clinical and laboratory parameters at four weeks. We found that changes in CD14+PLT+ correlated inversely with changes in DAS28, ESR, and with swollen joint count (SJC) (Figure 4A,C). We did not find any association between changes in mCD162 expression on monocytes or plas-matic sCD62P levels and changes in clinical and laboratory parameters (data not shown).

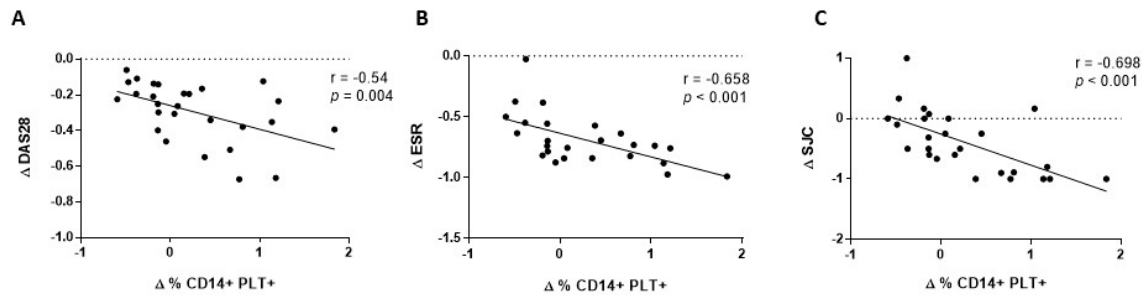


Figure 4. Association of changes in monocytes with bound platelets and CD162 expression on monocytes after 4 weeks of tocilizumab treatment with clinical and laboratory parameters. (A) Changes in percentage of monocytes with bound platelets (CD14+PLT+) correlation with changes in DAS28, (B) ESR and (C) swollen joint count (SJC). Statistical analysis was performed using the Spearman's correlation.

2.4. IL-6 and TCZ Effects over PLT Binding to Monocytes, mCD162 Expression on Monocytes and PLT Activation

To analyse the mechanism of TCZ on PLT binding to monocytes, we stimulated whole blood from HD with LPS, rhIL-6, or/and TCZ. We found an increased percentage of CD14+PLT+ when we stimulated whole blood with LPS or with rhIL-6, without synergic effects when both stimuli were present (data not shown). When we added TCZ after LPS or rhIL-6 stimulus, the percentage of CD14+PLT+ was not different from LPS or rhIL-6 conditions (data not shown). However, when we added TCZ before LPS or rhIL-6 stimulus, the percentage of CD14+PLT+ was significantly lower than LPS or rhIL-6 conditions (Figure 5A, Table S1).

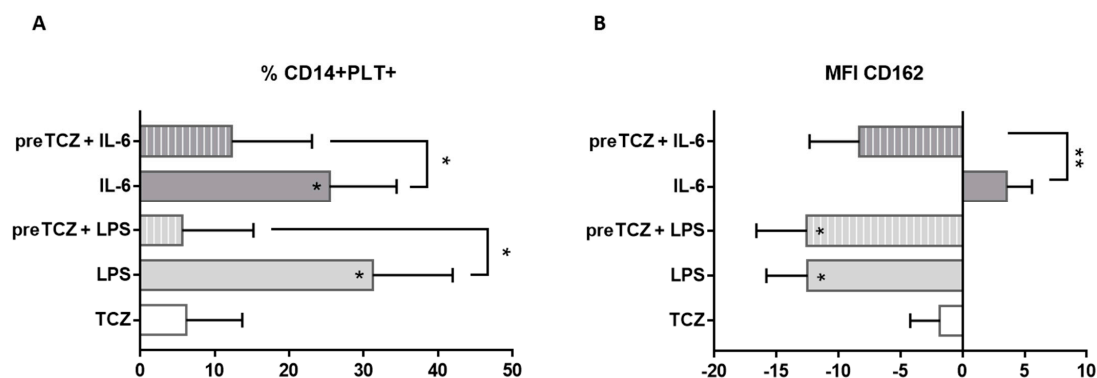


Figure 5. Effect of IL-6 and tocilizumab on platelet binding and CD162 expression on monocytes. Peripheral whole blood from healthy donors was cultured without stimulus or stimulated with lipopolysaccharide (LPS), recombinant human IL-6 or tocilizumab (TCZ). When TCZ stimulus is prior to LPS or IL-6 treatment is indicated as pre-. Differences between each condition and basal condition were calculated from 7 independent experiments. X axis represents percentage of increase or decrease from basal condition. Data are expressed as mean with standard error of mean. Stars inside the bars indicate comparison with basal condition. (A) Percentage of monocytes with bound platelets or (B) CD162 expression on monocytes was evaluated. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

We also found that mCD162 expression on monocytes decreased in the presence of LPS (Figure 5B, Table S1). No differences in mCD162 expression on monocytes were found between LPS alone and LPS when we had added TCZ beforehand (Figure 5B, Table S1) or after LPS stimulus (data not shown). The addition of TCZ before rhIL-6 decreased mCD162 expression on monocytes (Figure 5B, Table S1). We did not find differences in the percentage of activated free PLTs (CD41a+CD62P+) between the different stimulations (data not shown).

3. Discussion

Our present findings suggest that, as a result of exposure to an inflammatory environment, more monocytes bound to PLTs but had decreased mCD162 expression. After the administration of TCZ, the percentage of CD14+PLT+ increased in RA patients who achieved remission after 12 weeks post-TCZ treatment. Interestingly, patients with a lower percentage of CD14+PLT+ before TCZ treatment achieved EULAR-defined response to a greater extent.

Our work showed that RA patients had increased percentages and absolute counts of CD14+PLT+ cells and increased levels of soluble markers of PLT activation. We also found an inverse association between CD14+PLT+ and the inflammatory parameters CRP and ESR. These findings suggest that an inflammatory environment contributes to the binding of PLT to monocytes with a regulatory effect. Whereas, like other authors, we have not found any statistical association between PLT activation markers and disease activity [50], Lee et al. found a correlation between sCD62P levels and disease activity, CRP and ESR [51]. This discrepancy between studies may be due to differences in cohort characteristics. In fact, our cohort had a longer disease duration and higher disease activity but a lower percentage of RF- and ACPA-positive patients, as well as a lower percentage of patients in MTX treatment.

We found a significantly lower expression of mCD162 on monocytes in RA patients, despite them having more CD14+PLT+ cells. This finding suggests that, in addition to mCD162, other molecules on the surface of monocytes participate in PLT–monocyte interaction during inflammation. This fact is not exclusive to RA, and we previously found an increased percentage of CD14+PLT+ and a lower expression of mCD162 on monocytes in other chronic inflammatory diseases, such as ulcerative colitis and SLE [29,32]. Some authors have described a mCD162 downregulation on monocytes in the presence of endotoxin in HIV patients or after leukocyte activation [4,30,31,33,52]. There are three possible explanations for these findings. First, the lower expression of mCD162 may have been due to a misdetection by the binding of PLTs that hide this molecule. This is unlikely because RA monocytes with or without bound PLTs had a similar mCD162 expression in our experiments. Second, the lower expression of mCD162 may be related to the activation state of monocytes [4,52] and the shedding of this molecule from their cell surface. Particularly, IL-8 and GM-CSF induce ADAM10 to shed CD162 on the cell-surface [33,53]. However, despite the lower mCD162 expression on RA monocytes, we did not find differences in sCD162 levels, the product of mCD162 shedding, between RA and HD. Since we measured sCD162 on plasma samples and supernatants from whole-blood cultures, we cannot rule out sCD162 consumption and/or degradation in our experimental system. Third, the lower expression of mCD162 on RA monocytes may have been due to reduced transcription. Therefore, we cannot discard the possibility that mCD162 downregulation is secondary to activation and shedding or to reduced transcription in RA monocytes.

The follow-up analysis of patients during our study showed that TCZ treatment exacerbated the differences between RA patients and HD, increasing the percentage of CD14+PLT+ and decreasing plasmatic sCD62P and the mCD162 expression on monocytes. Again, these results support the idea that the binding of PLT to monocytes is a regulatory mechanism. In line with this, we found that, in patients in remission at 12 weeks, the percentage of CD14+PLT+ increased and correlated with the decrease in sCD62P. This result seems to indicate that the binding of non-activated PLT to monocytes has beneficial

consequences. However, it is possible that other DMARDs have different effects on monocyte and PLT interaction due to characteristic target cells in the therapy mechanisms of action. In line with this, Veale et al. reported a decrease in sCD62P after sulphasalazine. Although Bunescu et al. reported a decrease in monocyte activation after MTX but not after TNF blocker treatment, they did not find changes in monocyte–PLT aggregates after either of the treatments [19,50].

Some studies have revealed different consequences after PLT–monocyte interaction. Thus, the specific binding of PLTs from RA patients to HD monocytes through CD147 increases TNF α and IL-6 expression on monocytes [26]. In contrast, we have reported that the co-cultures of PLT from HD with synovial fluid cells from RA patients reduced inflammatory cytokine production and increased IL-10 production [54]. Thus, it is likely that PLT can exert different effects, depending on the environment in which they have been “educated” and the cellular target for their binding. We speculate that the binding of PLT to monocytes after TCZ, with less inflammation and activation of PLT and monocytes, may have different consequences in comparison to binding before TCZ treatment.

When we stimulated *in vitro* whole blood from HD with LPS or rhIL-6, the percentage of CD14+PLT+ increased. These results would explain *ex vivo* observations in patients before TCZ therapy. It is possible that IL-6 modifies the activation status of monocytes. Another possibility is that IL-6 induces CD16 expression on monocytes and PLTs would therefore preferentially bind to CD16+ monocytes [34,37,51]. This is unlikely in our settings because we did not find differences in CD16 expression on monocytes cultured for 28 h with or without rhIL-6 (data not shown). A detailed kinetics with different times of culture will clarify this point. IL-6 might also activate PLTs in RA patients. However, we observed a higher binding of PLT to monocytes without higher PLT activation, suggesting that both monocyte activation and phenotype changes are crucial in the interaction with PLT.

Further conclusions regarding the involvement of IL-6 in PLT–monocyte interaction were obtained when we blocked *in vitro* IL-6 signaling with TCZ. The addition of TCZ to the culture prior to, but not after, LPS or rhIL-6 prevented the increase in CD14+PLT+, suggesting that TCZ has a preventive effect. Nevertheless, we are aware of the difficulty of extrapolating the results of *in vitro* 28 h experiments to *in vivo* RA patients after 12 weeks of follow-up [4,16,55]. Additionally, differences in both monocytes and PLTs between RA patients and HD could also explain this difference, as monocytes and PLTs from RA patients are activated [4,16,55]. Further experiments with RA samples will reveal if the *in vitro* effects of TCZ over monocyte–PLT conjugates are equivalent in RA and HD. Interestingly, in RA patients, despite the high levels of CD14+PLT+ in half of the patients before TCZ, these increased further after initiating TCZ treatment. A possible explanation for the high levels at baseline in this group is that CD14+PLT+ is an induced regulatory mechanism to try to control inflammation.

In line with our findings with TCZ treatment, mCD162 expression decreased when we added TCZ prior to rhIL-6 culture. However, we did not reproduce this effect when TCZ was added before or after LPS culture. These results support the idea that other molecules, in addition to IL-6, regulate mCD162 in an inflammatory context. Hashizume et al. showed that the stimulation of whole blood with IL-6 for two hours downregulated mCD162 expression [53]. We did not reproduce the results of Hashizume et al. when stimulating with rhIL-6. Differences in culture timing could explain this discrepancy, as our experimental system has a 28-h duration.

To avoid the interference of multiple mechanisms involved in different phases of RA, we have only included patients with a long disease duration. This restriction may have biased the cohort to a group with more systemic inflammation and refractoriness to previous DMARDs. This restriction has also limited the number of patients. To generalize our findings, a larger cohort, including early-onset patients and patients without previous treatments, should be included. Furthermore, our observations should be completed with additional experiments that could explain the mechanism by which TCZ treatment increases CD14+PLT+, as well as the functional consequences of this rise. Nevertheless, in addition

to the description of a new mechanism in the pathology of RA, the role of monocyte–PLT conjugates in the modulation of inflammation, our results suggest that the percentage of CD14+PLT+ can be applied as a biomarker of early remission to TCZ treatment.

4. Materials and Methods

4.1. Patients

Peripheral blood samples from 35 RA patients and 15 HD were collected in BD vacutainer CPT tubes containing heparin (BD, Franklin Lakes, NJ). RA diagnosis was based on the American College of Rheumatology diagnostic criteria for RA [56]. All RA patients were refractory to standard treatment with DMARDs, including MTX. TCZ treatment was started following European and Spanish guidelines [57,58]. The demographic, clinical and laboratory data of RA patients enrolled in this study are shown in Table 1. This study was approved by the ethics committee of Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. In accordance with the Declaration of Helsinki, written consent was obtained from all patients.

Table 1. Demographic, clinical, and laboratory characteristic data of study patients.

	RA (n = 35)	HD (n = 15)	p
Sex, % (n), women	80.6 (28)	80 (12)	0.96
Age in years, mean ± sd	53.82 ± 10.72	52.48 ± 8.1	0.72
Years of evolution, median (IQR)	12.5 (7–17)		
Corticoids, % (n)	67.7 (21)		
Monotherapy, % (n)	29 (9)		
MTX, % (n)	42 (13)		
Previous biological therapies, % (n)	64.5 (20)		
HAQ, mean ± sd	1.4 ± 0.67		
DAS28, mean ± sd	5.7 ± 1.15		
ESR (mm/h), mean ± sd	51.4 ± 32		
CRP (mg/L), median (IQR)	24.6 (4–68)		
ACPA+, % (n)	61.3 (19)		
ACPA (UI/mL), median (IQR)	140.7 (54–318)		
RF+, % (n)	71 (22)		
RF (UI/mL), median (IQR)	161 (32.5–333.5)		

Patients were treated with 8 mg/kg of TCZ every four weeks. Response to TCZ therapy was evaluated at 12 weeks. Blood samples and clinical data were collected one hour prior to the first infusion (baseline) and one hour prior to the respective infusions at weeks four (4 w) and 12 (12 w) after initiating treatment. Laboratory analyses for all visits included a hemogram, erythrocyte sedimentation rate (ESR), C-reactive protein (CRP), rheumatoid factor (RF), and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies (ACPAs). Joint ultrasound (US) scores for all visits were evaluated using power doppler and grey scale [59]. Clinical data were collected at each visit. The disease activity score (DAS) 28 was calculated with ESR values. Simplified Disease Activity Index (SDAI), and Clinical Disease Activity Index (CDAI) were also calculated [60]. EULAR response criteria were used to classify patients as good, moderate or non-responders after 12 weeks of TCZ [61]. A good response patient (EULAR 2) had a Δ DAS28 > −1.2 and DAS28 final ≤ 3.2. A non-response patient (EULAR 0) had a Δ DAS28 ≤ −0.6 or −1.2 ≤ Δ DAS28 ≤ −0.6 and DAS28 final > 5.1. The rest of the patients (EULAR 1) had a moderate response.

4.2. Peripheral Blood Staining and Flow Cytometry Analysis

Peripheral blood cells (100 µL) were incubated for fifteen minutes at room temperature in the dark with anti-CD14-APC (clone 18D11), -CD41a-FITC (clone HIP8) (ImmunoTools, Friesoythe, Germany), and -CD162-PE (clone KPL-1) (Biolegend, San Diego, CA, USA) mAb. Red blood cells were lysed and white cells were fixed using BD FACS lysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) to be analysed by flow cytometry.

Monocyte–platelet conjugates were identified as CD14+CD41a+ cells (CD14+PLT+). Surface expression of CD162 was analysed on gated CD14+ monocytes, as well as on CD14+PLT- and CD14+PLT+. Samples were acquired with the MACSQuant Analyzer 10 flow cytometer (Miltenyi Biotec GmbH, BergischGaldbach, Germany). We calculated the percentage of positive cells and mean fluorescence intensity (MFI) of each individual marker using MACSQuant Analysis Software (v.2.13.1).

4.3. Plasma Analysis of RF, ACPAs, and Cytokines

RF titration was determined by nephelometry (Beckman ICS II, Beckman Coulter). ACPA titre was determined by EliA test using UniCAP (Phadia Laboratory Systems, Uppsala, Sweden). Plasma was tested for IL-17, IL-22, VEGF, sCD40L (Peprotech, London, UK), soluble P-Selectin (sCD62P), soluble CD162 (sCD162) (R&D Systems, Minneapolis, MN), Lipopolysaccharide binding protein (LBP) (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands), IL-10, IL-6 and soluble IL-6 receptor (sIL-6R) (ImmunoTools), using specific ELISAs according to the manufacturer's instructions. All cytokines were quantified with standard curves provided by manufacturer. The detection limits were: 31.2 pg/mL for IL-17, 15.6 pg/mL for IL-22, 31.2 pg/mL for VEGF, 15.6 pg/mL for sCD40L, 125 pg/mL for sCD62P, 31.3 pg/mL for sCD162, 4.4 ng/mL for LBP, 16 pg/mL for IL-10, 3 pg/mL for IL-6 and 230 pg/mL for sIL-6R.

4.4. Peripheral Blood Cultures

Heparinized blood was diluted with RPMI 1640 medium (supplemented with 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 mg/mL streptomycin (BioWhittaker, Verviers, Belgium)) at a proportion of 1:1.4. Blood cells were stimulated with ultrapure TLR4 agonist lipopolysaccharide (LPS) (Invivogen, San Diego, CA, USA) at 10 pg/mL for four hours before adding 50 ng/mL of recombinant human IL-6 (rhIL-6) (ImmunoTools) for 12 h. TCZ was added at 100 µg/mL 30 min prior to LPS (conditions pre) or after rhIL-6 (conditions post). Culture conditions were then as follows: TCZ (pre) + LPS + rhIL-6 and LPS + rhIL-6 + TCZ (post). As control conditions, we included: (a) absence of stimulation, (b) LPS alone, (c) rhIL-6 alone, (d) TCZ alone, (e) rhIL-6+ TCZ (post), (f) TCZ (pre) + LPS, (g) TCZ (pre) + rhIL-6, (h) LPS + TCZ (post), (i) LPS + rhIL-6. After culture, supernatants were collected and kept at −20 °C until used. A total of 100 µL of cultured whole blood from each condition was stained with anti-CD14-PECy7 clone M5E2 (BD Biosciences), anti-CD16 AF647 clone 3G8, anti-CD162 (BioLegend), anti-CD41a-FITC, anti-CD62P-APC clone HI62P (ImmunoTools). Red blood cells were lysed and white cells were fixed using BD FACS lysing solution (BD Biosciences) to be analysed by flow cytometry. Activated PLTs were identified as CD41a+CD62P+. Samples were acquired with the MACS-Quant Analyzer 10 flow cytometer (Miltenyi Biotec). We calculated the percentage of positive cells and the expression (MFI) of each individual marker using MACSQuant Analysis Software.

4.5. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Graph Pad Prism 7 software (v.7.00). The Kolmogorov–Smirnov test was applied to test the normal distribution of the data. Variables with a normal distribution were reported as mean ± standard deviation (SD) and the variables with a non-normal distribution were reported as median (interquartile range) (IQR). The *t*-test and paired *t*-test were used for the comparison of independent and related variables with normal distribution, respectively. The Mann–Whitney test and Wilcoxon test were used for the comparison of independent and related variables with non-normal distribution, respectively. The long-rank Mantel–Cox test was used to analyse differences in EULAR response during the follow-up period. *p* values lower than 0.05 were considered significant.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23105748/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, C.Z. and S.V.; methodology, A.M., C.Z. and M.À.O.; software, A.M. and C.Z.; validation, A.M., C.Z. and M.À.O.; formal analysis, A.M. and C.Z.; investigation, A.M.; resources, S.V., C.D.-T., J.J.d.A., D.R., P.E., P.M. and H.C.; data curation, A.M.; writing—original draft preparation, A.M.; writing—review and editing, C.Z. and S.V.; visualization, C.Z. and S.V.; supervision, C.Z. and S.V.; project administration, S.V.; funding acquisition, S.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study is supported by Instituto de Salud Carlos III and Fondos FEDER (PI17/00072 and PI20/00184).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of Hospital de la Santa Creu I Sant Pau (protocol codes IIBSP-PLT-2018-1 and IIBSP-PLA-2021-36 approved 03/14/2018 and 06/15/2021 respectively).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Silvia Vidal was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) and is a participant in the Program for the Stabilization of Investigators of the Direcció d'Estrategia i Coordinació del Departament de Salut, Generalitat de Catalunya. This work has been performed within the Ph.D. Immunology Program of Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Muravyev, Y.V. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakt. Revmatol.* **2018**, *56*, 356–362. [[CrossRef](#)]
2. McInnes, I.B.; Schett, G. Mechanism of Disease the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 2205–2219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Gordon, S.; Taylor, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 953–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lioté, F.; Boval-Boizard, B.; Weill, D.; Kuntz, D.; Wautier, J.L. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: Increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin. Exp. Immunol.* **1996**, *106*, 13–19. [[CrossRef](#)]
5. Swirski, F.K.; Nahrendorf, M.; Etzrodt, M.; Wildgruber, M.; Panizzi, P.; Figueiredo, J.; Kohler, R.H.; Chudnovskiy, A.; Waterman, P.; Aikawa, E.; et al. Identification Monocytes Inflammatory of Splenic Reservoir and Their Deployment Sites. *Science* **2009**, *325*, 612–616. [[CrossRef](#)]
6. Boutet, M.A.; Courties, G. Novel insights into macrophage diversity in rheumatoid arthritis synovium. *Autoimmun. Rev.* **2021**, *20*, 102758. [[CrossRef](#)]
7. Nakashima, T.; Takayanagi, H. The dynamic interplay between osteoclasts and the immune system. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *473*, 166–171. [[CrossRef](#)]
8. Semple, J.W.; Freedman, J. Platelets and innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, *67*, 499–511. [[CrossRef](#)]
9. Smith, T.L.; Weyrich, A.S. Platelets as central mediators of systemic inflammatory responses. *Thromb. Res.* **2011**, *127*, 4. [[CrossRef](#)]
10. Tunjungputri, R.N.; van der Ven, A.J. Differential effects of platelets and platelet inhibition by ticagrelor on TLR2- and TLR4-mediated inflammatory responses. *Thromb. Haemost.* **2015**, *113*, 1035–1045.
11. Zamora, C.; Cantó, E. Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **2013**, *94*, 521–529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cognasse, F.; Nguyen, K.A. The inflammatory role of platelets via their TLRs and Siglec receptors. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Habets, K.L.L.; Trouw, L.A. Anti-citrullinated protein antibodies contribute to platelet activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2015**, *17*, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Estevez, B.; Du, X. New concepts and mechanisms of platelet activation signaling. *Physiology* **2017**, *32*, 162–177. [[CrossRef](#)]
15. Cafaro, G.; Bartoloni, E. Platelets: A potential target for rheumatoid arthritis treatment? *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2019**, *15*, 1–3. [[CrossRef](#)]
16. Yun, S.H.; Sim, E.H. Platelet activation: The mechanisms and potential biomarkers. *Biomed Res. Int.* **2016**, *2016*, 10–15. [[CrossRef](#)]
17. Pamuk, G.E.; Vural, Ö. Increased platelet activation markers in rheumatoid arthritis: Are they related with subclinical atherosclerosis? *Platelets* **2008**, *19*, 146–154. [[CrossRef](#)]
18. Boilard, E.; Blanco, P. Platelets: Active players in the pathogenesis of arthritis and SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2012**, *8*, 534–542. [[CrossRef](#)]
19. Bunescu, A.; Seideman, P. Enhanced Fc γ Receptor I, α M β 2 Integrin Receptor Expression by Monocytes and Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: Interaction with Platelets. *J. Rheumatol.* **2004**, *31*, 2345–2355.

20. Stephen, J.; Emerson, B. The uncoupling of monocyte-platelet interactions from the induction of proinflammatory signaling in monocytes. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 5677–5683. [[CrossRef](#)]
21. da Costa Martins, P.A.; van Gils, J.M. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. *J. Leukoc. Biol.* **2006**, *79*, 499–507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Simon, D.I.; Chen, Z. Platelet glycoprotein Ib α is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 193–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lindmark, E.; Tenno, T. Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2000**, *20*, 2322–2328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Silverstein, R.L.; Asch, A.S. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J. Clin. Investig.* **1989**, *84*, 546–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Schulz, C.; Von Brühl, M.L. EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *J. Thromb. Haemost.* **2011**, *9*, 1007–1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Rong, M.; Wang, C. Platelets induce a proinflammatory phenotype in monocytes via the CD147 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, 478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. van Gils, J.M.; Zwaginga, J.J. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *85*, 195–204. [[CrossRef](#)]
28. Larsen, E.; Celi, A. PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* **1989**, *59*, 305–312. [[CrossRef](#)]
29. Mariscal, A.; Zamora, C. Phenotypic and Functional Consequences of PLT Binding to Monocytes and Its Association with Clinical Features in SLE. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 4719. [[CrossRef](#)]
30. Liang, H.; Duan, Z. Higher levels of circulating monocyte-platelet aggregates are correlated with viremia and increased sCD163 levels in HIV-1 infection. *Cell. Mol. Immunol.* **2015**, *12*, 435–443. [[CrossRef](#)]
31. Marsik, C.; Mayr, F. Endotoxin down-modulates P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) on neutrophils in humans. *J. Clin. Immunol.* **2004**, *24*, 62–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zamora, C.; Canto, E. Inverse Association Between Circulating Monocyte-Platelet Complexes and Inflammation in Ulcerative Colitis Patients. *Inflamm. Bowel Dis.* **2018**, *24*, 818–828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Davenpeck, K.L.; Brummet, M.E. Activation of Human Leukocytes Reduces Surface P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1, CD162) and Adhesion to P-Selectin In Vitro. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 2764–2772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Passacquale, G.; Vamadevan, P. Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Lang, D.; Dohle, F. Down-Regulation of Monocyte Apoptosis by Phagocytosis of Platelets: Involvement of a Caspase-9, Caspase-3, and Heat Shock Protein 70-Dependent Pathway. *J. Immunol.* **2002**, *168*, 6152–6158. [[CrossRef](#)]
36. Ammon, C.; Kreutz, M. Platelets induce monocyte differentiation in serum-free coculture. *J. Leukoc. Biol.* **1998**, *63*, 469–476. [[CrossRef](#)]
37. Gudbrandsdottir, S.; Hasselbalch, H.C. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF- α secretion by monocytes. *J. Immunol.* **2013**, *191*, 4059–4067. [[CrossRef](#)]
38. Schwartzkopff, F.; Petersen, F. CXC chemokine ligand 4 (CXCL4) down-regulates CC chemokine receptor expression on human monocytes. *Innate Immun.* **2012**, *18*, 124–139. [[CrossRef](#)]
39. Sarma, J.; Laan, C.A. Increased Platelet Binding to Circulating Monocytes in Acute Coronary Syndromes. *Circulation* **2002**, *105*, 2166–2171. [[CrossRef](#)]
40. Harding, S.A.; Sommerfield, A.J. Increased CD40 ligand and platelet—monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* **2004**, *176*, 321–325. [[CrossRef](#)]
41. Joseph, J.E.; Harrison, P. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br. J. Haematol.* **2001**, *115*, 451–459. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Pamuk, G.E.; Turgut, B. Increased circulating platelet-leucocyte complexes in patients with primary Raynaud’s phenomenon and Raynaud’s phenomenon secondary to systemic sclerosis: A comparative study. *Blood Coagul. Fibrinolysis* **2007**, *18*, 297–302. [[CrossRef](#)]
43. Pamuk, G.E.; Pamuk, Ö.N. Elevated platelet-monocyte complexes in patients with psoriatic arthritis. *Platelets* **2009**, *20*, 493–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. von Hundelshausen, P.; Weber, K.S.C. RANTES Deposition by Platelets Triggers Monocyte Arrest on Inflamed and Atherosclerotic Endothelium. *Circulation* **2001**, *103*, 1772–1777. [[CrossRef](#)]
45. Linke, B.; Schreiber, Y. Activated Platelets Induce an Anti-Inflammatory Response of Monocytes/Macrophages through Cross-Regulation of PGE2 and Cytokines. *Mediat. Inflamm.* **2017**, *2017*, 1463216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Kiely, P.; Walsh, D. Outcome in rheumatoid arthritis patients with continued conventional therapy for moderate disease activity—the early RA network (ERAN). *Rheumatology* **2011**, *50*, 926–931. [[CrossRef](#)]
47. Tono, T.; Aihara, S. Effects of anti-IL-6 receptor antibody on human monocytes. *Mod. Rheumatol.* **2015**, *25*, 79–84. [[CrossRef](#)]
48. Lee, J.S.; Oh, J.S. Tocilizumab-induced Thrombocytopenia in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheum. Dis.* **2019**, *26*, 186. [[CrossRef](#)]
49. Gibiansky, L.; Frey, N. Linking interleukin-6 receptor blockade with tocilizumab and its hematological effects using a modeling approach. *J. Pharmacokinetic. Pharmacodyn.* **2012**, *39*, 5–16. [[CrossRef](#)]

50. Veale, D.J.; Maple, C. Soluble cell adhesion molecules—P-selectin and ICAM-1, and disease activity in patients receiving sulphasalazine for active rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* **1998**, *27*, 296–299.
51. Lee, S.J.; Yoon, B.R. Activated Platelets Convert CD14+CD16- Into CD14+CD16+ Monocytes With Enhanced FcγR-Mediated Phagocytosis and Skewed M2 Polarization. *Front. Immunol.* **2021**, *11*, 3363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Torsteinsdóttir, I.; Arvidson, N.G. Monocyte activation in rheumatoid arthritis (RA): Increased integrin, Fcγ and complement receptor expression and the effect of glucocorticoids. *Clin. Exp. Immunol.* **1999**, *115*, 554–560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hashizume, M.; Higuchi, Y. IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation. *Cytokine* **2011**, *54*, 92–99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zamora, C.; Cantó, E. Binding of Platelets to Lymphocytes: A Potential Anti-Inflammatory Therapy in Rheumatoid Arthritis. *J. Immunol.* **2017**, *198*, 3099–3108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Cloutier, N.; Paré, A. Platelets can enhance vascular permeability. *Blood* **2012**, *120*, 1334–1343. [[CrossRef](#)]
56. Matsumoto, Y.; Uemura, M. Clinical usefulness of the 1987 revised criteria for rheumatoid arthritis by American Rheumatism Association. *Nihon Naika Gakkai Zasshi* **1988**, *77*, 742–743. [[CrossRef](#)]
57. Sanmartí, R.; García-Rodríguez, S. Actualización 2014 del Documento de Consenso de la Sociedad Española de Reumatología sobre el uso de terapias biológicas en la artritis reumatoide. *Reumatol. Clin.* **2015**, *11*, 279–294. [[CrossRef](#)]
58. Smolen, J.S.; Landewé, R. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann. Rheum. Dis.* **2017**, *76*, 960–977. [[CrossRef](#)]
59. Botar-Jid, C.; Bolboaca, S. Gray scale and power Doppler ultrasonography in evaluation of early rheumatoid arthritis. *Med. Ultrason.* **2010**, *12*, 300–305.
60. Futó, G.; Somogyi, A. Visualization of DAS28, SDAI, and CDAI: The magic carpets of rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **2014**, *33*, 623–629. [[CrossRef](#)]
61. Van Gestel, A.M.; Prevoo, M.L.L. Development and validation of the European League Against Rheumatism response criteria for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **1996**, *39*, 34–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. RESUMEN GLOBAL DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3. ARTÍCULO I

Phenotypic and Functional Consequences of PLT Binding to Monocytes and Its Association with Clinical Features in SLE

Anaís Mariscal, Carlos Zamora, Berta Magallares, Tarek Carlos Salman-Monte, Cesar Díaz-Torné, Iván Castellví, Héctor Corominas and Silvia Vidal.

International Journal of Molecular Sciences. 2021, Apr 29;22(9):4719.

4.3.1. Resumen global de resultados

Las plaquetas son capaces de modular la respuesta inmune, bien directamente al unirse a células del sistema inmune, o indirectamente, al liberar mediadores solubles. En individuos sanos, la interacción mayoritaria ocurre con monocitos, principalmente a través de la P-selectina expresada por la plaqueta activada, también conocida como CD62P, con el PSGL-1 en la superficie de los monocitos, también conocido como CD162. Esta interacción desencadena una serie de cambios fenotípicos y funcionales en el monocito. En LES, se han descrito una mayor activación de las plaquetas circulantes, así como alteraciones numéricas, fenotípicas y funcionales en el monocito. Sin embargo, faltan trabajos que estudien las consecuencias de la interacción de plaquetas y monocitos en pacientes con LES, así como su importancia en la fisiopatología de la enfermedad.

Este trabajo se diseñó con el objetivo de cuantificar y caracterizar fenotípicamente y funcionalmente a los monocitos con plaquetas unidas en individuos sanos y en pacientes con LES, y estudiar la implicación de estos monocitos en la actividad de la enfermedad. Para ello, se incluyeron 16 donantes sanos y 49 pacientes con LES que no estuvieran tratados con glucocorticoides a dosis mayores de 10 mg/día. Los donantes sanos y los pacientes estaban emparejados en sexo y edad. De todos ellos se recogió muestra de sangre heparinizada, de la cual se aislaron células mononucleadas (PBMCs) y plasma pobre en plaquetas y se purificaron plaquetas. Se analizó por citometría de flujo el fenotipo, la capacidad de secreción de citocinas, de fagocitosis y eferocitosis de los monocitos con plaquetas unidas activadas o no activadas o sin plaquetas unidas. También se determinaron por ELISA los niveles plasmáticos de aquellos factores

solubles liberados por el monocito o por la plaqueta con relevancia en la fisiopatología del LES. Posteriormente, se estudió la asociación de todos estos parámetros con parámetros clínicos y de laboratorio utilizados en las guías clínicas para evaluar la actividad del LES.

Tanto en individuos sanos como en pacientes con LES se encontró que había un mayor porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en las poblaciones de monocitos intermediarios y no clásicos que en la población de monocitos clásicos, debido a una mayor unión de las plaquetas activadas. Sin embargo, los pacientes con LES presentaban un mayor porcentaje de monocitos con plaquetas activadas unidas que los donantes sanos en las tres poblaciones de monocitos. Los monocitos con plaquetas unidas, tanto no activadas como activadas, tenían mayor expresión de HLA-DR, CD86, CD54, CD16 y CD64 que los monocitos sin plaquetas unidas. Además, la expresión de HLA-DR y el CD54 en monocitos con plaquetas activadas era aún mayor que en los monocitos con plaquetas no activadas.

Mediante ensayos funcionales se observó, que los monocitos con plaquetas unidas tenían mayor capacidad de fagocitar *Escherichia coli*, pero no los neutrófilos apoptóticos (eferocitosis), tanto si procedían de donantes sanos como de pacientes con LES. Asimismo, los monocitos con plaquetas unidas, y más aquellos con plaquetas activadas unidas, secretaban mayor cantidad de IL-10, pero no de TNF- α , que los monocitos sin plaquetas.

Analizando la expresión de moléculas implicadas en la unión de monocito y plaqueta, se observó que los monocitos de los pacientes con LES expresaban menos PSGL-1 que los monocitos de donantes sanos. Además, la expresión de PSGL-1 en los monocitos se correlacionó de manera inversa con el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en pacientes con LES. Por otro lado, los monocitos de pacientes con LES presentaron mayor expresión de CD40 que los monocitos de donantes sanos, sin obtenerse correlación con el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas.

Por último, al estudiar la asociación de los monocitos con plaquetas unidas y los parámetros clínicos y de laboratorio indicadores de la actividad del LES, encontramos que el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas era menor en los pacientes con autoanticuerpos anti-dsDNA, con consumo de complemento, hematuria y con un índice de albúmina/creatinina superior a 2.5, indicativo de daño renal. Además, el porcentaje de monocitos con plaquetas activadas unidas era menor en aquellos pacientes con autoanticuerpos anti-Sm y anti-C1q. Finalmente,

obtuvimos una relación inversa entre el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas y con plaquetas activadas unidas y el título de autoanticuerpos anti-dsDNA.

4.3.2. Discusión y relevancia

El principal hallazgo de este estudio es que los pacientes con LES tienen más monocitos con plaquetas unidas en las tres poblaciones de monocitos analizadas, y esto se asocia con una mayor activación de la plaqueta. Concretamente, los pacientes con menor actividad de la enfermedad (anticuerpos anti-dsDNA, consumo de complemento y hematuria, que indican daño renal por depósito de inmunocomplejos) son los que tienen más monocitos con plaquetas unidas. Además, el hecho de que la principal molécula de unión a las plaquetas (PSGL-1) esté menos expresada en monocitos de LES y se asocie inversamente al grado de unión indica que el mecanismo de unión de monocitos y plaquetas en LES no es idéntico al de individuos sanos. Este resultado no se había descrito con anterioridad en pacientes con LES, y abre el camino a profundizar sobre los mecanismos de unión y señalización de las plaquetas a los monocito en LES y otras EAI.

Está descrito que los monocitos de pacientes con LES tienen alteraciones fenotípicas y funcionales. Nosotros y otros autores hemos observado un incremento en la expresión de algunas moléculas en los monocitos con plaquetas unidas, así como también un incremento en ciertas funciones desempeñadas por los monocitos. El hecho de que aquellos pacientes con LES con menor actividad tengan más monocitos con plaquetas activadas unidas sugiere que, en este contexto, la unión de las plaquetas a los monocitos podría ser un mecanismo de compensación de las alteraciones intrínsecas del monocito. Este resultado abre la puerta a futuros estudios que investiguen los posibles beneficios de terapias con plaquetas en enfermedades autoinmunes.

4.4. ARTÍCULO II

Increase of Circulating Monocyte–Platelet Conjugates in Rheumatoid Arthritis Responders to IL-6 Blockage

Anaís Mariscal, Carlos Zamora, César Díaz-Torné, M^a Àngels Ortiz, Juan José de Agustín, Delia Reina, Paula Estrada, Patricia Moya, Héctor Corominas and Sílvia Vidal

International Journal of Molecular Sciences. 2022, 23(10), 5748.

4.4.1. Resumen global de resultados

La AR es una enfermedad autoinmune con un importante componente inflamatorio. En la fisiopatología de la enfermedad participan tanto la inmunidad adaptativa como la innata. Esta última lleva a cabo un destacado papel en la destrucción de la sinovia articular, en la que participan activamente los monocitos. Éstos son reclutados a la sinovia, en la que sintetizan y liberan citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α), y además se diferencian a macrófagos y osteoclastos. Las plaquetas también están involucradas en el proceso inflamatorio de la AR. Están más activadas: presentan una mayor expresión de CD62P y secreción de sCD40L. Además, también se ha encontrado mayor número de monocitos con plaquetas unidas. Sin embargo, pocos estudios evalúan la relación entre este aumento en la unión de monocitos y plaquetas y la actividad de la AR o la respuesta al tratamiento.

En primer lugar, este estudio se diseñó para evaluar la utilidad de cuantificar los monocitos con plaquetas unidas como indicadores de inflamación en AR. En segundo lugar, quisimos estudiar si el porcentaje de monocitos y plaquetas unidos cambiaba tras el bloqueo terapéutico de la señalización por IL-6 (tocilizumab), y su posible significado. Para ello se incluyeron 35 pacientes con AR refractarios a los tratamientos con DMARDs que iniciaban terapia con tocilizumab y 15 donantes sanos, de los cuales se recogió muestra de sangre heparinizada. Los pacientes y los donantes sanos estaban emparejados en sexo y edad. A los pacientes se les extrajo una muestra una hora antes de recibir la primera dosis de tocilizumab, así como a las 4 y 12 semanas, previamente a la infusión de la segunda y tercera dosis respectivamente. De todas las muestras de sangre, se aislaron PBMCs y plasma. Se analizaron

por citometría de flujo los complejos monocito-plaqueta, así como la expresión del PSGL-1 y sus variaciones por el tratamiento con tocilizumab. También se midieron por ELISA los niveles plasmáticos de factores solubles liberados por el monocito o por la plaqueta que fueran relevantes en la fisiopatología de la AR. Todos estos parámetros se relacionaron con parámetros clínicos y de laboratorio utilizados en las guías clínicas para evaluar la actividad de la AR.

Previo al tratamiento con tocilizumab se encontró que los pacientes con AR tenían un mayor porcentaje de monocitos con plaquetas unidas que los individuos sanos. Sin embargo, los monocitos de pacientes con AR tenían una menor expresión de PSGL-1 que los monocitos de individuos sanos. Además, la expresión de PSGL-1 en los monocitos se correlacionó inversamente con el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en pacientes con AR, pero directamente en individuos sanos. El porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en pacientes con AR se correlacionó también de manera inversa con parámetros inflamatorios (VSG y PCR), mientras que el nivel de PSGL-1 en los monocitos mostró una asociación con la afectación articular, así como con el grado de malestar del paciente.

Tras el tratamiento con tocilizumab los niveles de monocitos con plaquetas unidas se incrementaron a las 4 semanas, mientras que la expresión de PSGL-1 en los monocitos disminuyó. Estos cambios se mantuvieron también a la semana 12, momento en el que se evaluó la eficacia del tratamiento. Encontramos que un mayor porcentaje de los pacientes que habían iniciado el tratamiento con unos niveles de monocitos con plaquetas unidas más bajos presentaban respuesta al tratamiento con tocilizumab. Además, en aquellos pacientes que alcanzaron la remisión clínica a la semana 12 se había incrementado el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en las primeras 4 semanas, mientras que en los que no alcanzaron la remisión, el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas no había variado o incluso había disminuido. Estos cambios en la unión de monocitos a plaquetas también se asociaron con cambios en la actividad de la enfermedad según las escalas usadas en la práctica clínica. Esta asociación se encontró tanto con parámetros inflamatorios (VSG) como con los datos ecográficos de afectación articular.

Estos resultados se vieron parcialmente reproducidos en ensayos *in vitro* con PBMCs de donantes sanos. Observamos que añadiendo IL-6 a los cultivos se incrementaba el porcentaje de monocitos unidos a plaquetas, y que este aumento se prevenía al pretratar las PBMCs con tocilizumab.

4.4.2. Discusión y relevancia

El principal hallazgo de este estudio es cómo el tratamiento con tocilizumab aumenta la unión de plaquetas a monocitos, y la asociación de esta modulación a la respuesta y remisión clínica de los pacientes con AR.

Otros autores han encontrado que los niveles de monocitos con plaquetas unidas están aumentados en pacientes con AR. Además, hay un estudio que encuentra que esta unión tiene consecuencias proinflamatorias sobre el monocito cuando la señalización ocurre a través de la molécula CD147. Sin embargo, se ha descrito que monocitos y plaquetas pueden interactuar a través de varios pares de moléculas diferentes, lo que posiblemente desencadenaría consecuencias también diferentes. En nuestro estudio, observamos que la expresión del PSGL-1, principal molécula de unión del monocito a las plaquetas en individuos sanos, estaba reducida en pacientes con AR y que, además, esta reducción se hace aún más acusada tras el tratamiento con tocilizumab. En cambio, tras el tratamiento con tocilizumab, se observó un mayor porcentaje de monocitos con plaquetas unidas. Esto indica que, en este escenario, son otras moléculas las que podrían estar involucradas en la interacción del monocito y la plaqueta.

Este trabajo sugiere que la interacción con las plaquetas a través de diferentes pares de moléculas puede tener diferentes consecuencias sobre el monocito. Además, pone también de manifiesto la utilidad de medir los niveles de monocitos con plaquetas unidas como herramienta para monitorizar el tratamiento con tocilizumab en los pacientes con AR. Este hallazgo abre una línea de investigación sobre la utilidad de monitorizar los niveles de monocitos con plaquetas unidas en AR en respuesta a otros tratamientos, así como su utilidad en otras EAI o enfermedades inflamatorias.

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En pacientes con LES y AR, el PSGL-1 no es la única molécula involucrada en la unión monocito plaqueta. Esta conclusión se soporta en las siguientes observaciones:
 - a. A pesar de que los monocitos de pacientes con LES y AR presentan menor expresión de PSGL-1, en los pacientes hay mayor proporción de monocitos con plaquetas unidas que en individuos sanos.
 - b. La expresión de PSGL-1 se asocia inversamente al porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en pacientes con LES y AR, pero no en individuos sanos.
2. Hay una unión preferente de las plaquetas a los monocitos CD16⁺, tanto en individuos sanos como en pacientes con LES. Sin embargo, el hecho de que el incremento en la proporción de monocitos con plaquetas unidas observado en pacientes con LES afecte a las tres subpoblaciones de monocitos, indica que no es la mayor expresión de CD16 en los monocitos de LES el principal responsable de la unión incrementada de las plaquetas.
3. Respecto a los individuos sanos, en pacientes con LES hay mayor proporción de monocitos con superior capacidad de fagocitosis, presentación antigénica, adhesión, reconocimiento de inmunocomplejos y capacidad antiinflamatoria. Esta conclusión está apoyada por la observación de que los pacientes con LES tienen un mayor porcentaje de monocitos con plaquetas unidas, y estos tienen mayor expresión de HLA-DR, CD86, CD54, CD16 y CD64 y mayor capacidad de fagocitar bacterias, así como de secreción de IL-10.
4. El papel inmunomodulador de la unión de las plaquetas a los monocitos tiene consecuencias sobre la actividad clínica de los pacientes con LES y AR. Esta conclusión deriva de las siguientes observaciones:
 - a. Los pacientes con LES con mayor porcentaje de monocitos con plaquetas unidas presentan menor actividad de la enfermedad, evidenciada por la no presencia de autoanticuerpos anti-dsDNA, la ausencia de consumo de complemento y de hematuria, así como tener ratios albúmina/creatinina <2.5, indicativo de daño renal.

- b. En pacientes con AR el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas se asocia de manera inversa a los niveles de marcadores de inflamación (VSG y PCR).
- 5. La unión de plaquetas a monocitos y, por consiguiente, el efecto inmunomodulador de las plaquetas sobre el monocito es susceptible a regulación. Esta conclusión se sustenta en la observación de que en pacientes con AR, tras la primera dosis de tocilizumab, se incrementa el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas y disminuye la expresión de PSGL-1 en los monocitos.
- 6. La monitorización del porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en los pacientes tratados con tocilizumab podría ser una herramienta de monitorización de la respuesta al tratamiento. Esta conclusión está apoyada por las siguientes observaciones:
 - a. El incremento en el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas observado en pacientes con AR tras el tratamiento con tocilizumab se asocia a la disminución de VSG y de afectación articular.
 - b. Tras el tratamiento con tocilizumab aumenta el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas en aquellos pacientes que alcanzan la remisión clínica.
- 7. El efecto inmunomodulador de las plaquetas sobre el monocito y su relevancia clínica podría ser extrapolable a otras EAI, puesto que tanto en LES como en AR el porcentaje de monocitos con plaquetas unidas se asocia con una menor actividad de la enfermedad.

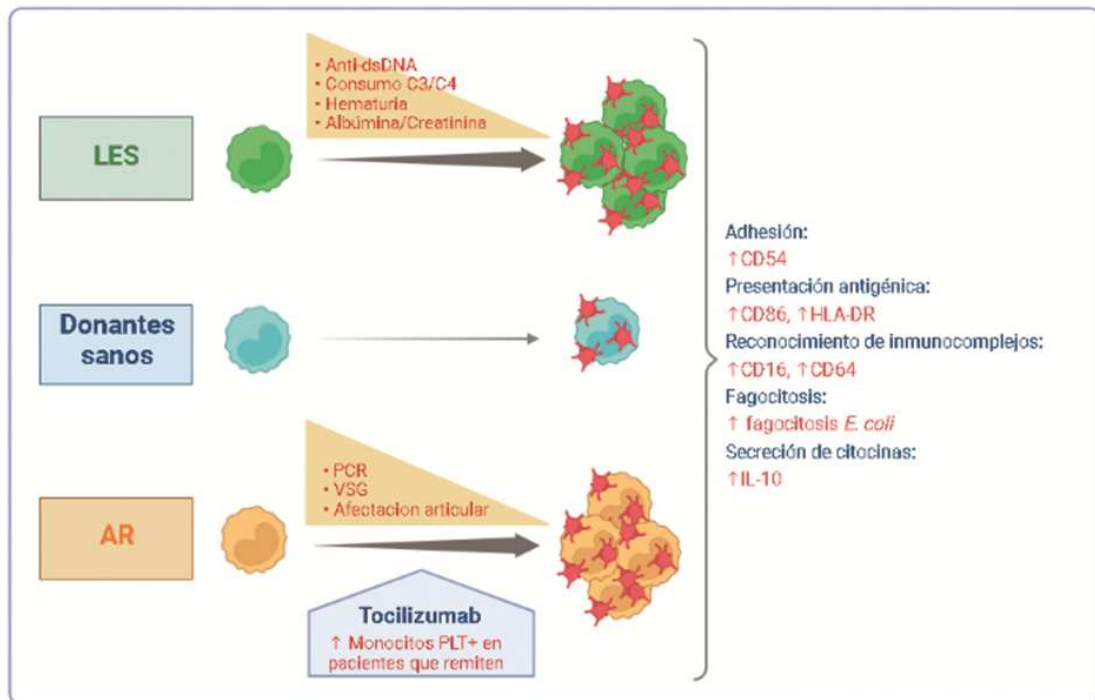


Figura 8. Esquema final del modelo presentado en la hipótesis con los resultados más relevantes de la tesis. (Creada con Biorender.com).

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Langan David, Rose Noel R, M. K. D. Common innate pathways to autoimmune disease David. *Clin. Immunol.* **3**, 139–148 (2020).
2. Bot, A. In this issue: autoimmunity and innate immunity. *Int. Rev. Immunol.* **33**, 1–2 (2014).
3. Lerner, A., Jeremias, P. & Matthias, T. The world incidence and prevalence of autoimmune diseases is increasing. *Int. J. Celiac Dis.* **3**, 151–155 (2015).
4. Brown, G. J. *et al.* TLR7 gain-of-function genetic variation causes human lupus. *Nat.* **2022 6057909 605**, 349–356 (2022).
5. Schejbel, L. *et al.* Molecular basis of hereditary C1q deficiency--revisited: identification of several novel disease-causing mutations. *Genes Immun.* **12**, 626–634 (2011).
6. Vanderlugt, C. J. & Miller, S. D. Epitope spreading. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 831–836 (1996).
7. Zeher, M. & Szegedi, G. Types of autoimmune disorders. Classification. *Orv. Hetil.* **148**, 21–24 (2007).
8. Hedrich, C. M. Shaping the spectrum - From autoinflammation to autoimmunity. *Clin. Immunol.* **165**, 21–28 (2016).
9. Hedrich, C. M. & Tsokos, G. C. Bridging the gap between autoinflammation and autoimmunity. *Clin. Immunol.* **147**, 151–154 (2013).
10. Masters, S. L. Broadening the definition of autoinflammation. *Semin. Immunopathol.* **37**, 311–312 (2015).
11. Szekanecz, Z. *et al.* Autoinflammation and autoimmunity across rheumatic and musculoskeletal diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* doi:10.1038/s41584-021-00652-9
12. Barber, M. R. W. *et al.* Global epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* **17**, 515–532 (2021).
13. Doria, A. *et al.* Long-Term Prognosis and Causes of Death in Systemic Lupus Erythematosus. *Am. J. Med.* **119**, 700–706 (2006).
14. Fors Nieves, C. E. & Izmirly, P. M. Mortality in Systemic Lupus Erythematosus: an Updated Review. *Curr. Rheumatol. Rep.* **18**, (2016).
15. Kiriakidou, M; Ching, C. Systemic lupus erythematosus. *Ann. Intern. Med.* **2**, 313–319 (2020).
16. Tsokos, G. C. Autoimmunity and organ damage in systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* **21**, 605–614 (2020).
17. Deafen, D. *et al.* A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **35**, 311–318 (1992).
18. Yang, F., He, Y., Zhai, Z., Sun, E. & Guan, Q. Programmed Cell Death Pathways in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol. Res.* **2019**, (2019).
19. Munoz, L. E. *et al.* SLE - A disease of clearance deficiency? *Rheumatology* **44**, 1101–1107 (2005).
20. Walport, M. J. Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.* **4 Suppl 3**, S279–S293 (2002).
21. Stojan, G. & Petri, M. Anti-C1q in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **25**, 873–877 (2016).
22. Sinico, R. A. *et al.* Anti-C1q autoantibodies in lupus nephritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1173**, 47–51 (2009).
23. Truedsson, L., Bengtsson, A. A. & Sturfelt, G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. <https://doi-org.sire.ub.edu/10.1080/08916930701510673> **40**, 560–566 (2009).
24. Santer, D. M. *et al.* C1q deficiency leads to the defective suppression of IFN-alpha in response to nucleoprotein containing immune complexes. *J. Immunol.* **185**, 4738–4749 (2010).

25. Lood, C. *et al.* C1q inhibits immune complex-induced interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells: a novel link between C1q deficiency and systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Arthritis Rheum.* **60**, 3081–3090 (2009).
26. Santer, D. M. *et al.* C1q Deficiency Leads to the Defective Suppression of IFN- α in Response to Nucleoprotein Containing Immune Complexes. *J. Immunol.* **185**, 4738 (2010).
27. Suurmond, J. *et al.* Loss of an IgG plasma cell checkpoint in patients with lupus. *J. Allergy Clin. Immunol.* **143**, 1586–1597 (2019).
28. Simpson, N. *et al.* Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **62**, 234–244 (2010).
29. Coffman, R. L., Leberman, D. A. & Rothman, P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Adv. Immunol.* **54**, 229–270 (1993).
30. Shlomchik, M. J., Marshak-Rothstein, A., Wolfowicz, C. B., Rothstein, T. L. & Weigert, M. G. The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. *Nature* **328**, 805–811 (1987).
31. Ehrenstein, M. R. *et al.* Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID mice. *Kidney Int.* **48**, 705–711 (1995).
32. Rahman, A. Autoantibodies, lupus and the science of sabotage. *Rheumatology (Oxford)*. **43**, 1326–1336 (2004).
33. Ravirajan, C. T. *et al.* Genetic, structural and functional properties of an IgG DNA-binding monoclonal antibody from a lupus patient with nephritis. *Eur. J. Immunol.* **28**, 339–350 (1998).
34. Mackay, M. *et al.* Selective dysregulation of the Fc γ RIIB receptor on memory B cells in SLE. *J. Exp. Med.* **203**, 2157–2164 (2006).
35. Avalos, A. M. *et al.* Differential cytokine production and bystander activation of autoreactive B cells in response to CpG-A and CpG-B oligonucleotides. *J. Immunol.* **183**, 6262–6268 (2009).
36. Zhu, H., Luo, H., Yan, M., Zuo, X. & Li, Q. Z. Autoantigen Microarray for High-throughput Autoantibody Profiling in Systemic Lupus Erythematosus. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* **13**, 210–218 (2015).
37. Liu, S., Cerutti, A., Casali, P. & Crow, M. K. Ongoing immunoglobulin class switch DNA recombination in lupus B cells: analysis of switch regulatory regions. *Autoimmunity* **37**, 431–443 (2004).
38. Chen, Y. *et al.* Regulation of dendritic cells and macrophages by an anti-apoptotic cell natural antibody that suppresses TLR responses and inhibits inflammatory arthritis. *J. Immunol.* **183**, 1346–1359 (2009).
39. Van Bruggen, M. C. J. *et al.* Antigen specificity of anti-nuclear antibodies complexed to nucleosomes determines glomerular basement membrane binding in vivo. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1564–1569 (1997).
40. Kramers, C. *et al.* Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. *J. Clin. Invest.* **94**, 568–577 (1994).
41. Barrat, F. J. *et al.* Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **202**, 1131–1139 (2005).
42. Vera-Recabarren, M. A., García-Carrasco, M., Ramos-Casals, M. & Herrero, C. Comparative analysis of subacute cutaneous lupus erythematosus and chronic cutaneous lupus erythematosus: Clinical and immunological study of 270 patients. *Br. J. Dermatol.* **162**, 91–101 (2010).
43. Alarcón, G. S. *et al.* Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups: III. A comparison of characteristics early in the natural history of the LUMINA cohort. *Lupus* **8**, 197–209 (1999).
44. Hochberg, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the

- classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **40**, 1725 (1997).
45. Satoh, M. *et al.* An Evaluation on the 1982 Revised Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Japanese J. Clin. Immunol.* **10**, 186–193 (1987).
 46. Aringer, M. *et al.* 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* **71**, 1400–1412 (2019).
 47. Brown, S. J. Systemic lupus erythematosus. *Nurs. Times* **99**, 30–32 (2011).
 48. Petri, M. A. *et al.* Baseline predictors of systemic lupus erythematosus flares: data from the combined placebo groups in the phase III belimumab trials. *Arthritis Rheum.* **65**, 2143–2153 (2013).
 49. Ho, A., Barr, S. G., Magder, L. S. & Petri, M. A decrease in complement is associated with increased renal and hematologic activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **44**, 2350–2357 (2001).
 50. Bombardier, C. *et al.* Derivation of the sledai. A disease activity index for lupus patients. *Arthritis Rheum.* **35**, 630–640 (1992).
 51. Bertoli, A. M., Vilá, L. M., Reveille, J. D. & Alarcón, G. S. Systemic lupus erythematosus in a multiethnic US cohort (LUMINA): LXI. Value of C-reactive protein as a marker of disease activity and damage. *J. Rheumatol.* **35**, 2355–2358 (2008).
 52. Crowson, C. S. *et al.* The lifetime risk of adult-onset rheumatoid arthritis and other inflammatory autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* **63**, 633–639 (2011).
 53. Hunter, T. M. *et al.* Prevalence of rheumatoid arthritis in the United States adult population in healthcare claims databases, 2004–2014. *Rheumatol. Int.* **37**, 1551–1557 (2017).
 54. Cross, M. *et al.* The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 1316–1322 (2014).
 55. Muravyev, Y. V. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatol.* **56**, 356–362 (2018).
 56. Firestein, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nat. 2003 4236937* **423**, 356–361 (2003).
 57. Colquhoun, M., Gulati, M., Farah, Z. & Mouyis, M. Clinical features of rheumatoid arthritis. *Medicine (Baltimore).* **50**, 138–142 (2021).
 58. Naz, S. M., Symmons, D. P. M. & Epidemiology, M. Mortality in established rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **21**, 871–883 (2007).
 59. Widdifield, J., Paterson, J. M., Huang, A. & Bernatsky, S. Causes of Death in Rheumatoid Arthritis: How Do They Compare to the General Population? *Arthritis Care Res.* **70**, 1748–1755 (2018).
 60. Taylor, P. C. & Kiriakidis, S. Aetiopathology of rheumatoid arthritis. *Medicine (Baltimore).* **50**, 133–137 (2021).
 61. Smolen, J. S., Aletaha, D. & McInnes, I. B. Rheumatoid arthritis. *Lancet* **388**, 2023–2038 (2016).
 62. Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **233**, 233 (2010).
 63. Yoshitomi, H. Regulation of Immune Responses and Chronic Inflammation by Fibroblast-Like Synoviocytes. *Front. Immunol.* **10**, 1395 (2019).
 64. Ouboussad, L., Burska, A. N., Melville, A. & Buch, M. H. Synovial Tissue Heterogeneity in Rheumatoid Arthritis and Changes With Biologic and Targeted Synthetic Therapies to Inform Stratified Therapy. *Front. Med.* **6**, 45 (2019).
 65. Weyand, C. M. & Goronzy, J. J. Ectopic Germinal Center Formation in Rheumatoid Synovitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **987**, 140–149 (2003).

66. Mellado, M. *et al.* T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
67. Komatsu, N. & Takayanagi, H. Autoimmune arthritis: the interface between the immune system and joints. *Adv. Immunol.* **115**, 45–71 (2012).
68. Mueller, A. L. *et al.* Recent advances in understanding the pathogenesis of rheumatoid arthritis: New treatment strategies. *Cells* **10**, 1–38 (2021).
69. Kotake, S. *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* **103**, 1345–1352 (1999).
70. Wu, X., Tian, J. & Wang, S. Insight Into Non-Pathogenic Th17 Cells in Autoimmune Diseases. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
71. Onishi, R. M. & Gaffen, S. L. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* **129**, 311–321 (2010).
72. Shen, F. & Gaffen, S. L. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* **41**, 92–104 (2008).
73. Ikeuchi, H. *et al.* Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* **52**, 1037–1046 (2005).
74. Wu, F. *et al.* B Cells in Rheumatoid Arthritis : Pathogenic Mechanisms and Treatment Prospects. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
75. Bugatti, S., Vitolo, B., Caporali, R., Montecucco, C. & Manzo, A. B cells in rheumatoid arthritis: from pathogenic players to disease biomarkers. *Biomed Res. Int.* **2014**, (2014).
76. Rönnelid, J., Turesson, C. & Kastbom, A. Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis - Laboratory and Clinical Perspectives. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
77. Hua, Z. & Hou, B. TLR signaling in B-cell development and activation. *Cell. Mol. Immunol.* **10**, 103–106 (2013).
78. Dekkers, J. S. *et al.* Breach of autoreactive B cell tolerance by post-translationally modified proteins. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1449–1457 (2017).
79. Xu, X. *et al.* Increased expression of activation-induced cytidine deaminase is associated with anti-CCP and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Immunol.* **70**, 309–316 (2009).
80. Malmström, V. & Grönwall, C. The parallel worlds of ACPA-positive and RF-positive B cells. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2018 1411** **14**, 626–628 (2018).
81. Lotze, M. & Thomson, A. *Measuring Immunity: Basic Biology and Clinical Assessment*. *Measuring Immunity: Basic Biology and Clinical Assessment* (Elsevier Ltd, 2005). doi:10.1016/B978-0-12-455900-4.X5260-X
82. Ingegnoli, F., Castelli, R. & Gualtierotti, R. Rheumatoid Factors: Clinical Applications. *Dis. Markers* **35**, 727 (2013).
83. Dörner, T., Egerer, K., Feist, E. & Burmester, G. R. Rheumatoid factor revisited. *Curr. Opin. Rheumatol.* **16**, 246–253 (2004).
84. Kurowska, W., Kuca-Warnawin, E. H., Radzikowska, A. & Maslinski, W. The role of anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Cent. J. Immunol.* **42**, 390 (2017).
85. Sokolove, J., Zhao, X., Chandra, P. E. & Robinson, W. H. Immune complexes containing citrullinated fibrinogen costimulate macrophages via Toll-like receptor 4 and Fcγ receptor. *Arthritis Rheum.* **63**, 53–62 (2011).
86. Clavel, C. *et al.* Induction of macrophage secretion of tumor necrosis factor alpha through Fcγ receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum.* **58**, 678–688 (2008).
87. Aletaha, D. *et al.* 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of

- Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 1580–1588 (2010).
88. Barra, L. *et al.* Anticitrullinated protein antibodies and rheumatoid factor fluctuate in early inflammatory arthritis and do not predict clinical outcomes. *J. Rheumatol.* **40**, 1259–1267 (2013).
 89. Kay, J. & Upchurch, K. S. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria. *Rheumatology (Oxford)*. **51 Suppl 6**, (2012).
 90. Daikh, D. I. Rheumatoid arthritis: Evolving recognition of a common disease. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* (2021). doi:10.1016/j.berh.2021.101740
 91. de Brito Rocha, S., Baldo, D. C. & Andrade, L. E. C. Clinical and pathophysiologic relevance of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Adv. Rheumatol. (London, England)* **59**, 2 (2019).
 92. Aho, K., Palosuo, T. & Kurki, P. Marker antibodies of rheumatoid arthritis: diagnostic and pathogenetic implications. *Semin. Arthritis Rheum.* **23**, 379–387 (1994).
 93. van Delft, M. A. M. & Huizinga, T. W. J. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **110**, (2020).
 94. Song, Y. W. & Kang, E. H. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM* **103**, 139–146 (2010).
 95. Nell, V. P. K. *et al.* Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **64**, 1731–1736 (2005).
 96. Scott, D. L. Prognostic factors in early rheumatoid arthritis. (2000).
 97. Futó, G., Somogyi, A. & Szekanecz, Z. Visualization of DAS28, SDAI, and CDAI: The magic carpets of rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **33**, 623–629 (2014).
 98. Aletaha, D. *et al.* Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res. Ther.* **7**, R796 (2005).
 99. Fraenkel, L. *et al.* 2021 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. **73**, 924–939 (2021).
 100. Smolen, J. S. *et al.* EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann. Rheum. Dis.* **79**, S685–S699 (2020).
 101. Larsen, S. B., Cowley, C. J. & Fuchs, E. Epithelial cells: liaisons of immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **62**, 45 (2020).
 102. Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, S. *Cellular and molecular immunology. Gastronomía ecuatoriana y turismo local.* **1**, (2018).
 103. Duffy, L. & O'Reilly, S. C. Toll-like receptors in the pathogenesis of autoimmune diseases: recent and emerging translational developments. *ImmunoTargets Ther.* **5**, 69–80 (2016).
 104. Liang, D. *et al.* Connection between $\gamma\delta$ T-cell- and Adenosine- Mediated Immune Regulation in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Uveitis. *Crit. Rev. Immunol.* **38**, 233–243 (2018).
 105. Pope, R. M. & Huang, Q. Q. The role of toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.* **11**, 357–364 (2009).
 106. Devarapu, S. K. & Anders, H. J. Toll-like receptors in lupus nephritis. *J. Biomed. Sci.* **25**, (2018).
 107. Netea, M. G., Quintin, J. & Van Der Meer, J. W. M. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* **9**, 355–361 (2011).
 108. Netea, M. G. *et al.* Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* **352**, 427 (2016).
 109. Huang, Q.-Q. *et al.* Heat shock protein 96 is elevated in rheumatoid arthritis and activates macrophages primarily via TLR2 signaling. *J. Immunol.* **182**, 4965–4973 (2009).
 110. Jog, N. R., Blanco, I., Lee, I., Putterman, C. & Caricchio, R. Urinary high-mobility group box-1

- associates specifically with lupus nephritis class V. *Lupus* **25**, 1551–1557 (2016).
111. Neidhart, M. *et al.* Oligomeric S100A4 Is Associated With Monocyte Innate Immune Memory and Bypass of Tolerance to Subsequent Stimulation With Lipopolysaccharides. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
 112. Van Der Heijden, C. D. C. C. *et al.* Aldosterone induces trained immunity: the role of fatty acid synthesis. *Cardiovasc. Res.* **116**, 317–328 (2020).
 113. Armanini, D. *et al.* Hypothesis on a relationship between hyperaldosteronism, inflammation, somatic mutations, and autoimmunity. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*. **19**, 1060–1062 (2017).
 114. Williams, T. A., Mulatero, P., Bidlingmaier, M., Beuschlein, F. & Reincke, M. Genetic and potential autoimmune triggers of primary aldosteronism. *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)* **66**, 248–253 (2015).
 115. Herrada, A. A. *et al.* Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J. Immunol.* **184**, 191–202 (2010).
 116. Bach, J. F. Infections and autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* **25 Suppl**, 74–80 (2005).
 117. Christen, U. & von Herrath, M. G. Infections and autoimmunity--good or bad? *J. Immunol.* **174**, 7481–7486 (2005).
 118. Costenbader, K. H. & Karlson, E. W. Cigarette smoking and autoimmune disease: what can we learn from epidemiology? *Lupus* **15**, 737–745 (2006).
 119. Vojdani, A., Pollard, K. M. & Campbell, A. W. Environmental triggers and autoimmunity. *Autoimmune Dis.* **2014**, (2014).
 120. Yu, H., Yang, Y. H., Rajaiah, R. & Moudgil, K. D. Nicotine-induced differential modulation of autoimmune arthritis in the Lewis rat involves changes in interleukin-17 and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies. *Arthritis Rheum.* **63**, 981–991 (2011).
 121. Somer, T., Wallace, D. J. & Fan, P. T. Immune complex mediated rheumatic diseases. *Ann. Clin. Res.* **12**, 77–86 (1980).
 122. Aringer, M. Inflammatory markers in systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* **110**, 102374 (2020).
 123. Vinatha Sreeramkumar, Adrover José M., Ballesteros Ivan, Cuartero Maria Isabel , Rossaint Jan, Bilbao Izaskun, Náchter Maria, Pitaval Christophe, Radovanovic Irena, Fukui Yoshinori, McEver Rodger P., Filippi Marie-Dominique, Lizasoain Ignacio, Ruiz-Cabello, H. A. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science (80-)*. **5**, 1234–8 (2014).
 124. Tsokos, G. C., Lo, M. S., Reis, P. C. & Sullivan, K. E. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 716–730 (2016).
 125. Müller-Ladner, U., Pap, T., Gay, R. E., Neidhart, M. & Gay, S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **1**, 102–110 (2005).
 126. Saferding, V. & Blüml, S. Innate immunity as the trigger of systemic autoimmune diseases. *J. Autoimmun.* **110**, 102382 (2020).
 127. Edilova, M. I., Akram, A. & Abdul-Sater, A. A. Innate immunity drives pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Biomed. J.* **44**, 172–182 (2021).
 128. Hirose, S., Lin, Q., Ohtsuji, M., Nishimura, H. & Verbeek, J. S. Monocyte subsets involved in the development of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.* 1–10 (2019). doi:10.1093/intimm/dxz036
 129. Mikołajczyk, T. P. *et al.* Interaction of human peripheral blood monocytes with apoptotic polymorphonuclear cells. *Immunology* **128**, 103–113 (2009).
 130. Kimani, S. G. *et al.* Contribution of defective PS recognition and efferocytosis to chronic inflammation and autoimmunity. *Front. Immunol.* **5**, 1–9 (2014).

131. Huang, W. N., Tso, T. K., Wu, H. C., Yang, H. F. & Tsay, G. J. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material in serologically active clinically quiescent patients with systemic lupus erythematosus. *Int. J. Rheum. Dis.* **19**, 1310–1316 (2016).
132. Munoz, L. *et al.* Apoptosis in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Lupus* **17**, 371–5 (2008).
133. Liphaut, B. L., Helena, M. & Kiss, B. THE ROLE OF APOPTOSIS PROTEINS AND COMPLEMENT COMPONENTS IN THE ETIOPATHOGENESIS OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS. *Clinics* **65**, 327–360 (2010).
134. Poon, I., Hulett, M. D. & Parish, C. R. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ.* **17**, 381–397 (2010).
135. Lorenz, G., Lech, M. & Anders, H.-J. Toll-like receptor activation in the pathogenesis of lupus nephritis. *Clin. Immunol.* **185**, 86–94 (2017).
136. Coutant, F. & Miossec, P. Altered dendritic cell functions in autoimmune diseases: Distinct and overlapping profiles. *Nat. Rev. Rheumatol.* **12**, 703–715 (2016).
137. Ganguly, D., Haak, S., Sisirak, V. & Reizis, B. The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 566 (2013).
138. Liu, Y. J. IPC: Professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 275–306 (2005).
139. Karrar, S. & Cunninghame Graham, D. S. Review: Abnormal B Cell Development in Systemic Lupus Erythematosus: What the Genetics Tell Us. *Arthritis Rheumatol.* **70**, 496–507 (2018).
140. Soni, C. & Reizis, B. DNA as a self-antigen: nature and regulation. *Curr. Opin. Immunol.* **55**, 31–37 (2018).
141. Decker, P., Singh-Jasuja, H., Haager, S., Kötter, I. & Rammensee, H.-G. Nucleosome, the Main Autoantigen in Systemic Lupus Erythematosus, Induces Direct Dendritic Cell Activation via a MyD88-Independent Pathway: Consequences on Inflammation. *J. Immunol.* **174**, 3326–3334 (2005).
142. Means, T. K. *et al.* Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest.* **115**, 407–417 (2005).
143. Tenbrock, K., Juang, Y.-T., Leukert, N., Roth, J. & Tsokos, G. C. The Transcriptional Repressor cAMP Response Element Modulator α Interacts with Histone Deacetylase 1 to Repress Promoter Activity. *J. Immunol.* **177**, 6159–6164 (2006).
144. Jacquemin, C. *et al.* OX40 Ligand Contributes to Human Lupus Pathogenesis by Promoting T Follicular Helper Response. *Immunity* **42**, 1159–1170 (2015).
145. Jacquemin, C. *et al.* OX40L/OX40 axis impairs follicular and natural Treg function in human SLE. *JCI insight* **3**, (2018).
146. Joo, H. M. *et al.* Serum from patients with SLE instructs monocytes to promote IgG and IgA plasmablast differentiation. *J. Exp. Med.* **209**, 1335–1348 (2012).
147. Teichmann, L. L. *et al.* Dendritic Cells in Lupus Are Not Required for Activation of T and B Cells but Promote Their Expansion, Resulting in Tissue Damage. *Immunity* **33**, 967–978 (2010).
148. Abdollahi-Roodsaz, S. *et al.* Inhibition of toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 2957–2967 (2007).
149. Pierer, M., Wagner, U., Rossol, M. & Ibrahim, S. Toll-Like Receptor 4 Is Involved in Inflammatory and Joint Destructive Pathways in Collagen-Induced Arthritis in DBA1J Mice. *PLoS One* **6**, e23539 (2011).
150. Molteni, M., Gemma, S. & Rossetti, C. The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators Inflamm.* **2016**, (2016).
151. Lebre, M. C. *et al.* Rheumatoid Arthritis Synovium Contains Two Subsets of CD83–DC-LAMP–

- Dendritic Cells with Distinct Cytokine Profiles. *Am. J. Pathol.* **172**, 940 (2008).
152. Hidalgo, A., Chilvers, E. R., Summers, C. & Koenderman, L. The Neutrophil Life Cycle. *Trends Immunol.* **40**, 584–597 (2019).
 153. Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O. & Kenne, E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell. Mol. Immunol.* **19**, 177–191 (2022).
 154. Cecchi, I. *et al.* Neutrophils: Novel key players in Rheumatoid Arthritis. Current and future therapeutic targets. *Autoimmun. Rev.* **17**, 1138–1149 (2018).
 155. Fousert, E., Toes, R. & Desai, J. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses. *Cells 2020, Vol. 9, Page 915* **9**, 915 (2020).
 156. Greenlee-Wacker, M. C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol. Rev.* **273**, 357–370 (2016).
 157. Garcia-Romo, G. S. *et al.* Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med.* **3**, (2011).
 158. Ziegler-Heitbrock, L. & Hofer, T. P. J. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Front. Immunol.* **4**, 1–5 (2013).
 159. Italiani, P. & Boraschi, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* **5**, 1–22 (2014).
 160. Auffray Cedric, Fogg Darin, Garfa Meriem, Elain Gaelle, Join-Lambert Olivier, Kayal Samer, Sarnacki Sabine, Cumano Ana, Lauvau Gregoire, G. F. F. References and Notes 1. *Science (80-.).* **317**, 666–671 (2007).
 161. Auffray, C. *et al.* Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* **317**, 666–670 (2007).
 162. Menezes, S. *et al.* The Heterogeneity of Ly6Chi Monocytes Controls Their Differentiation into iNOS+ Macrophages or Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Immunity* **45**, 1205–1218 (2016).
 163. Hirose, S., Lin, Q., Ohtsuji, M., Nishimura, H. & Verbeek, J. S. Monocyte subsets involved in the development of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Int. Immunol.* **31**, 687–696 (2019).
 164. Hume, D. A., Irvine, K. M. & Pridans, C. The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. *Trends Immunol.* **40**, 98–112 (2019).
 165. Patel, A. A. *et al.* The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J. Exp. Med.* **214**, 1913–1923 (2017).
 166. Bio-Rad Laboratories, I. Monocyte development , characterization and role in disease Mini Review. *Biology (Basel).* 1–8 (2010).
 167. Strauss-Ayali, D., Conrad, S. M. & Mosser, D. M. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 244–252 (2007).
 168. Tak, T., van Groenendael, R., Pickkers, P. & Koenderman, L. Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia. *J. Innate Immun.* **9**, 464–474 (2017).
 169. Wildgruber, M. *et al.* Monocyte subset dynamics in human atherosclerosis can be profiled with magnetic nano-sensors. *PLoS One* **4**, (2009).
 170. Katsiari, C. G., Liossis, S. N. C. & Sfikakis, P. P. The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: A reappraisal. *Semin. Arthritis Rheum.* **39**, 491–503 (2010).
 171. Mukherjee, R. *et al.* Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus OPEN. *Nat. Publ. Gr.* (2015). doi:10.1038/srep13886
 172. Sümegi, A. *et al.* Glucocorticosteroid therapy decreases CD14-expression and CD14-mediated LPS-binding and activation of monocytes in patients suffering from systemic lupus

- erythematosus. *Clin. Immunol.* **117**, 271–279 (2005).
173. Tsukamoto, M., Suzuki, K., Seta, N. & Takeuchi, T. Increased circulating CD14^{bright}CD16⁺ intermediate monocytes are regulated by TNF- α and IL-6 axis in accordance with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **36**, 540–544 (2018).
 174. Tsukamoto, M. *et al.* CD14^{bright} CD16⁺ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 1–10 (2017).
 175. Yoon, B. R. *et al.* Functional Phenotype of Synovial Monocytes Modulating Inflammatory T-Cell Responses in Rheumatoid Arthritis (RA). *PLoS One* **9**, e109775 (2014).
 176. Smiljanovic, B. *et al.* Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 300–308 (2018).
 177. Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C. & Wagner, U. The CD14^{bright}CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population. *Arthritis Rheum.* **64**, 671–677 (2012).
 178. Li, Y. *et al.* Increased expression of Fc γ RI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis Res. Ther.* **11**, 1–13 (2009).
 179. Cairns, A. P., Crockard, A. D., McConnell, J. R., Courtney, P. A. & Bell, A. L. Reduced expression of CD44 on monocytes and neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with apoptotic neutrophils and disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* **60**, 950–955 (2001).
 180. Shi, L. *et al.* Monocyte enhancers are highly altered in systemic lupus erythematosus. *Epigenomics* **7**, 921–935 (2015).
 181. Shirakawa, F., Yamashita, U. & Suzuki, H. Reduced function of HLA-DR-positive monocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Clin. Immunol.* **5**, 396–403 (1985).
 182. Shirakawa, F., Yamashita, U. & Suzuki, H. Reduced function of HLA-DR-positive monocytes in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Clin. Immunol.* **5**, 396–403 (1985).
 183. Tsokos, G. C. *et al.* Defective antigen-presenting cell function in patients with systemic lupus erythematosus: Role of the B7-1 (CD80) costimulatory molecule. *Arthritis Rheum.* **39**, 600–609 (1996).
 184. Liu, M. F., Li, J. S., Weng, T. H. & Lei, H. Y. Differential expression and modulation of costimulatory molecules CD80 and CD86 on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* **49**, 82–87 (1999).
 185. Katsiari, C. G. *et al.* CD40L overexpression on T cells and monocytes from patients with systemic lupus erythematosus is resistant to calcineurin inhibition. *Lupus* **11**, 370–378 (2002).
 186. Katsiari, C. G. *et al.* Aberrant expression of the costimulatory molecule CD40 ligand on monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* **103**, 54–62 (2002).
 187. Gool, S. W., Vandenberghe, P., Boer, M. de & Ceuppens, J. L. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol. Rev.* **153**, 47–83 (1996).
 188. Biesen, R. *et al.* Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **58**, 1136–1145 (2008).
 189. Spies, C. M. *et al.* Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 1139–1146 (2006).
 190. Zhang, G. *et al.* Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J. Immunol.* **182**, 7997–8004 (2009).
 191. Atehortúa, L. *et al.* Endothelial activation and injury by microparticles in patients with systemic

- lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **21**, (2019).
192. Hepburn, A. L., Mason, J. C. & Davies, K. A. Expression of Fcγ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **43**, 547–554 (2004).
 193. Zhu, H. *et al.* CD16+ monocyte subset was enriched and functionally exacerbated in driving T-cell activation and B-cell response in systemic lupus erythematosus. *Front. Immunol.* **7**, 512 (2016).
 194. Aranow, C., Diamond, B. & Mackay, M. Systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol. Princ. Pract. Fourth Ed.* 603–620 (2013). doi:10.1016/B978-0-7234-3691-1.00064-7
 195. Li, X., Ptacek, T. S., Brown, E. E. & Edberg, J. C. Fcγ receptors: Structure, function and role as genetic risk factors in SLE. *Genes Immun.* **10**, 380–389 (2009).
 196. Burbano, Catalina, Vasquez, G and Rojas, M. A modulatory effect of CD14+CD16++ monocytes on CD14++CD16- monocytes: a possible explanation of monocyte alterations in SLE. *Arthritis – Rheum.* **11**, 300–308 (2014).
 197. Hurst, N. P., Nuki, G. & Wallington, T. Evidence for intrinsic cellular defects of ‘complement’ receptor-mediated monocyte phagocytosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.* **55**, 303–312 (1984).
 198. Ren, Y. *et al.* Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **48**, 2888–2897 (2003).
 199. Defective mononuclear phagocyte function in systemic lupus erythematosus: relationship of FcRII (CD32) with intermediate cytoskeletal filaments - PubMed. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8281338/>. (Accessed: 17th April 2022)
 200. Donnelly, S. *et al.* Impaired recognition of apoptotic neutrophils by the C1q/calreticulin and CD91 pathway in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **54**, 1543–1556 (2006).
 201. Gaip, U. S. *et al.* Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *J. Autoimmun.* **28**, 114–121 (2007).
 202. Naor, D., Sionov, R. V. & Ish-Shalom, D. CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process. *Adv. Cancer Res.* **71**, 241–319 (1997).
 203. Yassin, L. M., Rojas, M., Ramírez, L. A., García, L. F. & Vásquez, G. Monocyte activation by apoptotic cells removal in systemic lupus erythematosus patients. *Cell. Immunol.* **266**, 52–60 (2010).
 204. Guzik, T. J. *et al.* Characterization of the impairment of the uptake of apoptotic polymorphonuclear cells by monocyte subpopulations in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **23**, 1358–1369 (2014).
 205. Barton, G. M., Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat. Immunol.* **7**, 49–56 (2006).
 206. Vollmer, J. *et al.* Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med.* **202**, 1575–1585 (2005).
 207. Steinbach, F. *et al.* Monocytes from systemic lupus erythematosus patients are severely altered in phenotype and lineage flexibility. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, 283–288 (2000).
 208. Nagy, G., Barcza, M., Gonchoroff, N., Phillips, P. E. & Perl, A. Nitric oxide-dependent mitochondrial biogenesis generates Ca²⁺ signaling profile of lupus T cells. *J. Immunol.* **173**, 3676–3683 (2004).
 209. Linker-Israeli, M. *et al.* Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *J. Immunol.* **147**, (1991).
 210. Steinbach, F. *et al.* Monocytes from systemic lupus erythematosus patients are severely altered in phenotype and lineage flexibility. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, 283–288 (2000).

211. Llorente, L. *et al.* Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Eur. Cytokine Netw.* **4**, 421–427 (1993).
212. Llorente, L. *et al.* In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjögren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum.* **37**, 1647–55 (1994).
213. Horwi, D. A., Dixon, J., Dixon Gray Steven Rehrndsen, J. C. & Rengariiju, M. Decreased production of interleukin-12 and other Th1-type cytokines in patients with recent-onset systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **41**, 838–844 (1998).
214. Alcocer Varela, J., Laffon, A. & Alarcon Segovia, D. Defective monocyte production of, and T lymphocyte response to, interleukin-1 in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Immunol.* **55**, 125 (1984).
215. Henriques, A. *et al.* Functional characterization of peripheral blood dendritic cells and monocytes in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol. Int.* **32**, 863–869 (2012).
216. Feng, D. *et al.* Genetic variants and disease-associated factors contribute to enhanced interferon regulatory factor 5 expression in blood cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **62**, 562–573 (2010).
217. Smith, S. *et al.* Enhanced interferon regulatory factor 3 binding to the interleukin-23p19 promoter correlates with enhanced interleukin-23 expression in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **64**, 1601–1609 (2012).
218. Hagiwara, E., Gourley, M. F., Lee, S. & Klinman, D. M. Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10:interferon-gamma-secreting cells in the peripheral blood. *Arthritis Rheum.* **39**, 379–385 (1996).
219. Yuan, W., Dimartino, S. J., Redecha, P. B., Ivashkiv, L. B. & Salmon, J. E. Systemic lupus erythematosus monocytes are less responsive to interleukin-10 in the presence of immune complexes. *Arthritis Rheum.* **63**, 212–218 (2011).
220. Kawanaka, N. *et al.* CD14⁺,CD16⁺ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 2578–2586 (2002).
221. Tsukamoto, M. *et al.* CD14^{bright}CD16⁺ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **19**, 1–10 (2017).
222. Wijngaarden, S., van Roon, J. A. G., Bijlsma, J. W. J., van de Winkel, J. G. J. & Lafeber, F. P. J. G. Fcγ receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs. *Rheumatology* **42**, 681–688 (2003).
223. McInnes, I. B. & Schett, G. Mechanism of Disease The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2205–2219 (2011).
224. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. & Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark. Res.* **2**, 1 (2014).
225. Boyle, W. J., Simonet, W. S. & Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and Activation. **423**, 337–342 (2003).
226. Roberts, C. A., Dickinson, A. K. & Taams, L. S. The interplay between monocytes/macrophages and CD4⁺ T cell subsets in rheumatoid arthritis. *Front. Immunol.* **6**, 571 (2015).
227. Lioté, F., Boval-Boizard, B., Weill, D., Kuntz, D. & Wautier, J. L. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: Increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 13–19 (1996).
228. Testa, D. *et al.* One year in review 2021: Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **39**, 445–452 (2021).

229. Hua, K.-Q. *et al.* Reprogramming in Rheumatoid Arthritis via Transcriptomic and Epigenetic Monocytes for Inflammatory Hyperactivity IgG Immunocomplexes Sensitize Human. (2022). doi:10.4049/jimmunol.1701756
230. Huang, J. *et al.* Infliximab reduces CD147, MMP-3, and MMP-9 expression in peripheral blood monocytes in patients with active rheumatoid arthritis. *Eur. J. Pharmacol.* **698**, 429–434 (2013).
231. Weldon, A. J. *et al.* Surface APRIL Is Elevated on Myeloid Cells and Is Associated with Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* **42**, 749–759 (2015).
232. Italiani, P. & Boraschi, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front. Immunol.* **5**, 1–22 (2014).
233. Siouti, E. & Andreakos, E. The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. *Biochem. Pharmacol.* **165**, 152–169 (2019).
234. Blüml, S., Redlich, K. & Smolen, J. S. Mechanisms of tissue damage in arthritis. *Semin. Immunopathol.* *2014* **36**, 531–540 (2014).
235. Ardura, J. A. *et al.* Targeting macrophages: Friends or foes in disease? *Front. Pharmacol.* **10**, 1255 (2019).
236. Park, S. H. *et al.* Type I interferons and the cytokine TNF cooperatively reprogram the macrophage epigenome to promote inflammatory activation. *Nat. Immunol.* **18**, 1104–1116 (2017).
237. Tomasoni, S. *et al.* Upregulation of renal and systemic cyclooxygenase-2 in patients with active lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 1202–1212 (1998).
238. Frosch, M. *et al.* Expression of MRP8 and MRP14 by macrophages is a marker for severe forms of glomerulonephritis. *J. Leukoc. Biol.* **75**, 198–206 (2004).
239. Herrmann, M.; Voll, R. E.; Zoller, O. M.; Hagenhofer, M.; Ponner, B. B.; Kalden, J. R. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **41**, 1241–1250 (1998).
240. Li, Y., Lee, P. Y. & Reeves, W. H. Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. **58**, 355–364 (2010).
241. Reefman, E. *et al.* Is disturbed clearance of apoptotic keratinocytes responsible for UVB-induced inflammatory skin lesions in systemic lupus erythematosus? *Arthritis Res. Ther.* **8**, (2006).
242. Rana, A. K., Li, Y., Dang, Q. & Yang, F. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* **65**, 348–359 (2018).
243. Tardito, S. *et al.* Macrophage M1/M2 polarization and rheumatoid arthritis: A systematic review. *Autoimmun. Rev.* **18**, 102397 (2019).
244. Fukui, S. *et al.* M1 and M2 Monocytes in rheumatoid arthritis: A contribution of imbalance of M1/M2 monocytes to osteoclastogenesis. *Front. Immunol.* **8**, 1958 (2018).
245. Jang, S., Kwon, E. J. & Lee, J. J. Rheumatoid Arthritis: Pathogenic Roles of Diverse Immune Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
246. Zhao, J., Guo, S., Schrodi, S. J. & He, D. Molecular and Cellular Heterogeneity in Rheumatoid Arthritis: Mechanisms and Clinical Implications. *Front. Immunol.* **12**, 1–21 (2021).
247. Iwakura, Y. & Ishigame, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J. Clin. Invest.* **116**, 1218–1222 (2006).
248. Verreck, F. A. W. *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4560–4565 (2004).
249. Hou, Y. *et al.* IL-23-induced macrophage polarization and its pathological roles in mice with imiquimod-induced psoriasis. *Protein Cell* **9**, 1027–1038 (2018).

250. Culemann, S. *et al.* Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature* **572**, 670 (2019).
251. Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B. & Kono, D. H. Type I interferons (α/β) in immunity and autoimmunity. <http://dx.doi.org.sire.ub.edu/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843> **23**, 307–336 (2005).
252. Elkon, K. B. & Stone, V. V. Type I interferon and systemic lupus erythematosus. *J. Interf. Cytokine Res.* **31**, 803–812 (2011).
253. Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. & Tanaka, N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 623–655 (2001).
254. Chill, J. H., Quadt, S. R., Levy, R., Schreiber, G. & Anglister, J. The Human Type I Interferon Receptor: NMR Structure Reveals the Molecular Basis of Ligand Binding. *Structure* **11**, 791–802 (2003).
255. Baechler, E. C. *et al.* Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2610–2615 (2003).
256. Bennett, L. *et al.* Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J. Exp. Med.* **197**, 711–723 (2003).
257. Bengtsson, A. A. *et al.* Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus* **9**, 664–671 (2000).
258. Lövgren, T., Eloranta, M. L., Båve, U., Alm, G. V. & Rönnblom, L. Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum.* **50**, 1861–1872 (2004).
259. Rönnblom, L., Eloranta, M. L. & Alm, G. V. Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity. *Autoimmunity* **36**, 463–472 (2003).
260. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987–995 (2004).
261. Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. G. & Silverman, R. H. Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15623 (1998).
262. Dickensheets, H. L., Venkataraman, C., Schindler, U. & Donnelly, R. P. Interferons inhibit activation of STAT6 by interleukin 4 in human monocytes by inducing SOCS-1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 10800–10805 (1999).
263. Sharif, M. N. *et al.* IFN-alpha priming results in a gain of proinflammatory function by IL-10: implications for systemic lupus erythematosus pathogenesis. *J. Immunol.* **172**, 6476–6481 (2004).
264. Mitani, Y. *et al.* Cross talk of the interferon- α/β signalling complex with gp130 for effective interleukin-6 signalling. *Genes to Cells* **6**, 631–640 (2001).
265. Narazaki, M. & Kishimoto, T. The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
266. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, 16295–16296 (2014).
267. Deon, D. *et al.* Cross-Talk Between IL-1 and IL-6 Signaling Pathways in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *J. Immunol.* **167**, 5395–5403 (2001).
268. Aringer, M. & Smolen, J. S. Cytokine expression in lupus kidneys. *Lupus* **14**, 13–18 (2005).
269. Jones, S. A. & Hunter, C. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* **16**, 448–457 (2015).
270. Rose-John, S. Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Research* **9**, (2020).

271. Burmester, H., Wolber, E. M., Freitag, P., Fandrey, J. & Jelkmann, W. Thrombopoietin production in wild-type and interleukin-6 knockout mice with acute inflammation. *J. Interf. Cytokine Res.* **25**, 407–413 (2005).
272. Romano, M. *et al.* Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* **6**, 315–325 (1997).
273. Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J. & Palucka, A. K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* **1**, 510–514 (2000).
274. Pandolfi, F. *et al.* Interleukin-6 in Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–12 (2020).
275. Studnicka-Benke, A., Steiner, G., Petera, P. & Smolen, J. S. Tumour necrosis factor alpha and its soluble receptors parallel clinical disease and autoimmune activity in systemic lupus erythematosus. *Br. J. Rheumatol.* **35**, 1067–1074 (1996).
276. Nilsson, G., Lekander, M., Åkerstedt, T., Axelsson, J. & Ingre, M. Diurnal variation of circulating interleukin-6 in humans: A meta-analysis. *PLoS One* **11**, 1–17 (2016).
277. Kim, G. W. *et al.* IL-6 inhibitors for treatment of rheumatoid arthritis: past, present, and future. *Arch. Pharm. Res.* **38**, 575–584 (2015).
278. Idborg, H. *et al.* TNF- α and plasma albumin as biomarkers of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus Sci. Med.* **5**, 1–11 (2018).
279. Aringer, M. *et al.* Serum interleukin-15 is elevated in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* **40**, 876–881 (2001).
280. Smiljanovic, B. *et al.* The multifaceted balance of TNF- α and type I/II interferon responses in SLE and RA: How monocytes manage the impact of cytokines. *J. Mol. Med.* **90**, 1295–1309 (2012).
281. Belge, K.-U. *et al.* The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* **168**, 3536–3542 (2002).
282. Wei, S., Kitaura, H., Zhou, P., Ross, F. P. & Teitelbaum, S. L. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* **115**, 282–290 (2005).
283. Luo, G., Li, F., Li, X., Wang, Z. G. & Zhang, B. TNF- α and RANKL promote osteoclastogenesis by upregulating RANK via the NF- κ B pathway. *Mol. Med. Rep.* **17**, 6605–6611 (2018).
284. Kolls, J. K. & Lindé, A. Review Interleukin-17 Family Members and Inflammation Cellular Sources of the IL-17 Family Members IL-17A was initially described at the message level as a product of activated CD4 memory T lymphocytes. *Immunity* **21**, 467–476 (2004).
285. Pope, R. M., Shahrara, S., Pickens, S. R. & Dorfleutner, A. Rheumatoid Arthritis IL-17 Induces Monocyte Migration in. (2009). doi:10.4049/jimmunol.0802246
286. Paradowska-Gorycka, A. & Maśliński, S. Komórki Th17 w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów. *Reumatologia* **48**, 337–344 (2010).
287. Cua, D. J., Sherlock, J. J., Chen, Y. & Murphy, C. A. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine. *Nature; Feb* **13**, (2003).
288. Moore M Rennick, K. W. *et al.* Cytokine Receptor Subunit, IL-23R 1 and a Novel β IL-23 Is Composed of IL-12R A Receptor for the Heterodimeric Cytokine. *J Immunol Ref.* **168**, 5699–5708 (2002).
289. Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* **201**, 233–240 (2005).
290. Saraiva, M., Vieira, P. & O’Garra, A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J. Exp. Med.* **217**, (2020).
291. Ouyang, W. & O’Garra, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* **50**, 871–891 (2019).
292. Abrams, J., Figdor, C. G., De Waal Malefyt, R., Bennett, B. & De Vries, J. E. Interleukin 10(IL-10)

- inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* **174**, 1209–1220 (1991).
293. Bogdan, C., Vodovotz, Y. & Nathan, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.* **174**, 1549–1555 (1991).
294. Itoh, K. & Hirohata, S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J. Immunol.* **154**, (1995).
295. Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E. & Roncarolo, M. G. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J. Immunol.* **160**, 3188–93 (1998).
296. Rousset, F. *et al.* Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 1890–1893 (1992).
297. Llorente, L. *et al.* Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **181**, 839–844 (1995).
298. Peng, H. *et al.* Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* **32**, 1255–1266 (2013).
299. Geginat, J. *et al.* IL-10 producing regulatory and helper T-cells in systemic lupus erythematosus. *Semin. Immunol.* **44**, (2019).
300. Heine, G. *et al.* Autocrine IL-10 promotes human B-cell differentiation into IgM- or IgG-secreting plasmablasts. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1615–1621 (2014).
301. Joo, H. M. *et al.* Serum from patients with SLE instructs monocytes to promote IgG and IgA plasmablast differentiation. *J. Exp. Med.* **209**, 1335–1348 (2012).
302. Yuan, W., Dimartino, S. J., Redecha, P. B., Ivashkiv, L. B. & Salmon, J. E. Systemic lupus erythematosus monocytes are less responsive to interleukin-10 in the presence of immune complexes. *Arthritis Rheum.* **63**, 212–218 (2011).
303. Cui, H. D. *et al.* Interleukin-10 receptor expression and signalling were down-regulated in CD4⁺ T cells of lupus nephritis patients. *Clin. Exp. Immunol.* **165**, 163–171 (2011).
304. Figueroa-Vega, N. *et al.* Phenotypic analysis of IL-10-treated, monocyte-derived dendritic cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand. J. Immunol.* **64**, 668–676 (2006).
305. Rheum, A., Undeutsch, R., Humrich, J. Y., Papendieck, A. & Riemekasten, G. CD4 T cells producing IL-10 have a beneficial effect in murine lupus. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, A73–A73 (2011).
306. Amend, A. *et al.* Dual role of interleukin-10 in murine nzb/w f1 lupus. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–24 (2021).
307. Llorente, L. *et al.* Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus. *ARTHRITIS Rheum.* **43**, 1790–1800 (2000).
308. Uchida, M. *et al.* Anti-IL-10 antibody in systemic lupus erythematosus. *Open access Rheumatol. Res. Rev.* **11**, 61–65 (2019).
309. Cohen, S. B. A. *et al.* High level of interleukin-10 production by the activated t cell population within the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum.* **38**, 946–952 (1995).
310. Katsikis, P. D., Chu, C. Q., Brennan, F. M., Maini, R. N. & Feldmann, M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **179**, 1517–1527 (1994).
311. Perez, L., Orte, J. & A. Brieva, J. Terminal differentiation of spontaneous rheumatoid factor-secreting B cells from rheumatoid arthritis patients depends on endogenous interleukin-10. *Arthritis Rheum.* **38**, 1771–1776 (1995).
312. Kasama, T. *et al.* Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J. Clin. Invest.* **95**, 2868–2876 (1995).
313. Tanaka, Y. *et al.* Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice. *Inflamm. Res.* **45**, 283–288 (1996).

314. Walmsley, M. *et al.* Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **39**, 495–503 (1996).
315. Machlus, K. R. & Italiano, J. E. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J. Cell Biol.* **201**, 785–796 (2013).
316. Quach, M. E. *et al.* Differential regulation of the platelet GPIb-IX complex by anti-GPIb β antibodies. *J. Thromb. Haemost.* **19**, 2044–2055 (2021).
317. White, J. G. & Clawson, C. C. The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system. *Am. J. Pathol.* **101**, 353 (1980).
318. Lam, F. W. *et al.* Platelets and their interactions with other immune cells. **5**, 1265–1280 (2015).
319. Battinelli, E. M. *et al.* Megakaryocytes package contents into separate α -granules that are differentially distributed in platelets. *Blood Adv.* **3**, 3092 (2019).
320. Flaumenhaft, R. & Sharda, A. The life cycle of platelet granules. *F1000Research* **7**, (2018).
321. Valle-Jiménez, X. *et al.* Human platelets and megakaryocytes express defensin alpha 1. *Platelets* **31**, 344–354 (2020).
322. Haselmayer, P., Grosse-Hovest, L., Von Landenberg, P., Schild, H. & Radsak, M. P. TREM-1 ligand expression on platelets enhances neutrophil activation. *Blood* **110**, 1029–1035 (2007).
323. Beaulieu, L. M. *et al.* Interleukin 1 receptor 1 and interleukin 1 β regulate megakaryocyte maturation, platelet activation, and transcript profile during inflammation in mice and humans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 552–564 (2014).
324. Rondina, M. T. & Weyrich, A. S. Regulation of the genetic code in megakaryocytes and platelets. *J. Thromb. Haemost.* **13 Suppl 1**, S26–S32 (2015).
325. Lindemann, S. *et al.* Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis. *J. Cell Biol.* **154**, 485–490 (2001).
326. Ossama Allam, S. Samarani, Rim Marzouk, A. A. Human platelets produce and constitute the main source of IL-18 in the circulation. *J. Immunol.* **188**, (2012).
327. Clancy, L., Beaulieu, L. M., Tanriverdi, K. & Freedman, J. E. The role of RNA uptake in platelet heterogeneity. *Thromb. Haemost.* **117**, 948–961 (2017).
328. Koupenova, M. & Ravid, K. Biology of Platelet Purinergic Receptors and Implications for Platelet Heterogeneity. *Front. Pharmacol.* **9**, (2018).
329. Hottz, E. D. *et al.* Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood* **122**, 3405–3414 (2013).
330. Campbell, R. A. *et al.* Human megakaryocytes possess intrinsic antiviral immunity through regulated induction of IFITM3. *Blood* **133**, 2013–2026 (2019).
331. Fu, B. H. *et al.* Platelet VEGF and serum TGF- β 1 levels predict chemotherapy response in non-small cell lung cancer patients. *Tumour Biol.* **36**, 6477–6483 (2015).
332. Peterson, J. E. *et al.* VEGF, PF4 and PDGF are elevated in platelets of colorectal cancer patients. *Angiogenesis* **15**, 265–273 (2012).
333. Ofosu, F. A. & Nyarko, K. A. Human platelet thrombin receptors. Roles in platelet activation. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **14**, 1185–1198 (2000).
334. Surin, W. R., Barthwal, M. K. & Dikshit, M. Platelet collagen receptors, signaling and antagonism: emerging approaches for the prevention of intravascular thrombosis. *Thromb. Res.* **122**, 786–803 (2008).
335. Murugappan, S. & Kunapuli, S. P. The role of ADP receptors in platelet function. *Front. Biosci.* **11**, 1977–1986 (2006).
336. Kral, J. B., Schrottmaier, W. C., Salzman, M. & Assinger, A. Platelet Interaction with Innate Immune Cells. *Transfus. Med. Hemotherapy* **43**, 78–88 (2016).

337. Brown, G. T., Narayanan, P., Li, W., Silverstein, R. L. & McIntyre, T. M. Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1 β autocrine loop. *J. Immunol.* **191**, 5196–5203 (2013).
338. Pignatelli, P. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha as trigger of platelet activation in patients with heart failure. *Blood* **106**, 1992–1994 (2005).
339. Hally, K., Fauteux-Daniel, S., Hamzeh-Cognasse, H., Larsen, P. & Cognasse, F. Revisiting Platelets and Toll-Like Receptors (TLRs): At the Interface of Vascular Immunity and Thrombosis. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1–28 (2020).
340. Barbati, C. *et al.* Anti-D4GDI antibodies activate platelets in vitro: a possible link with thrombocytopenia in primary antiphospholipid syndrome. *Arthritis Res. Ther.* **21**, (2019).
341. Hollerbach, A. *et al.* Platelet Activation by Antiphospholipid Antibodies Depends on Epitope Specificity and is Prevented by mTOR Inhibitors. *Thromb. Haemost.* **119**, 1147–1153 (2019).
342. Habets, K. L. L. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies contribute to platelet activation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **17**, (2015).
343. Quinn, M. & Fitzgerald, D. Platelet Function: Assessment, Diagnosis, and Treatment. *Circulation* **113**, (2006).
344. Frenette, P. S. *et al.* P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J. Exp. Med.* **191**, 1413–1422 (2000).
345. Smyth, S. S. *et al.* Platelet functions beyond hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* **7**, 1759–1766 (2009).
346. Bauer, E. M. *et al.* Genetic deletion of toll-like receptor 4 on platelets attenuates experimental pulmonary hypertension. *Circ. Res.* **114**, 1596–1600 (2014).
347. Koupenova, M. *et al.* Sex differences in platelet toll-like receptors and their association with cardiovascular risk factors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1030–1037 (2015).
348. Maugeri, N. *et al.* Circulating platelets as a source of the damage-associated molecular pattern HMGB1 in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* **45**, 584–587 (2012).
349. Andonegui, G. *et al.* Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* **106**, 2417–2423 (2005).
350. Assinger, A. *et al.* Human cytomegalovirus-platelet interaction triggers toll-like receptor 2-dependent proinflammatory and proangiogenic responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 801–809 (2014).
351. Zheng, M. *et al.* TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* **22**, 829–838 (2021).
352. Thon, J. N. *et al.* T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J. Cell Biol.* **198**, 561–574 (2012).
353. Banerjee, M. *et al.* Platelets Endocytose Viral Particles and Are Activated via TLR (Toll-Like Receptor) Signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **40**, 1635–1650 (2020).
354. Koupenova, M. *et al.* Platelet-TLR7 mediates host survival and platelet count during viral infection in the absence of platelet-dependent thrombosis. *Blood* **124**, 791–802 (2014).
355. Reilly, M. P. *et al.* Heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis in a transgenic mouse model requires human platelet factor 4 and platelet activation through Fc γ RIIA. *Blood* **98**, 2442–2447 (2001).
356. Youssefian, T., Drouin, A., Massé, J. M., Guichard, J. & Cramer, E. M. Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* **99**, 4021–4029 (2002).
357. Kraemer, B. F. *et al.* Novel anti-bacterial activities of β -defensin 1 in human platelets: suppression of pathogen growth and signaling of neutrophil extracellular trap formation. *PLoS Pathog.* **7**, (2011).

358. Maynard, D. M., Heijnen, H. F. G., Horne, M. K., White, J. G. & Gahl, W. A. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1945–1955 (2007).
359. Aslam, R. *et al.* Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood* **107**, 637–641 (2006).
360. Brown, G. T. & McIntyre, T. M. Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 β -rich microparticles. *J. Immunol.* **186**, 5489–5496 (2011).
361. Niklaus, M. *et al.* The involvement of toll-like receptors 2 and 4 in human platelet signalling pathways. *Cell. Signal.* **76**, (2020).
362. Blair, P. *et al.* Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase. *Circ. Res.* **104**, 346–354 (2009).
363. Parra-Izquierdo, I. *et al.* The Toll-Like Receptor 2 Ligand Pam2CSK4 Activates Platelet Nuclear Factor- κ B and Bruton's Tyrosine Kinase Signaling to Promote Platelet-Endothelial Cell Interactions. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
364. Koupenova, M. *et al.* The role of platelets in mediating a response to human influenza infection. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
365. Stocker, T. J., Ishikawa-Ankerhold, H., Massberg, S. & Schulz, C. Small but mighty: Platelets as central effectors of host defense. *Thromb. Haemost.* **117**, 651–661 (2017).
366. Peerschke, E. I., Yin, W. & Ghebrehiwet, B. Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis. *Mol. Immunol.* **47**, 2170–2175 (2010).
367. Coppinger, J. A. *et al.* Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* **103**, 2096–2104 (2004).
368. Devine, D. V. & Rosse, W. F. Regulation of the activity of platelet-bound C3 convertase of the alternative pathway of complement by platelet factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 5873–5877 (1987).
369. Schmaier, A. H., Smith, P. M. & Colman, R. W. Platelet C1- inhibitor. A secreted alpha-granule protein. *J. Clin. Invest.* **75**, 242–250 (1985).
370. Li, N. Platelet-lymphocyte cross-talk. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 1069–1078 (2008).
371. Zamora, C. *et al.* Functional consequences of platelet binding to T lymphocytes in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 521–9 (2013).
372. Maugeri, N. *et al.* Platelet microparticles sustain autophagy-associated activation of neutrophils in systemic sclerosis. *Sci. Transl. Med.* **10**, (2018).
373. Maugeri, N. *et al.* An intense and short-lasting burst of neutrophil activation differentiates early acute myocardial infarction from systemic inflammatory syndromes. *PLoS One* **7**, (2012).
374. Ramirez, G. A., Manfredi, A. A. & Maugeri, N. Misunderstandings Between Platelets and Neutrophils Build in Chronic Inflammation. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
375. Hally, K. E., Parker, O. M., Brunton-O'Sullivan, M. M., Harding, S. A. & Larsen, P. D. Linking Neutrophil Extracellular Traps and Platelet Activation: A Composite Biomarker Score for Predicting Outcomes after Acute Myocardial Infarction. *Thromb. Haemost.* **121**, 1637–1649 (2021).
376. Borissoff, J. I. *et al.* Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2032–2040 (2013).
377. Matsumoto, K., Yasuoka, H., Yoshimoto, K., Suzuki, K. & Takeuchi, T. Platelet CXCL4 mediates neutrophil extracellular traps formation in ANCA-associated vasculitis. *Sci. Rep.* **11**, (2021).

378. van der Meijden, P. E. J. & Heemskerk, J. W. M. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. *Nat. Rev. Cardiol.* **16**, 166–179 (2019).
379. Smyth, S. S. *et al.* Beta(3)-integrin-deficient mice but not P-selectin-deficient mice develop intimal hyperplasia after vascular injury: correlation with leukocyte recruitment to adherent platelets 1 hour after injury. *Circulation* **103**, 2501–2507 (2001).
380. Kim, K., Li, J., Tseng, A., Andrews, R. K. & Cho, J. NOX2 is critical for heterotypic neutrophil-platelet interactions during vascular inflammation. *Blood* **126**, 1952–1964 (2015).
381. Zarbock, A., Müller, H., Kuwano, Y. & Ley, K. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 1119–1124 (2009).
382. Fernandes, L. S. *et al.* Platelet-monocyte complex formation: effect of blocking PSGL-1 alone, and in combination with alphaIIb beta3 and alphaMbeta2, in coronary stenting. *Thromb. Res.* **111**, 171–177 (2003).
383. Larsen, E. *et al.* PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell* **59**, 305–312 (1989).
384. Lindmark, E., Tenno, T. & Siegbahn, A. Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2322–2328 (2000).
385. Neumann, F. J. *et al.* Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**, 1420–1426 (1999).
386. Rong, M. *et al.* Platelets induce a proinflammatory phenotype in monocytes via the CD147 pathway in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 478 (2014).
387. Schulz, C. *et al.* EMMPRIN (CD147/basigin) mediates platelet-monocyte interactions in vivo and augments monocyte recruitment to the vascular wall. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 1007–1019 (2011).
388. Silverstein, R. L., Asch, A. S. & Nachman, R. L. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J. Clin. Invest.* **84**, 546–552 (1989).
389. van Gils, J. M., Zwaginga, J. J. & Hordijk, P. L. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J. Leukoc. Biol.* **85**, 195–204 (2009).
390. Gawaz, M. P. *et al.* Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J. Clin. Invest.* **88**, 1128–1134 (1991).
391. Silverstein, R. L., Asch, A. S. & Nachman, R. L. Glycoprotein IV mediates thrombospondin-dependent platelet-monocyte and platelet-U937 cell adhesion. *J. Clin. Invest.* **84**, 546–552 (1989).
392. Yin, H. *et al.* Role for platelet glycoprotein Ib-IX and effects of its inhibition in endotoxemia-induced thrombosis, thrombocytopenia, and mortality. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 2529–2537 (2013).
393. Looney, M. R. *et al.* Platelet depletion and aspirin treatment protect mice in a two-event model of transfusion-related acute lung injury. *J. Clin. Invest.* **119**, 3450–3461 (2009).
394. Xiang, B. *et al.* Platelets protect from septic shock by inhibiting macrophage-dependent inflammation via the cyclooxygenase 1 signalling pathway. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
395. Corken, A., Russell, S., Dent, J., Post, S. R. & Ware, J. Platelet glycoprotein Ib-IX as a regulator of systemic inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 996–1001 (2014).
396. Lefort, C. T. & Ley, K. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front. Immunol.* **3**, (2012).
397. Bdeir, K. *et al.* Platelet-Specific Chemokines Contribute to the Pathogenesis of Acute Lung Injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **56**, 261–270 (2017).

398. Di Virgilio, F. Di, Andrea Borea, P. & Illes, P. P2 receptors meet the immune system. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 5–7 (2001).
399. Maître, B. *et al.* The P2X1 receptor is required for neutrophil extravasation during lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia in mice. *J. Immunol.* **194**, 739–749 (2015).
400. Sofoluwe, A., Bacchetta, M., Badaoui, M., Kwak, B. R. & Chanson, M. ATP amplifies NADPH-dependent and -independent neutrophil extracellular trap formation. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
401. Brunetti M, Martelli N, Manarini S, Mascetra N, Musiani P, Cerletti C, Aiello FB, E. V. Polymorphonuclear leukocyte apoptosis is inhibited by platelet-released mediators, role of TGFbeta-1 - PubMed. *Thromb Haemost* **84**, 478–83 (2000).
402. Singh, M. V *et al.* Characterization of platelet-monocyte complexes in HIV-1-infected individuals: possible role in HIV-associated neuroinflammation. *J. Immunol.* **192**, 4674–84 (2014).
403. von Hundelshausen, P. *et al.* RANTES Deposition by Platelets Triggers Monocyte Arrest on Inflamed and Atherosclerotic Endothelium. *Circulation* **103**, 1772–1777 (2001).
404. Schwartzkopff, F., Petersen, F., Grimm, T. A. & Brandt, E. CXC chemokine ligand 4 (CXCL4) down-regulates CC chemokine receptor expression on human monocytes. *Innate Immun.* **18**, 124–139 (2012).
405. Kasper, B., Brandt, E., Brandau, S. & Petersen, F. Platelet factor 4 (CXC chemokine ligand 4) differentially regulates respiratory burst, survival, and cytokine expression of human monocytes by using distinct signaling pathways. *J. Immunol.* **179**, 2584–2591 (2007).
406. Pervushina, O. *et al.* Platelet factor 4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. *J. Immunol.* **173**, 2060–2067 (2004).
407. Jy, W., Mao, W. W., Horstman, L. L., Tao, J. & Ahn, Y. S. Platelet microparticles bind, activate and aggregate neutrophils in vitro. *Blood Cells. Mol. Dis.* **21**, 217–231 (1995).
408. Hurley, S. M. *et al.* Platelet-Dependent Neutrophil Function Is Dysregulated by M Protein from *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **83**, 3515–3525 (2015).
409. Peters, M. J. *et al.* Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *Br. J. Haematol.* **106**, 391–399 (1999).
410. Assinger, A. *et al.* Efficient phagocytosis of periodontopathogens by neutrophils requires plasma factors, platelets and TLR2. *J. Thromb. Haemost.* **9**, 799–809 (2011).
411. Maugeri, N. *et al.* Oxidative stress elicits platelet/leukocyte inflammatory interactions via HMGB1: A Candidate for microvessel injury in systemic sclerosis. *Antioxidants Redox Signal.* **20**, 1060–1074 (2014).
412. Vogel, S. *et al.* Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis. *J. Clin. Invest.* **125**, 4638–4654 (2015).
413. Zirlik, A. *et al.* CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* **115**, 1571–1580 (2007).
414. Pervushina, O. *et al.* Platelet factor 4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. *J. Immunol.* **173**, 2060–2067 (2004).
415. Sreeramkumar, V. *et al.* Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* **346**, 1234–1238 (2014).
416. Etulain, J. *et al.* P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood* **126**, 242–246 (2015).
417. von Brühl, M. L. *et al.* Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* **209**, 819–835 (2012).

418. Kim, S. J. & Jenne, C. N. Role of platelets in neutrophil extracellular trap (NET) production and tissue injury. *Semin. Immunol.* **28**, 546–554 (2016).
419. Schauer, C. *et al.* Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nat. Med.* **20**, 511–517 (2014).
420. Badrnya, S. *et al.* Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 571–580 (2014).
421. Singh, M. V. *et al.* Characterization of platelet-monocyte complexes in HIV-1-infected individuals: possible role in HIV-associated neuroinflammation. *J. Immunol.* **192**, 4674–4684 (2014).
422. Badrnya, S. *et al.* Platelets mediate oxidized low-density lipoprotein-induced monocyte extravasation and foam cell formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 571–580 (2014).
423. Phillips, J. H., Chang, C. & Lanier, L. L. Platelet-induced expression of Fc gamma RIII (CD16) on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **21**, 895–899 (1991).
424. Fricke, I. *et al.* Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells. *FASEB J.* **18**, 1588–1590 (2004).
425. Suzuki, J. *et al.* Cytokine secretion from human monocytes potentiated by P-selectin-mediated cell adhesion. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **160**, 152–160 (2013).
426. Weyrich, A. S. *et al.* Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* **97**, 1525–1534 (1996).
427. Tunjungputri, R. N. *et al.* Differential effects of platelets and platelet inhibition by ticagrelor on TLR2- and TLR4-mediated inflammatory responses. *Thromb. Haemost.* **113**, 1035–1045 (2015).
428. Wu, B. Q. *et al.* Inhibitory effects of lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* on platelet function and platelet-monocyte aggregation. *Inflamm. Res.* **60**, 775–782 (2011).
429. Gudbrandsdottir, S., Hasselbalch, H. C. & Nielsen, C. H. Activated platelets enhance IL-10 secretion and reduce TNF- α secretion by monocytes. *J. Immunol.* **191**, 4059–67 (2013).
430. Inui, M., Tazawa, K., Kishi, Y. & Takai, T. Platelets convert peripheral blood circulating monocytes to regulatory cells via immunoglobulin G and activating-type Fc γ receptors. *BMC Immunol.* **16**, 1–10 (2015).
431. Nhek, S. *et al.* Activated Platelets Induce Endothelial Cell Activation via an Interleukin-1 β Pathway in Systemic Lupus Erythematosus. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 707–716 (2017).
432. Habets, K. L. L., Huizinga, T. W. J. & Toes, R. E. M. Platelets and autoimmunity. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 746–757 (2013).
433. Huang, Z. Y., Chien, P., Indik, Z. K. & Schreiber, A. D. Human platelet Fc γ RIIA and phagocytes in immune-complex clearance. *Mol. Immunol.* **48**, 691–696 (2011).
434. Linge, P., Fortin, P. R., Lood, C., Bengtsson, A. A. & Boilard, E. The non-haemostatic role of platelets in systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* **14**, 195–213 (2018).
435. Boilard, E. *et al.* Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580–583 (2010).
436. Gasparyan, A. Y., Stavropoulos-Kalinoglou, A., Mikhailidis, D. P., Douglas, K. M. J. & Kitis, G. D. Platelet function in rheumatoid arthritis: Arthritic and cardiovascular implications. *Rheumatol. Int.* **31**, 153–164 (2011).
437. Kisacik, B. *et al.* Mean platelet volume (MPV) as an inflammatory marker in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Jt. bone spine* **75**, 291–294 (2008).
438. Knijff-Dutmer, E. A. J., Koerts, J., Nieuwland, R., Kalsbeek-Batenburg, E. M. & Van De Laar, M. A. F. J. Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **46**, 1498–1503 (2002).
439. Gros, A., Ollivier, V. & Ho-Tin-Noé, B. Platelets in inflammation: Regulation of leukocyte activities and vascular repair. *Front. Immunol.* **6**, 1–8 (2015).

440. Sarma, J. *et al.* Acute Coronary Syndromes. *Circulation* **105**, 2166–2171 (2002).
441. Harding, S. A. *et al.* Increased CD40 ligand and platelet – monocyte aggregates in patients with type 1 diabetes mellitus. **176**, 321–325 (2004).
442. Pamuk, G. E. *et al.* Elevated platelet-monocyte complexes in patients with psoriatic arthritis. *Platelets* **20**, 493–497 (2009).
443. Joseph, J. E., Harrison, P., Mackie, I. J., Isenberg, D. a & Machin, S. J. Increased circulating platelet-leucocyte complexes and platelet activation in patients with antiphospholipid syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Br. J. Haematol.* **115**, 451–459 (2001).
444. Von Hundelshausen, P. *et al.* RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* **103**, 1772–1777 (2001).
445. Carestia, A. *et al.* Platelets Promote Macrophage Polarization toward Pro-inflammatory Phenotype and Increase Survival of Septic Mice. *Cell Rep.* **28**, 896-908.e5 (2019).
446. Zamora, C. *et al.* Inverse Association Between Circulating Monocyte-Platelet Complexes and Inflammation in Ulcerative Colitis Patients. *Inflamm. Bowel Dis.* **00**, 1–11 (2018).
447. Linke, B. *et al.* Activated Platelets Induce an Anti-Inflammatory Response of Monocytes/Macrophages through Cross-Regulation of PGE2 and Cytokines. *Mediators Inflamm.* **2017**, (2017).