

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Implicaciones patológicas y terapéuticas de la contribución del
metabolismo del folato a la polarización de macrófagos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Blanca Soler Palacios

Directora

Amaya Puig Kröger

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Implicaciones patológicas y terapéuticas de la contribución del metabolismo del folato a la polarización de macrófagos.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR
Blanca Soler Palacios

Directora
Amaya Puig Kröger

Madrid, 2015

© Blanca Soler Palacios, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento Bioquímica y Biología Molecular I



**Implicaciones patológicas y terapéuticas de la contribución
del metabolismo del folato a la polarización de macrófagos.**

Tesis Doctoral

Blanca Soler Palacios

Mayo 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento Bioquímica y Biología Molecular I



Amaya Puig Kröger, investigadora Miguel Servet Consolidada, certifica que Dña. BLANCA SOLER PALACIOS ha realizado bajo su dirección el trabajo “Implicaciones patológicas y terapéuticas de la contribución del metabolismo del folato a la polarización de macrófagos.”, como Tesis para alcanzar el grado de Doctor en el Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón.

Fdo. Amaya Puig Kröger.

Agradecimientos

El camino de la tesis ha llegado a su fin y ha sido posible gracias a muchas personas que han pasado por mi vida, algunas de ellas han permanecido, espero que por muchos años. Por ello empezare desde el principio.

Muchas gracias a mis padres por dejarme seguir mis sueños y acompañarme en mi propio camino. A mi hermano Javier, con el que espero estar tanto en todos sus buenos como en malos momentos como estas tú.

A mi familia, que siempre me han dejado ampliar mi imaginación. A Belén y Juan, que aunque ya sea mayor de edad, siempre seréis mis tutores. A Pepe, que siempre pensó que llegaría muy lejos. A los Soler, a mi tía Lourdes y mi tío José, que siempre confiaron en mí. A Lourdes, que con sus bocatas por la valla del cole siempre me cuidó.

A Luis, Miguel y Ana, gracias a ellos me enganche a la biología y a las matemáticas.

A todos compañeros de carrera, que han sido muchos, con los que he compartido muchas horas de estudio, de prácticas y largas horas de exámenes, todos superados gracias a su ayuda. Y a la gente de La Paz, muchas gracias ACB y Ana, y sobre todo a Olga y a Sara.

En cuarto de carrera acabe haciendo las prácticas en un laboratorio del CBGP, gracias a todas las personas que conocí allí, que definitivamente me engancharon a la investigación. A Carmen, gracias por tu paciencia siendo tu perrito faldero para aprender. A David y a Laura, gracias por todos los buenos ratos. Y muchas gracias a Marta, tú ya lo sabes, pero me cambiaste la vida.

Gracias a mis chic@s del máster, en especial a Cristina, eres una “champiñón” y lo sabes; a Eunáte, que llegara lejos; a Finn, nuestro cardiólogo de arritmias; y a Miguel.

Muchísimas gracias a Amaya por darme esta gran oportunidad y por enseñarme tanto a nivel científico. A Paloma, Julia, Isabel, Ana y Rafa, por admitirme en el laboratorio. A Alejandra que, aunque habíamos hecho la carrera juntas, aceptaste mi despiste, muchas gracias por tu apoyo. A Cristina y a Lizbeth, muchas gracias.

A la gente del CIB, que cada vez que iba a hacer un experimento me ayudaban en todo, muchas gracias.

Gracias a mis nuevos compañeros de viaje, José Luis, Jorge, Álvaro, Pilar, con vosotros espero seguir conociendo mundo.

A Ángel, si ahora te toca a ti, gracias por aparecer en mi vida, por ser el sufridor de mis gruñidos, por aguantarme en todos los malos momentos, por tranquilizarme, por desconectarme, por TODO... Espero estar yo a tu altura toda mi vida.



Índice

Abstract	1
Resumen	7
Abreviaturas	13
Introducción	19
A. Macrófagos e inmunidad	21
A.1. Origen y características	21
A.2. Polarización de los macrófagos	22
A.3. Macrófagos en homeostasis y macrófagos en inflamación	23
A.4. Marcadores de polarización	25
B. Ácido fólico, folato y transportadores de folato	28
B.1. Ácido fólico, folato y metabolismo del folato	28
B.2. Transportadores de folato y ácido fólico	31
B.2.1. Transportador de folato reducido (Reduced Folate Carrier, RFC)	31
B.2.2. Transportador de folato acoplado a protón (Proton Coupled Folate Transporter, PCFT)	32
B.2.3. Receptores de folato (Folate Receptor, FR)	33
C. Antifolatos	35
C.1. Breve historia de los antifolatos: aminopterina y metotrexato	35
C.2. Características del metotrexato (MTX): dosis y farmacocinética	35
C.3. Metabolismo del MTX	38
D. Artritis reumatoide (AR)	40
D.1. Características de la AR	40
D.2. Membrana sinovial y líquido sinovial de articulaciones AR: características y composición celular	42
D.3. Tratamiento de AR	44
D.4. Los macrófagos en la AR	45
Objetivos	47
Material y Métodos	51
Aislamiento de monocitos humanos y diferenciación de los macrófagos	53
Aislamiento de las células CD14 ⁺ de líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR)	53

Aislamiento de las células CD14 ⁺ de líquidos ascíticos	54
Cultivos celulares.....	55
Reactivos.....	55
Citometría de Flujo	56
Viabilidad celular.....	57
Retrotranscripción y PCR cuantitativa: qRT-PCR	57
ELISA.....	59
Inmunofluorescencia	59
Células.....	59
Tejidos	60
Experimentos de transporte de ácido fólico, 5-MTHF y MTX.....	61
“Microarrays” de expresión génica.....	62
Silenciamiento de ARN (siARN)	63
“Western Blot”.....	63
Clonación de timidilato sintasa (TS)	64
Microscopía confocal multicolor	64
Análisis estadístico	65
Resultados	67
Internalización y acumulación de tetrahidrofolato (THF) en los macrófagos	72
Expresión de moléculas implicadas en la internalización, retención y salida de folatos en los macrófagos.....	74
Internalización de 5-MTHF en los macrófagos a pH ácido	76
Internalización de metotrexato (MTX) en los macrófagos.....	77
Expresión de los transportadores de folato in vivo: FR-β y PCFT se co-expresan en los macrófagos residentes en tejidos implicados en la absorción y tránsito de folato	78
Expresión de los transportadores de folato in vivo: FR-β y RFC se co-expresan en los macrófagos en tejido en condiciones inflamatorias	79
Activina A regula la expresión de SLC19A1 (RFC) y la internalización de 5-MTHF en MØ-GM	82
El ácido fólico disminuye la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en los MØ-GM.....	83

Efecto del antifolato metotrexato en los macrófagos	85
Identificación del perfil de expresión génica de los monocitos expuestos a MTX a largo plazo.....	85
Validación de los resultados de transcriptómica.....	89
Dosis-respuesta y cinética de inducción génica durante la diferenciación de los macrófagos en respuesta a MTX	90
Efecto de MTX a corto plazo en monocitos y macrófagos. Base molecular de la respuesta diferencial a MTX en los MØ-GM y MØ-M.....	92
La expresión de timidilato sintasa (TS) condiciona la respuesta a MTX en los macrófagos	96
Expresión de timidilato sintasa (TS) en los macrófagos de tejido sinovial de AR..	98
La inhibición de TS modula la expresión génica dependiente de p53 en los MØ-GM.....	100
Caracterización fenotípica de las células CD14 ⁺ de líquido sinovial de artritis reumatoide (AR).....	102
Caracterización transcriptómica de los macrófagos de líquido sinovial de AR	103
Expresión de marcadores de polarización en los macrófagos de líquido sinovial y membrana sinovial de AR	106
El líquido sinovial de AR promueve la polarización pro-inflamatoria de los monocitos y los macrófagos.....	108
La activina A de líquido sinovial de AR media la capacidad de polarización de los monocitos y macrófagos.....	109
Fuente celular de la activina A en la membrana sinovial de AR.....	112
Discusión	115
Transportadores de folato en la polarización de los macrófagos	117
Selectividad de MTX por los macrófagos pro-inflamatorios humanos.....	120
Polarización de los macrófagos en artritis reumatoide.....	126
Conclusiones	131
Bibliografía	135
Anexo	151



Abstract

Pathological and therapeutic implications of the contribution of folate metabolism to macrophage polarization

Depending on the tissue microenvironment, macrophages exert pro-inflammatory functions (M1 polarization) or anti-inflammatory and tissue repairing activities (M2 polarization). M1 polarization is associated with Th1/Th17-immune responses, whereas M2 polarization predominates during resolution of inflammation. Vitamin B9, commonly known as folate, is an essential cofactor for one-carbon metabolism that enters the cells through three major specialized transport systems (the reduced folate carrier, RFC; the folate receptors, FR; the proton-coupled folate transporter, PCFT) that differ in their expression pattern, affinity for substrate and ligand-binding pH dependency. The anti-folate methotrexate (MTX) functions as an anti-proliferative agent in cancer and an anti-inflammatory drug in rheumatoid arthritis (RA). Although macrophages critically contribute to RA pathology, their response to MTX remains unknown. RA is a chronic inflammatory disease that causes bone and joint destruction, and affects 1% of the population worldwide. Many pathological changes of RA result from the activity of macrophages, whose presence in the synovium correlates with the severity of the disease. In fact, inhibition of macrophage effector functions reduces the underlying inflammatory process and has become a therapeutic approach for RA. Macrophage-derived cytokines fuel the pathological processes in RA and are targets of clinically successful therapies. However, although macrophage polarization determines cytokine production, the polarization state of macrophages in RA joints remains poorly defined.

OBJETIVES

1. Determine the expression and functional activity of folate transporters (FR- β , RFC and PCFT) in human macrophage polarization.
2. Study the effect of the anti-folate methotrexate (MTX) in human macrophage polarization.
3. Determine the polarization state of human macrophages in synovial fluid and membrane of patients with rheumatoid arthritis (RA).

We report that the expression of the folate transporters differs between macrophage subtypes, and explains the higher accumulation of 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF), the major folate form found in serum, in macrophages polarized with M-CSF or M-MØ *in vitro*. Macrophages polarized with GM-CSF (GM-MØ) displays higher expression of RFC, whereas FR-β and PCFT are preferentially expressed by anti-inflammatory M-MØ. These differences are also seen in macrophages from normal tissues involved in folate transit (placenta, liver, colon) and inflamed tissues (ulcerative colitis, rheumatoid arthritis), since M2-like macrophages from normal tissues express FRβ and PCFT, whereas TNFα-expressing M1 macrophages from inflamed tissues are RFC+. Besides, we provide evidence that activin A is a critical factor controlling the set of folate transporters in macrophages, as it downregulates FR-β, upregulates RFC expression and modulates 5-MTHF uptake.

As a mean to identify MTX-response markers, we have explored its transcriptional effect on macrophages polarized by GM-CSF (GM-MØ) or M-CSF (M-MØ), which resemble pro-inflammatory and anti-inflammatory/pro-tumoral macrophages found in RA and normal joints, respectively. MTX exhibited a minor transcriptional effect on M-MØ but modulated the expression of 2024 genes in pro-inflammatory GM-MØ, where it induced the expression of CCL20 and LIF at the mRNA and protein level. Pharmacological and siRNA-mediated approaches showed that the macrophage subset-specific MTX responsiveness correlates with thymidylate synthase (TS) expression, as pro-inflammatory TS⁺ GM-MØ are susceptible to MTX, whereas anti-inflammatory TS^{low/-} M-MØ and monocytes are refractory to MTX. Furthermore, p53 activity was found to mediate the TS-dependent MTX-responsiveness of pro-inflammatory TS⁺ GM-MØ. TS and p53 were found to be expressed by CD163⁺/TNF-α⁺ GM-CSF-polarized macrophages from RA joints but not from normal synovium. Altogether, our results demonstrate that macrophage response to MTX is polarization-dependent and determined by the TS-p53 axis, and that CCL20 and LIF constitute novel macrophage markers for MTX responsiveness.

To dissect the molecular basis for the tissue-damaging effects of macrophages in RA joints, we undertook the phenotypic and transcriptomic characterization of *ex vivo* isolated CD14⁺ RA synovial fluid (RA-SF) macrophages. Flow cytometry and gene profiling indicated that RA-SF macrophages express pro-inflammatory polarization

markers (MMP12, EGLN3, CCR2), lack expression of markers associated with homeostatic and anti-inflammatory polarization (IGF1, HTR2B) and exhibit a transcriptomic profile that resembles the activin A-dependent gene signature of pro-inflammatory *in vitro*-generated macrophages. *In vitro* experiments on monocytes and macrophages indicated that RA-SF promoted the acquisition of pro-inflammatory markers (*INHBA*, *MMP12*, *EGLN3*, *CCR2*) but led to a significant reduction in the expression of genes associated with homeostasis and inflammation resolution, thus confirming the pro-inflammatory polarization ability of RA-SF. Importantly, the macrophage-polarizing ability of RA-SF was inhibited by an anti-activin A-neutralizing antibody, thus demonstrating that activin A mediates the pro-inflammatory macrophage-polarizing ability of RA-SF. Moreover, and in line with these findings, multicolor immunofluorescence evidenced that macrophages within RA synovial membranes also express pro-inflammatory polarization markers, whose expression is activin A dependent. Altogether, our results demonstrate that macrophages from RA synovial fluids and membranes exhibit an MMP12⁺, EGLN3⁺ and CCR2⁺ pro-inflammatory polarization state and that the acquisition is partly dependent on activin A from the synovial fluid.

CONCLUSIONS

1. Tetrahydrofolate (THF) internalization and accumulation characterizes M-MØ *in vitro* and *in vivo*. M-MØ internalize more 5-MTHF at pH 7.4 (FR-β dependent) and pH 5.5 (PCFT dependent) than GM-MØ.
2. *In vivo* inflammatory macrophages predominantly express RFC whereas PCFT and FR-β are preferentially expressed by macrophages in homeostatic conditions, implying that the expression profile of folate transporters reflects the tissue inflammatory state and discriminates macrophages polarization.
3. Activin A modulates the expression of RFC and FR-β and the internalization of 5-MTHF in macrophages.

4. MTX exhibit context and differentiation-dependent effect in myeloid cells, determined by thymidylate synthase (TS) expression levels on monocytes and macrophages.
5. Macrophage response to MTX is polarization dependent and is determined by the TS-p53 axis.
6. LIF and CCL20 are MTX response markers in pro-inflammatory macrophages.
7. Macrophages from RA synovial fluid (RA-MØ-SF) show a gene profile similar to *in vitro* generated pro-inflammatory GM-MØ.
8. Synovial CD163⁺ macrophages from active RA patients exhibit a pro-inflammatory phenotype and express MMP12, PHD3, CCR2 and TNF- α .
9. Synovial fluid activin A contributes to the pro-inflammatory polarization profile of macrophages in RA.

Resumen

Implicaciones patológicas y terapéuticas de la contribución del metabolismo del folato a la polarización de macrófagos

Los macrófagos son células de enorme plasticidad que exhiben un gran número de estados fenotípicos y funcionales referidos como estados de activación o polarización. Los macrófagos pro-inflamatorios (polarizados por GM-CSF o MØ-GM) se asocian a respuesta inmune de tipo Th1/Th17 mientras que los macrófagos anti-inflamatorios (polarizados por M-CSF o MØ-M) predominan durante la homeostasis tisular y producen IL-10. El folato, vitamina B9, es un cofactor esencial en el metabolismo de un solo carbono que participa en las reacciones de síntesis de purinas, pirimidinas, remetilación de homocisteína y metilación de ADN. El folato entra en las células a través de tres transportadores (RFC, FR- β y PCFT) que difieren en patrón de expresión, afinidad por el sustrato y dependencia funcional del pH. El antifolato más utilizado en clínica es el metotrexato (MTX) que funciona como agente anti-proliferativo en cáncer y agente anti-inflamatorio en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (AR). El mecanismo de acción como agente anti-inflamatorio del MTX se desconoce en la actualidad. La AR es una enfermedad inflamatoria crónica que causa destrucción ósea y articular. Las alteraciones patológicas de la AR son, en gran medida, consecuencia de la actividad de los macrófagos, cuya presencia en la sinovia correlaciona con la severidad de la enfermedad. Sin embargo, el estado de polarización de los macrófagos en AR se desconoce. En base a estos antecedentes los objetivos de la tesis doctoral son:

OBJETIVOS

1. Determinar la expresión y actividad funcional de los transportadores de folato (FR- β , RFC y PCFT) en la polarización de los macrófagos humanos.
2. Estudiar el efecto del anti-folato metotrexato en la polarización de los macrófagos humanos.
3. Determinar el estado de polarización de los macrófagos humanos en líquido y membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide.

La expresión de transportadores de folato difiere en macrófagos pro-inflamatorios (MØ-GM) y anti-inflamatorios (MØ-M) *in vitro* e *in vivo*: los MØ-GM expresan

mayoritariamente RFC mientras que los MØ-M expresan preferentemente FR-β y PCFT. Estas diferencias también se detectaron en macrófagos residentes de tejidos en homeostasis e involucrados en el tránsito de folato (placenta, hígado y colon), que expresan FR-β y PCFT, y de tejido inflamado (colitis ulcerosa, membrana sinovial de AR), que expresan mayoritariamente RFC. La expresión diferencial de transportadores de folato conduce a que los MØ-M acumulen más 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF), la forma mayoritaria de folato en suero, que los MØ-GM tanto a pH 7.4, dependiente de FR-β, como a pH 5.5, dependiente de PCFT. También se demostró que la activina A modula la internalización de 5-MTHF al regular la expresión de RFC y FR-β.

La respuesta a MTX de macrófagos pro- y anti-inflamatorios, que asemejan los macrófagos de la sinovial de AR y sana, respectivamente, se estudió mediante transcriptómica. Los resultados indicaron que el MTX modula un mayor número de genes y con mayor cambio en la expresión en MØ-GM que en MØ-M. En MØ-GM, el MTX induce la expresión de ARNm y proteína de la quimioquina CCL20 y de la citoquina LIF, entre otros, y constituyen marcadores de respuesta a MTX en macrófagos. Se determinó que la respuesta diferencial a MTX de macrófagos depende de la expresión de la enzima timidilato sintasa (TS): los MØ-GM expresan TS y son susceptibles a MTX, mientras que los MØ-M y monocitos son TS^{bajo/-} y son refractarios a MTX. Se demostró el mecanismo molecular de la respuesta a MTX en MØ-GM, que viene determinado por el eje TS-p53. Los MØ de la membrana sinovial de pacientes con AR activa, pero no de la sinovial sana, expresan TS y p53, lo que explica la selectividad del MTX por MØ patológicos.

Para diseccionar el estado de polarización de MØ en AR y los factores que contribuyen a la adquisición del mismo, se caracterizó transcripcional y fenotípicamente los MØ CD14⁺ aislados *ex vivo* del líquido sinovial de articulaciones con AR activa (CD14⁺LS-AR). Los resultados mostraron que los macrófagos CD14⁺LS-AR expresan marcadores pro-inflamatorios (*MMP12*, *EGLN3*, *CCR2*), y exhiben un perfil transcripcional que asemeja a la firma génica de los macrófagos pro-inflamatorios modulados por activina A. Experimentos *in vitro* sobre monocitos y macrófagos mostraron que el líquido sinovial promueve la adquisición de marcadores pro-inflamatorios y reduce significativamente los marcadores anti-

inflamatorios y confirma la capacidad del líquido sinovial de promover la polarización pro-inflamatoria, que disminuye al neutralizar la activina A presente en el líquido sinovial. Asimismo, el análisis de inmunofluorescencia demostró la expresión de marcadores de polarización pro-inflamatorios dependientes de activina A (MMP12, PHD3, CCR2) en macrófagos de la membrana sinovial con AR activa. Se demostró que los MØ de las articulaciones con AR exhiben un estado de polarización pro-inflamatorio dependiente de activina A.

CONCLUSIONES

1. La internalización y acumulación de THF caracteriza a MØ-M tanto *in vitro* como *in vivo*. Los MØ-M internalizan más 5-MTHF a pH 7.4, de manera dependiente de FR- β , y pH 5.5, de manera dependiente de PCFT, que los MØ-GM.
2. Los macrófagos inflamatorios *in vivo* expresan predominantemente RFC, mientras que PCFT y FR- β se expresan preferencialmente en macrófagos en condiciones homeostáticas, lo que implica que el perfil de expresión de transportadores de folato refleja el estado inflamatorio del tejido y discrimina polarización de macrófagos.
3. La activina A modula la expresión de RFC y FR- β y la internalización de 5-MTHF en macrófagos.
4. El metotrexato (MTX) tiene un efecto contexto y diferenciación-dependiente en células mieloides que viene determinado por los niveles de expresión de timidilato sintasa (TS).
5. La respuesta a MTX en macrófagos es polarización dependiente y está determinada por el eje TS-p53.
6. LIF y CCL20 constituyen marcadores de respuesta a MTX en macrófagos pro-inflamatorios.

7. Los macrófagos de líquido sinovial (LS) de AR muestran un perfil génico similar a los MØ-GM pro-inflamatorios generados *in vitro*.
8. Los macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de pacientes con AR activa presentan un fenotipo pro-inflamatorio característico de MØ-GM y expresan MMP12, PHD3, CCR2 y TNF- α .
9. La activina A del líquido sinovial contribuye a la polarización pro-inflamatoria de macrófagos en AR.

Abreviaturas

2R	2 repeticiones
3R	3 repeticiones
5-FU	5-fluorouracilo
5-MTHF	5-Metiltetrahidrofolato
ABCC1-5	Proteína asociada a la resistencia de multidroga
ABCG2	Subfamilia de la proteína G unidad a ATP miembro 2
ACR	Colegio de Reumatología Americana
Act A	Activina A recombinante humana
ADAMTS	ADAM metaloproteasa con trombospondina
AF	Ácido Fólico
AFol	Ácido Fólico
AICARTF	Aminoimidazol carboxamida ribonucleótido transformilasa
AINES	Anti-inflamatorios no esteroideos
ALL	Leucemia linfoblástica aguda
AR	Artritis reumatoide
AREG	Anfiregulina
ATIC	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa
CCL20/MIP-3α	Ligando de la quimioquina 20/ Proteína inflamatoria de macrófagos 3 alfa
CD163	Receptor de hemoglobina/haptoglobina
CD206	Receptor de manosa
CD209	DC-SING
CD31	Molécula de adhesión celular endotelial
CD32/FCGR2B	Receptor del fragmento de IgG Fc, baja afinidad IIb
CD36	Receptor de trombospondina
CD50/ICAM3	Molécula intracelular de adhesión 3
CMKLR1	Receptor de quimioquinas 1
CSF1	Factor estimulante de colonias 1 (macrófagos)
DAPI	4, 6- diamino- 2- fenilindol
DAS28	Resultado de la actividad de la enfermedad 28
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DMARDS	Medicamentos modificadores de la enfermedad
dT	Timidina
dTDP	Desoxitimidina difosfato
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
EULAR	Liga Europea contra la reumatología
EGLN3	Familia egl-9 factor inducible por hipoxia 3
FAMES	Fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad
FAP	Proteína de fibroblastos activados
FCER1A	Receptor del fragmento de IgE FC, alta afinidad I
FGPS	Folil- γ -poliglutamato sintasa
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (verde)
Fizz1	Encontrado en la zona inflamatoria 1

FOLR1	Gen del receptor de folato 1
FOLR2	Gen del receptor de folato 2
FOLR3	Gen del receptor de folato 3
FOLR4	Gen del receptor de folato 4
FR	Factor reumatoide
FR-α	Proteína del receptor de folato alfa
FR-β	Proteína del receptor de folato beta
FR-δ	Proteína del receptor de folato delta
FR-γ	Proteína del receptor de folato gamma
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GARFT	Glicinamida ribonucleótido transformilasa
GGH	Gamma glutamil hidrolasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonia de macrófagos y granulocitos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GSEA	"Gene set enrichment analysis"
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietilo)-1-piperazineetanesulfónico
HFM	Malabsorción hereditaria del folato
HGUGM	Hospital General Universitario Gregorio Marañón
HIF-1α	Factor inducible por hipoxia 1 alfa
HMOX1	Heme oxigenasa 1
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1
HTR2B	Receptor 2B 5 hidroxitriptamina (serotonina)
HU12O	Hospital Universitario 12 de Octubre
HULP	Hospital Universitario La Princesa
IFN-γ	Interferon gamma
IGF1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1
IL	Interleuquina
IMP	Inosina monofosfato
INHBA	Inhibina A
IPA	"Ingenuity Pathway Analysis"
JNK	Jun Kinasa
LIF	Factor inhibitorio de leucemia
LPS	Lipopolisacárido
M-CSF	Factor estimulante de colonia de macrófagos
M-CSFR	Receptor del factor estimulante de colonia de macrófagos
MES	Ácido 2-(N-morpolino)etanesulfónico
MET	Met Proto-oncogen
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMP	Metaloproteasa
M\emptyset	Macrófagos
M\emptyset-AR	Macrófagos de la artritis reumatoide
M\emptyset-GM	Macrófagos polarizados por GM-CSF o M1
M\emptyset-M	Macrófagos polarizados por M-CSF o M2
MRP	Familia de receptores de proteína multidroga
MTHFR	Metilentetrahidrofolato reductasa
MTX	Metotrexato

MTX-Pgl	Metotrexato poliglutamado
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NOS2	Oxido nítrico sintasa 2
OSM	Oscostatina
PABA	Para aminobenzoico
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCC	Antipéptido cíclico citrulinado
PCFT	Transportador del folato acoplado a protón
PCR	Proteína C reactiva
PFK2	6 Fosfo fructokinasa 2
PFT	Pifitrina
PGE2	Prostaglandina 2
PHD3	Proteína codificada por el EGLN3
PMX	Pemetrexed
PPARγ	Receptor activado proliferación peroxisoma gamma
RANKL	Ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B
RFC	Transportador de folato reducido.
ROI	Regiones de interés
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPLP0	Proteína ribosomal, grande, P0
RSAD2	Dominio radical S-adenosil metionina contiene 2
S1P	Esfingosina 1 fosfato
SAM	S-adenosilmetionina
SBF	Suero Fetal bovino
SERPINB2	Inhibidor de la serpina peptidasa clado B miembro 2
SLC19A1	Gen del transportador de folato reducido
SLC2A1/GLUT1	Familia de transportadores de solutos 2 miembro 1/ Transportador de glucosa tipo 1
SLC40A1	Familia de transportadores de solutos 40 miembro 1/ Ferroportina
SLC46A1	Gen del transportador del folato acoplado a protón
STAB1	Estabilina 1
TAM	Macrófagos asociados a tumor
TBP	"TATA binding protein"
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
THBS1	Trombospondina 1
THF	Tetrahydrofolato
TNFA	Gen del factor de necrosis tumoral alfa
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TS	Timidilato sintasa
TYMS	Gen de la timidilato sintasa
VSG	Velocidad de sedimentación globular
ZD1694	Raltitrexed monohidratado
α-act A	Anticuerpo bloqueante anti-activina A
αTGF-β1	Anticuerpo bloqueante de factor de crecimiento transformante beta 1



Introducción

A. Macrófagos e inmunidad

Los macrófagos, junto con los neutrófilos, participan en el desarrollo de la respuesta inmune innata ya que constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos y generan una respuesta rápida e inespecífica (mediante fagocitosis, secreción de enzimas, citoquinas, y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno). Además, los macrófagos y las células dendríticas coordinan la respuesta inmune innata y adaptativa [1,2,3].

A finales del siglo XIX, Ellie Metchnikoff identificó los macrófagos como células capaces de fagocitar partículas externas y las denominó “fagocitos”. Por este descubrimiento obtuvo el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1908 [4,5,6]. El término macrófago fue acuñado por Aschoff en 1924 y proviene del griego “*makros*” grande y “*phagos*” comer, definiendo así al conjunto de células del sistema retículo-endotelial que incluía monocitos, macrófagos, histiocitos, fibroblastos, células endoteliales y células reticulares [4,5,6]. En 1992, se describieron los marcadores de macrófagos CD68 y F4/80, que permiten identificar los macrófagos humanos y murinos, respectivamente. En torno al año 2000, se describió la heterogeneidad de monocitos y macrófagos [4].

A.1. Origen y características

Desde la definición del sistema de fagocitos mononucleares [7], el dogma establecía que los macrófagos residentes en tejido se reemplazaban por monocitos provenientes de sangre [7]. Estudios más recientes en ratones y con nueva metodología muestran que los macrófagos de la dermis y del intestino se reemplazan con monocitos de sangre, pero éstos no contribuyen sustancialmente a las poblaciones de macrófagos residentes en muchos tejidos adultos en homeostasis. La mayoría de las poblaciones de macrófagos se establecen durante el desarrollo por precursores embrionarios que se mantiene en tejido adulto por auto-renovación (“self-renewal”). En los embriones, se producen ondas espacio-temporales de células hematopoyéticas que culminan con el establecimiento de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea. Recientemente se ha

establecido que los macrófagos del saco vitelino son los precursores de la microglia, mientras que la mayoría de macrófagos tisulares proviene de monocitos fetales derivados de progenitores eritro-mieloides c-myb⁺ generados en el saco vitelino [8].

Los macrófagos en tejido son células efectoras con gran plasticidad funcional lo que les permite participar en diferentes procesos fisiopatológicos, como reparación tisular, angiogénesis, progresión tumoral y metástasis. La plasticidad funcional de los macrófagos proviene de su capacidad de responder a estímulos endógenos y exógenos y de su capacidad de adaptarse a los cambios que suceden en el microambiente tisular, lo que explica la existencia de macrófagos específicos de tejido (microglía, células de Kupffer...) y la gran variedad de estados de polarización [9,10].

A.2. Polarización de los macrófagos

En respuesta a las citoquinas derivadas de células Th1 (por ejemplo, IFN- γ), de factores derivados de los microbios (LPS) u otras citoquinas como TNF- α o GM-CSF, los macrófagos adquieren actividad pro-inflamatoria, bactericida, anti-tumoral o inmunogénica en un proceso comúnmente conocido como polarización M1 o polarización clásica. Los macrófagos M1 se caracterizan por la capacidad de liberar una gran cantidad de IL-12 e IL-23, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y por la expresión de quimioquinas que reclutan células Th1 [2,11,12]. Los macrófagos M1 también conducen la polarización y el reclutamiento de células Th1 a través de la expresión de las citoquinas y quimioquinas (IL-12, CXCL9 y CXCL10) amplificando de este modo la respuesta inmune [11]. Por el contrario, las citoquinas derivadas de células Th2 (por ejemplo, IL-4 e IL-13), TGF- β o M-CSF, así como los glucocorticoides, promueven la adquisición de actividad anti-inflamatoria, "scavenger", pro-tumoral, de reparación tisular y pro-angiogénica. Todas estas funciones se asocian a macrófagos alternativamente activados o macrófagos M2. Los macrófagos M2 exhiben la capacidad de producir altos niveles de IL-10 [11,13,14,15,16]. Por tanto, los estados de polarización de macrófagos M1 y M2 representan dos extremos opuestos de un amplio rango fenotípico y funcional de estados de activación (Figura 1) [12,13,14,17].

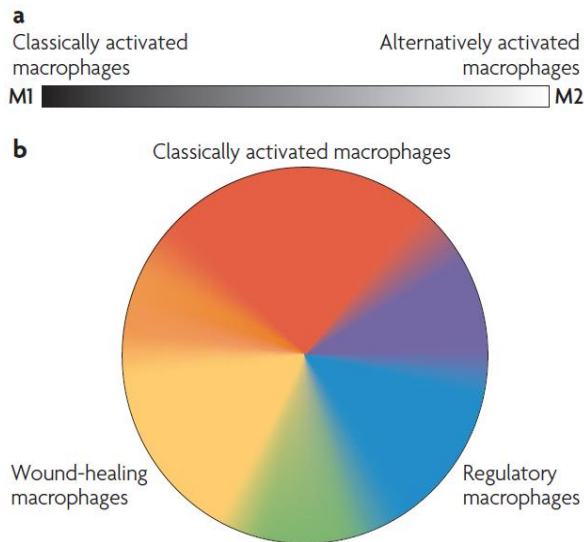


Figura 1. Rueda de color representando la activación de los macrófagos. A. Escala lineal representando los dos extremos de la polarización M1 y M2. **B.** Rueda de color que muestra la continua polarización de macrófagos. Modificada de [17].

A.3. Macrófagos en homeostasis y macrófagos en inflamación

En condiciones normales, los macrófagos están presentes en todos los tejidos manteniendo la homeostasis e integridad y actuando como centinelas, eliminando desechos celulares y células muertas (Figura 2). Los macrófagos se diferencian morfológica y funcionalmente dependiendo de cada tejido y constituyendo del 10 al 15% de las células en condiciones quiescentes, pudiendo aumentar en número bajo estímulos inflamatorios [10].

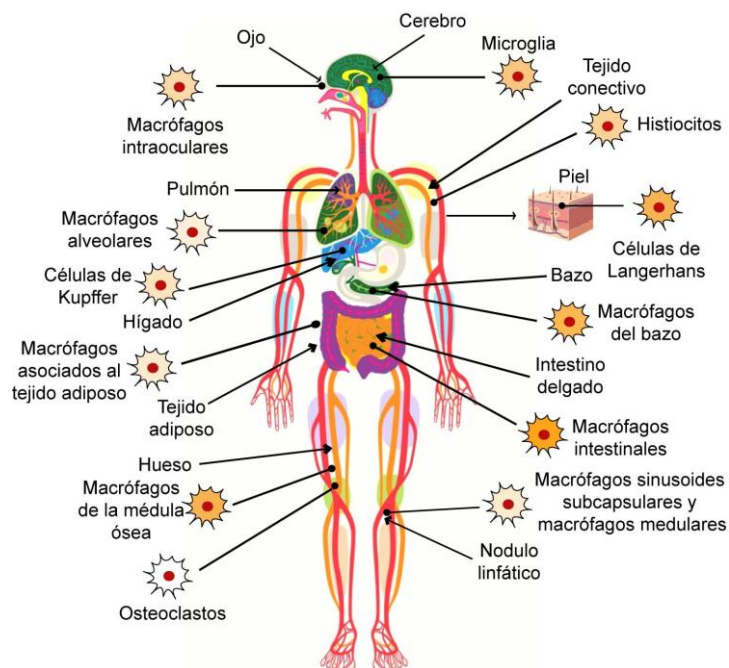


Figura 2. Nomenclatura y distribución tisular de macrófagos en homeostasis.

En condiciones homeostáticas *in vivo*, los macrófagos residentes en tejido también exhiben un estado de polarización variable que viene determinado por el microambiente tisular. Un ejemplo representativo son los macrófagos del hueso (osteoclastos) implicados en degradación del hueso; los macrófagos del cerebro (microglía) que contribuyen al desarrollo del circuito neuronal, a la modulación de la angiogénesis y al balance de fluidos en el cerebro [1,18], mientras que la función principal de los macrófagos hepáticos (células de Kupffer) es el “scavenging”. Debido a su localización en los sinusoides hepáticos, las células de Kupffer entran en contacto con antígenos provenientes de tracto gastrointestinal por la vena porta y contribuyen a la detoxificación de bacterias, endotoxinas, “debris” celulares, células apoptóticas o agentes tóxicos como el etanol [19,20].

Respecto a la polarización de macrófagos en homeostasis, la existencia de macrófagos M2 productores de IL-10 se ha demostrado en pulmón e intestino [21,22,23,24], tejidos que están expuestos continuamente a sustancias potencialmente dañinas. Los macrófagos del pulmón (macrófagos alveolares) producen IL-10 de manera constitutiva mientras que su capacidad de producir citoquinas pro-inflamatorias es baja [25]. Los macrófagos de otros tejidos también muestran perfil de polarización M2 en homeostasis: la microglía depende de la señalización a través de M-CSFR; las células de Kupffer, que constituyen entre el 80 - 90% de los macrófagos del organismo, son dependientes de la señalización por M-CSF [26,27,28]. En su conjunto, estas observaciones indican que los macrófagos muestran funciones efectoras características de la polarización M2 en varios tejidos en condiciones basales y que el control de la polarización es fundamental en la homeostasis del tejido.

La polarización de macrófagos M1 predomina en los estadios iniciales de la respuesta inflamatoria, cuando la actividad citotóxica y dañina para el tejido es muy robusta [29]. Más tarde, el número de los macrófagos de fenotipo M2 aumenta para promover la resolución de la inflamación, limitar la respuesta de tipo Th1 y promover el reclutamiento de células Th2. Este cambio en la polarización de los macrófagos se ha demostrado en el modelo murino de infección peritoneal por *L. monocytogenes*, donde al flujo inicial de monocitos pro-inflamatorios M1 le sigue (6 - 8 horas

después) un aumento en monocitos M2 implicados en la resolución de la inflamación. Todavía no se ha determinado si los macrófagos pro-inflamatorios M1 se re-polarizan a macrófagos M2 en este modelo de peritonitis. En general, se acepta que la re-polarización M1-a-M2 tiene lugar durante la inflamación y que la captura de células apoptóticas es el principal estímulo para que este cambio tenga lugar [29]. Weis y colaboradores han demostrado que la señalización de esfingosina-1-fosfato (S1P) derivado de células apoptóticas desencadena la expresión de la enzima heme-oxigenasa 1 (HMOX1) en los macrófagos, lo que promueve la polarización anti-inflamatoria M2 [30]. La ocurrencia secuencial de ambos estados de polarización se requiere para que la resolución de la inflamación sea adecuada y se alcance de nuevo la homeostasis tisular.

El desbalance entre el equilibrio M1/M2 o un inadecuado cambio en la polarización de los macrófagos en los tejidos inflamados da lugar a inflamación crónica como, por ejemplo, durante el desarrollo tumoral, enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, esclerosis múltiple), resistencia a insulina o patología cardiovascular asociada a la obesidad. En obesidad, los adipocitos liberan CCL2, TNF- α y ácidos grasos que promueven el reclutamiento y la activación de macrófagos de tejido adiposo a un fenotipo M1 [31]. La activación de macrófagos conduce a la inhibición de la vía de señalización de insulina y la activación de AP-1 y NF-kB (que conduce a mayor secreción de mediadores inflamatorios), y, en consecuencia, a la resistencia a insulina. Los macrófagos de tejido adiposo de ratones y humanos muestran un perfil de polarización M1, mientras que los macrófagos de tejido adiposo de ratones delgados expresan genes asociados a polarización M2 como la IL-10 [31,32,33].

A.4. Marcadores de polarización

Para definir el estado de polarización de macrófagos murinos se usan diferentes marcadores. En la activación clásica M1 (LPS, IFN- γ), los macrófagos se identifican por la expresión de NOS2, CD11c, o CCR7 [34,35,36], mientras que la polarización M2 dependiente de IL-4 se define con la expresión de arginasa-1, el receptor de manosa (CD206), la molécula Ym1 y Fizz-1 (found in inflammatory zone-1) [36]. La expresión opuesta de NOS2 y arginasa-1 se ha establecido como el paradigma para

diferenciar macrófagos clásicos y alternativos en términos de metabolismo [2,37,38]. Mientras que los macrófagos M1 usan arginina para catabolizar óxido nítrico mediante la estimulación de la óxido nítrico sintasa (NOS2), los macrófagos M2 expresan arginasa-1 para producir los precursores de poliaminas de urea y de ornitina, necesarios para la síntesis de colágeno y proliferación celular respectivamente [39].

Existen otros marcadores que distinguen los macrófagos M1 y M2 relacionados con el metabolismo. Respecto al metabolismo de lípidos, los macrófagos M2, pero no los macrófagos M1, muestran un aumento significativo en la internalización y oxidación de ácidos grasos [39]. Esta diferencia se correlaciona con la expresión opuesta de COX-2 y COX-1, considerados marcadores de macrófagos M1 y M2 respectivamente [40]. El metabolismo del hierro también está diferencialmente regulado en macrófagos M1 y M2. Los macrófagos M1 tienen un fenotipo CD163^{bajo} (receptor hemoglobina/haptoglobina), ferritina^{alto} (implicada en acumulación de hierro) y ferroportina^{bajo} (media la salida de hierro), por lo que retienen hierro, y concuerdan con su actividad bacteriostática y tumoricida [3,41,42,43]. Por el contrario, los macrófagos M2 muestran un perfil opuesto y son células que exportan hierro, actividad que promueve sus funciones de inmuno-regulación y proliferación celular [38,43]. En el caso del metabolismo de la glucosa, los macrófagos M1 (activados por LPS o IFN- γ) tienen alta expresión de 6-fosfo-fructokinasa 2 (PFK2) y elevada glicolisis, mientras que los macrófagos M2 (activados por IL-4) muestran mayor metabolismo oxidativo de la glucosa [44].

La extrapolación de marcadores de polarización de ratón a humano ha revelado ciertas diferencias [12]. La comparación de los macrófagos humanos y de ratón generados *in vitro* ha demostrado que sólo el 26% de los marcadores se mantiene entre ambas especies [35]. Sin embargo, aunque la expresión de marcadores no sea comparable, las funciones atribuidas a macrófagos M1 y M2 son comunes en ambos sistemas. La búsqueda de marcadores de polarización en macrófagos humanos es un área activa de investigación, por su valor potencial en diagnóstico y pronóstico de enfermedades. Numerosos grupos de investigación han trabajado en la identificación de marcadores de polarización durante los últimos años determinando el perfil de expresión génica de poblaciones de macrófagos aislados *ex vivo*, o generados *in*

in vitro diferenciando monocito a macrófago bajo la influencia de citoquinas polarizadoras M1 (IFN- γ , GM-CSF, LPS..) y M2 (IL-4, M-CSF, IL-10...) [12,17,45,46] (Figura 4). En los macrófagos humanos, el grupo de Ángel Corbí y sus colaboradores han descrito que los marcadores FR- β , HMOX1 y CD209 se expresan preferencialmente en los macrófagos anti-inflamatorios M2 (generados *in vitro* con M-CSF) y los macrófagos asociados a tumor (TAM) [47], mientras que los marcadores activina A [48], PHD3 [49] y CCR2 [50] se expresan preferencialmente en los macrófagos M1 (generados *in vitro* con GM-CSF) (Figura 3). La activina A (codificada por *INHBA* y que pertenece a la familia de TGF- β) es producida por los macrófagos M1 (GM-CSF) y promueve la polarización a macrófagos M1, mientras que inhibe la polarización M-CSF dependiente (M2) y los marcadores de la polarización a macrófagos M2 como FR- β (*FOLR2*) (Figura 3) [48].

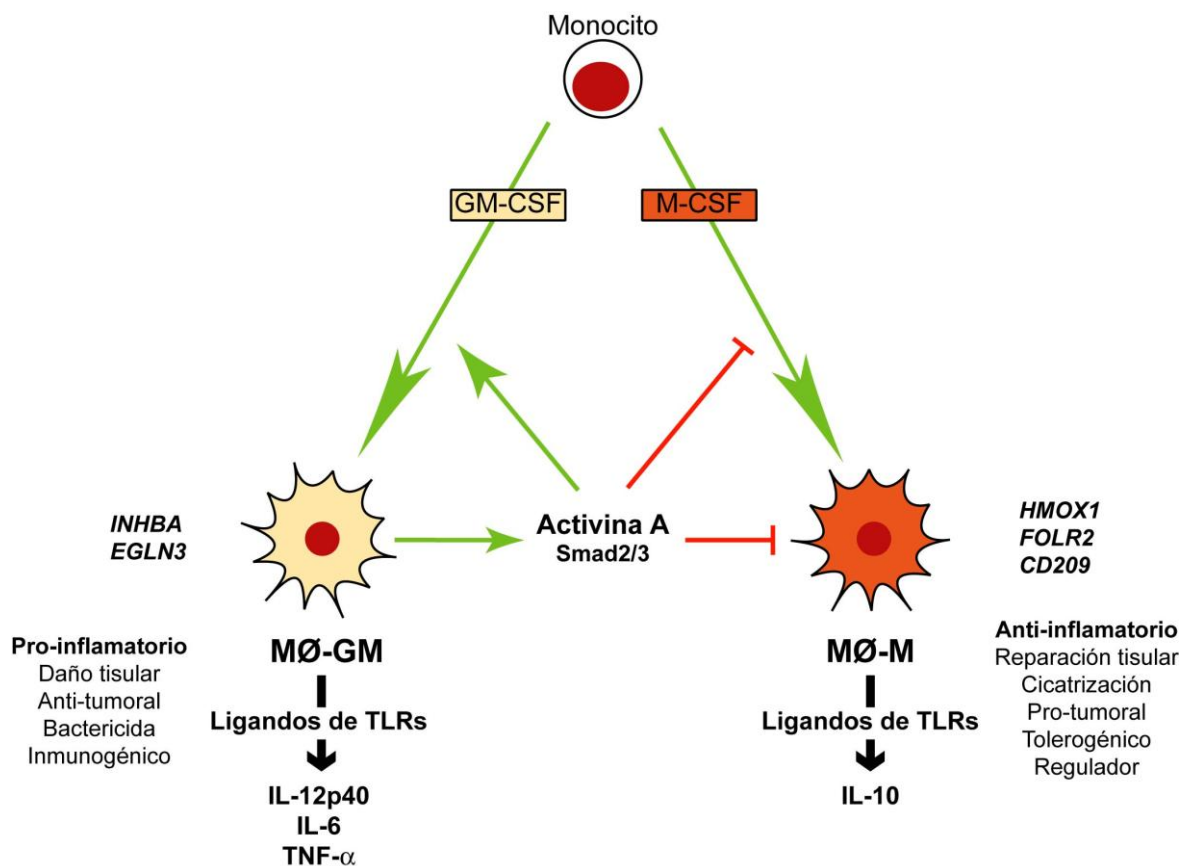


Figura 3. Polarización de los macrófagos M1 o MØ-GM (izquierda) y M2 o MØ-M (derecha). Sistema de diferenciación de monocitos a macrófago MØ-GM y MØ-M *in vitro*. Izquierda, la diferenciación con GM-CSF genera macrófagos M1 o MØ-GM, que se caracterizan por su actividad pro-inflamatorias, de daño tisular, anti-tumoral, y bactericida, expresan los marcadores específicos *INHBA* (Activina A) y *EGLN3*, y producen IL-23, IL12, IL6 y TNF- α en respuesta a ligandos de TLR como el LPS. La activina A promueve la polarización M1 e inhibe la polarización M2. Derecha, la diferenciación con M-CSF genera macrófagos M2 o MØ-M, que se caracterizan por su actividad anti-inflamatoria y de reparación tisular, pro-tumoral y de cicatrización. Los MØ-M expresan marcadores específicos *HMOX1*, *FOLR2* (FR- β) y *CD209* (DC-SIGN), y producen altos niveles de IL-10 en respuesta a LPS.

B. Ácido fólico, folato y transportadores de folato

B.1. Ácido fólico, folato y metabolismo del folato

El ácido fólico es un miembro de la familia de vitaminas B y la forma oxidada de la vitamina B9 [51]. El derivado reducido y biológicamente activo es el tetrahidrofolato (THF), comúnmente llamado folato. El término folato viene del latín “*folium*”, que significa hoja, ya que los folatos están presentes en cantidad importante en vegetales de hoja verde. Estructuralmente está compuesto por un anillo de pteridina, unido a un para-aminobenzoilo (PABA) y un residuo de glutamato (Figura 4) [51,52]. Los mamíferos son capaces de sintetizar el anillo de pteridina, pero carecen de las enzimas que unen la pteridina a PABA y, por ello, son dependientes de la dieta para mantener los niveles de folato necesarios para las diferentes reacciones metabólicas [51,52]. Encontramos ácido fólico en zumo de naranja, verduras de hoja verde, frutos secos, legumbres e hígado. Otra fuente de folatos son las bacterias de la microflora intestinal. Los folatos juegan un papel crucial en el metabolismo de un solo carbono (“one-carbon metabolism”), que es esencial para la metilación, biosíntesis de purinas y pirimidinas, timidilato y reparación y replicación de ADN [51,52].

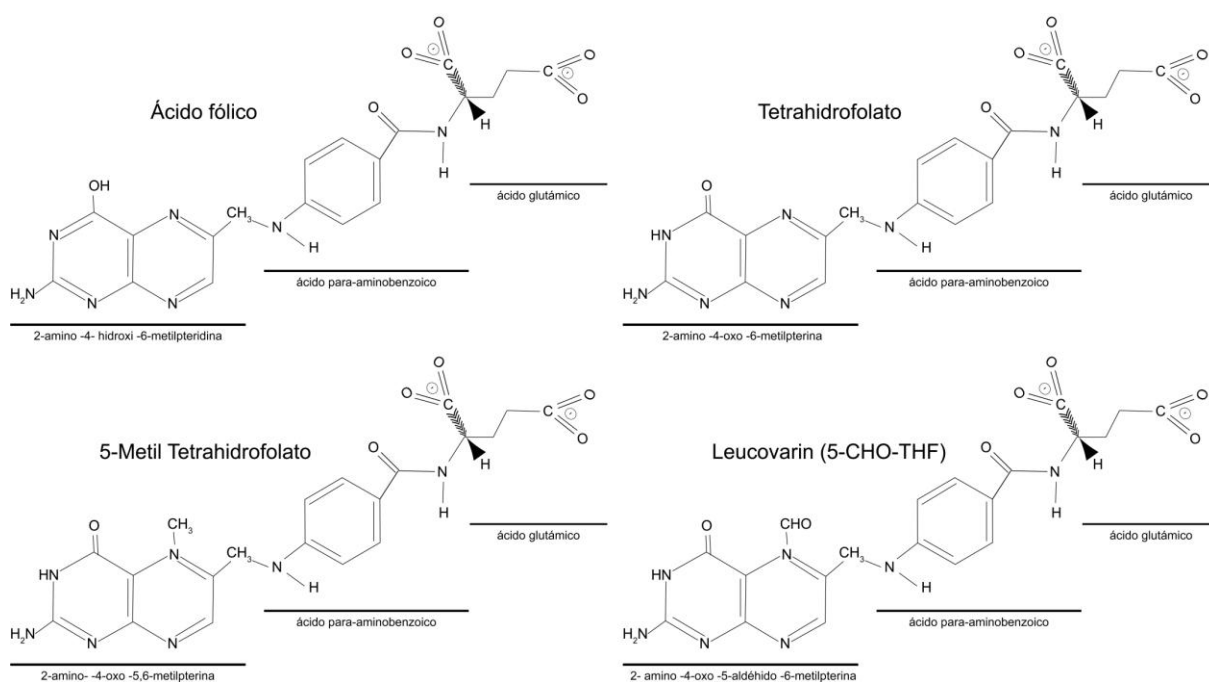


Figura 4. Estructura química de ácido fólico, tetrahidrofolato, 5-metil tetrahidrofolato y 5-formil tetrahidrofolato (ácido folínico, leucovarina).

Cuando se internaliza por las células, el folato se poliglutamila por la enzima folil- γ -poliglutamato sintasa (FPGS), que cataliza la adición de entre 1 a 8 moléculas de ácido glutámico al grupo γ -carboxil de la molécula. La función principal de la poliglutamilación es aumentar la retención intracelular de los cofactores de THF, ya que los poliglutamatos de THF son polianiones impermeables a la bicapa lipídica [52,53]. Dentro de la célula, los cofactores de THF funcionan como aceptores y donadores de unidades de un carbono. Estas unidades de un carbono están covalentemente unidas a THF, pueden estar en forma oxidada o reducida y pueden ser derivados metil, formil o metilen- (5,10-metilen-THF, 10-formil-THF, 5-metil-THF, este último es la mayor forma de folato en plasma) [51] (Figura 4). La primera fuente de unidades de un átomo de carbono es donada por la serina a THF resultando en la formación de glicina y 5,10-metilen-THF. El 5,10-metilen-THF es esencial para la reacción de la enzima timidilato sintasa (TS). La TS cataliza la conversión de deoxiuridina monofosfato (dUMP) a deoxitimidina monofosfato (dTMP) utilizando 5,10-metilen-THF como grupo donador de metilo [51,52]. El dTMP se fosforila subsecuentemente a dTTP, precursor esencial para la reparación y replicación del ADN (Figura 5). La segunda reacción metabólica en la que está implicado el folato es el ciclo de la metilación. La metionina sintasa transfiere el grupo metil del 5-metil-THF a la homocisteína, lo que resulta en la formación de metionina. Esta se convierte en S-adenosilmetionina (SAM) [54]. El ciclo de la metilación ocurre en todas las células nucleadas y SAM sirve como el donador de grupos metilo en reacciones clave como metilación de islas CpG en el ADN, metilación de proteínas y metilación de lípidos (fosfatidilcolina). La metilación es un paso crucial en el metabolismo de neurotransmisores y en detoxificación de xenobióticos. Por ello, la deficiencia en folato puede aumentar los niveles de homocisteína [52]. Los cofactores de THF también participan en el metabolismo de las purinas. El cofactor 10-formil-THF dona unidades de carbono en dos pasos de la reacción biosintética de purinas. La primera reacción está catalizada por la enzima glicinamida ribonucleótido transformilasa (GARFT) que transfiere un grupo formilo de 10-formil-THF en la formación del anillo de imidazol de las purinas [51,52]. La segunda reacción la lleva a cabo la enzima aminoimidazol carboxamida ribonucleótido transformilasa (AICARTF,ATIC) que resulta en la formación de un intermediario de las purinas, llamado inosina monofosfato (IMP). Cabe destacar que los cofactores de THF se utilizan de manera cíclica: el dihidrofolato (DHF), producto de la reacción de TS, se

recicla a la forma activa THF por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) en una reacción dependiente de NADPH. Este THF y los THF que derivan de la síntesis de purinas pueden convertirse en 5,10-metilen-THF y 10-formil-THF. Estos últimos cofactores se re-utilizan en la síntesis de purinas y timidilato (Figura 5) [53,54,55,56,57].

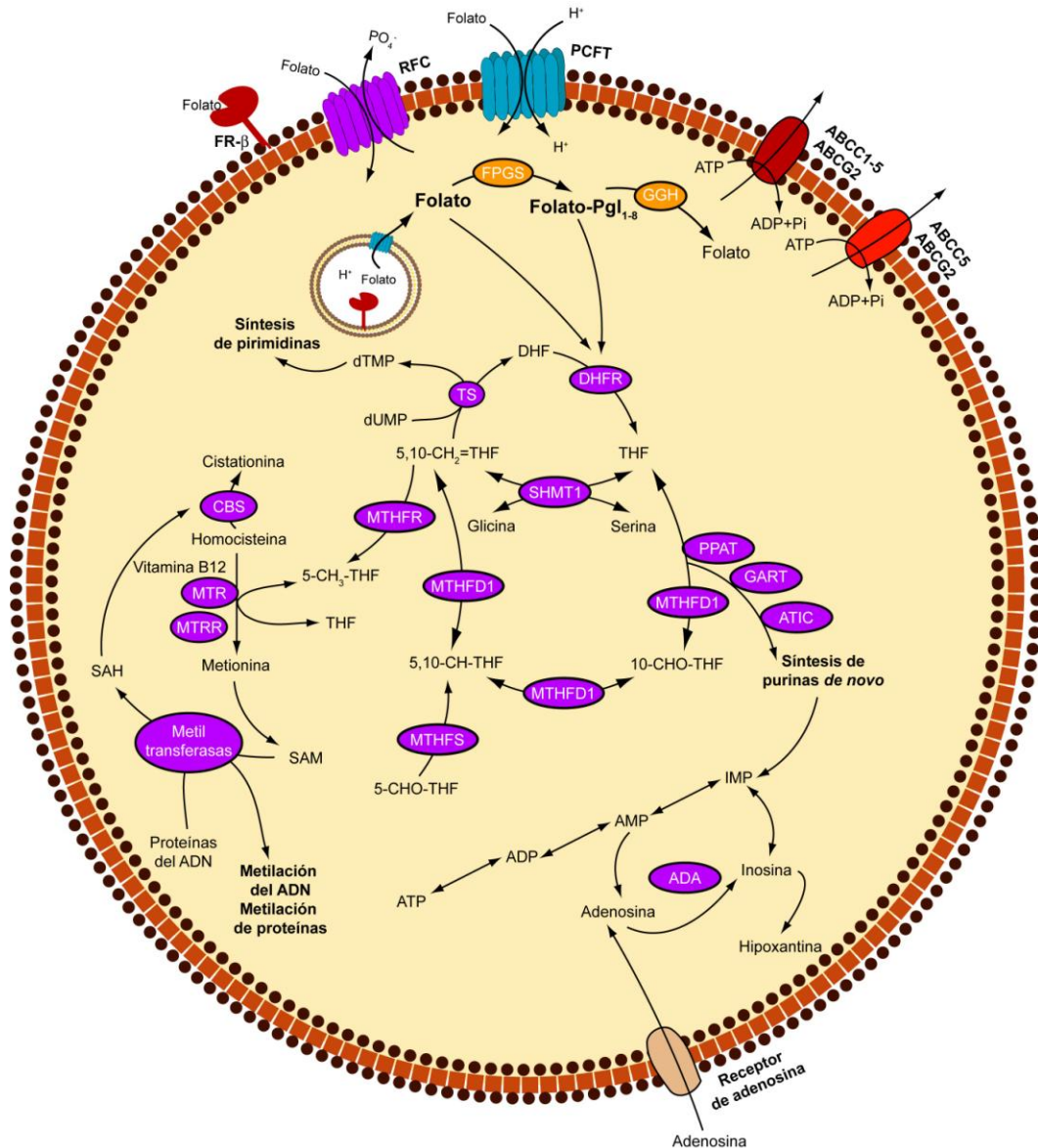


Figura 5. Metabolismo del folato simplificado. Se muestra la entrada del ácido fólico y los folatos fisiológicos en la célula, la poliglutamación y las reacciones de metilación y síntesis de pirimidinas y purinas. Folato-Pgl: Folato poliglutamado; RFC: Transportador de folato reducido; PCFT: Transportador de folato acoplado a un protón; FR-β: Receptor de folato beta; FPGS: Folil-poliglutamato sintasa; GGH: Gamma glutamil hidrolasa; TS: Timidilato Sintasa; dTMP: Deoxitimidina monofosfato; dUMP: Deoxiuridina monofosfato; DHF: Dihidrofolato; DHFR: Dihidrofolato reductasa; THF: Tetrahydrofolato; GART: glicinamida ribonucleótido formiltransferasa; ATIC: 5-Aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa; MTHFR: Metilentetrahydrofolato reductasa; CBS: Cistationina beta sintasa; MTR: 5-metil tetrahydrofolato homocisteína metiltransferasa; MTRR: 5-metil tetrahydrofolato homocisteína metiltransferasa reductasa; MTHFS: 5,10-Metilen tetrahydrofolato sintetasa; MTHFD1: Metilen tetrahydrofolato deshidrogenasa 1; PPAT: fosforibosil pirofosfato amidotransferasa; SHMT1: Serina hidroximetiltransferasa 1; SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; 10-CHO-THF: 10-formil tetrahydrofolato; ABCC1-5: Proteína asociada a la resistencia de multidrogas; ABCG2: Subfamilia de la proteína G unidad a ATP miembro 2; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; AMP: adenosina monofosfato; IMP: iosina trifosfato; 5-CH3-THF: 5-metil tetrahydrofolato; y 10-CHO-THF: 10-formil tetrahydrofolato.

En base a todas estas reacciones metabólicas, la deficiencia en los niveles intracelulares de folato puede dificultar la biosíntesis de nucleótidos, la remetilación de homocisteína, la biosíntesis de metionina y otros procesos intracelulares de metilación [54,55] (Figura 5). Todo ello puede conducir a diferentes desórdenes como anemia megaloblástica, leucopenia, trombocitopenia y defectos en el desarrollo embrionario, en particular en el tubo neural. Estas patologías se asocian a deficiencia de folato [52,56,58,59].

B.2. Transportadores de folato y ácido fólico

El ácido fólico y el 5-metil-THF en su forma de monoglutamato (5-MTHF) son aniones divalentes que no pueden atravesar la membrana lipídica por difusión simple. La internalización del folato en las células se lleva a cabo por “carriers” el transportador de folato reducido (RFC), el transportador de folato acoplado a protón (PCFT) y por los receptores de folato (FR) [53,60,61,62].

B.2.1. Transportador de folato reducido (Reduced Folate Carrier, RFC)

El RFC está codificado por el gen *SLC19A1*, pertenece a la superfamilia de los transportadores de solutos (SLC) [63] y es el principal transportador de folato en células de mamífero. RFC ni une ni hidroliza ATP para transportar el folato a través de la membrana. El flujo de folato está acoplado al flujo de fosfatos orgánicos, incluyendo tiamina monofosfato y pirofosfato. RFC tiene una alta afinidad por folatos ($K_m = 1 \mu\text{M}$) y por el anti-folato metotrexato (MTX, $K_m = 5 - 10 \mu\text{M}$), pero baja por el ácido fólico ($K_m = 200 - 400 \mu\text{M}$) (Tabla 1). RFC tiene actividad óptima a pH 7.4, su actividad disminuye a medida que disminuye el pH y apenas muestra actividad a pH 5.5 [60,61,64].

El transportador RFC humano consta de 591 aminoácidos y estructuralmente se compone de 12 dominios transmembrana con sus extremos N- y C-terminal en el citoplasma y con N-glicosilación en el Asn58 (situado en el “loop” que conecta los

dominios transmembrana 1 y 2) [61,65]. RFC tiene expresión ubicua. El ratón deficiente en RFC indica el papel que juega el transportador en el desarrollo: los embriones “RFC-null” mueren en el útero antes del día embrionario 9.5 (E9.5). Este fenotipo se puede rescatar con dosis de 1 mg/diario de ácido fólico. Sin embargo, los ratones rescatados mueren 12 días después de nacer debido a fallos en hematopoyesis [66].

B.2.2. Transportador de folato acoplado a protón (Proton Coupled Folate Transporter, PCFT)

PCFT está codificado por el gen *SLC46A1* (también conocido como HCP-1) que pertenece a la superfamilia de los transportadores de solutos (SLC) [61]. Este transportador funciona de manera óptima a pH 5.5 y muy débilmente a pH fisiológico. PCFT tiene la misma afinidad por el ácido fólico, folatos reducidos y antifolatos ($K_m = 0.5 - 2 \mu\text{M}$) a pH 5.5 (Tabla 1). PCFT funciona como un transportador simporte, co-transporta protones (H^+) y folatos al interior celular [53,60,61,64]. El transportador PCFT consta de 459 aminoácidos con 12 dominios transmembrana. Los extremos C- y N-terminal se localizan en el citoplasma y tiene dos sitios de N-glicosilación en Asn58 y Asn68, ambos localizados en el “loop” que une los dominios transmembrana 1 y 2 [61]. PCFT interviene en la absorción intestinal de folatos en el microclima ácido del duodeno y yeyuno. Además de en el intestino delgado, PCFT se expresa en otros tejidos involucrados en el transporte fisiológico de folatos como la placenta y el hígado [67]. En consistencia con el papel que juega PCFT en la absorción intestinal de folatos, las mutaciones de pérdida de función en el gen *SLC46A1* resultan en el síndrome de malabsorción de folato hereditario (HFM, Hereditary Folate Malabsorption; OMIM 229050), desorden raro de carácter autosómico recesivo [56,68,69]. Estos pacientes manifiestan bajos niveles de folato en sangre y en el sistema nervioso central y presentan los siguientes síntomas: anemia megaloblástica, deficiencias del sistema inmune, infecciones recurrentes, deficiencias neurológicas y retraso mental.

B.2.3. Receptores de folato (Folate Receptor, FR)

La familia de receptores de folato incluye cuatro miembros: FR- α (codificado por el gen *FOLR1*), FR- β (*FOLR2*), FR- γ (*FOLR3*) y FR- δ (*FOLR4*). Tres de ellos (α , β y δ) están anclados a la membrana plasmática mediante un dominio glicosilfosfatidilinositol (GPI) [47] (Figura 6). FR- γ es una proteína soluble que carece del anclaje GPI.

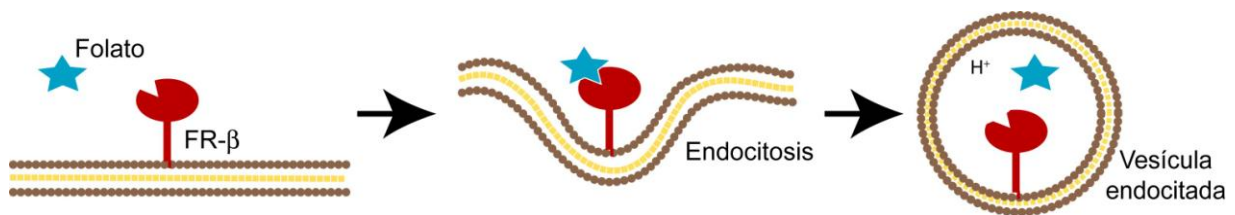


Figura 6. Representación esquemática de la internalización del folato al interior celular por el receptor de folato proteína unida a la membrana por glicofosfatidilinositol.

FR- α y FR- β tienen alta afinidad por el ácido fólico y 5-metil-THF ($K_d = 0.1 - 10$ nM) pero baja afinidad por otros folatos reducidos y MTX ($K_d = 10 - 300$ nM) [65] (Tabla 1). La internalización de folatos tiene lugar por un mecanismo de endocitosis mediada por receptor. Los receptores de folato se caracterizan por tener una expresión restrictiva. FR- α se restringe a células epiteliales, específicamente en el plexo coroideo, en los túbulos proximales del riñón y del epidídimo, en las células acinares mamarias, en las glándulas bronquiales y salivares submandibulares y en las células del trofoblasto. Auto-anticuerpos anti-FR- α y mutaciones de pérdida de función en FR- α , que causa una enfermedad neurodegenerativa en niños, se han asociado a deficiencia de folato cerebral [58,59]. Recientemente se ha descrito que FR- α media el transporte del 5-MTHF en el líquido cefalorraquídeo [70]. Los estudios en ratones deficientes indican que FR- α es vital para el desarrollo del tubo neural. Los embriones FR- α KO mueren en el útero.

FR- β se expresa en monocitos inflamatorios [71], macrófagos y células de leucemia mieloide aguda [60,65,72,73]. Respecto a su expresión en los macrófagos, FR- β se expresa en los macrófagos humanos polarizados por M-CSF *in vitro* y los macrófagos asociados a tumor de manera funcional ya que FR- β media la internalización de conjugados de folato (cuya internalización es exclusiva de

receptores de folato y no depende de RFC o PCFT) [47,61]. Los macrófagos humanos polarizados por GM-CSF expresan niveles muy bajos o nulos de FR- β y en consecuencia no muestran capacidad de internalizar conjugados de folato. Por el contrario, en modelos murinos de inflamación (modelos de asma y de artritis reumatoide) los macrófagos son capaces de internalizar conjugados de folato [71,74]. Los ratones deficientes en FR- β muestran un fenotipo normal pero mayor riesgo de desarrollar defectos en el tubo neural inducidos por arsénico [47,65,72].

FR- β y PCFT unen folatos con alta afinidad pero con distinto pH [53]. Se ha explorado el papel de PCFT durante la endocitosis de folato en células HeLa que expresan FR- α [75]. En estos estudios se ha demostrado que PCFT se co-expresa con FR- α en endosomas y que la función de PCFT es exportar folatos de endosomas acidificados al citoplasma [75].

FR- δ (*FOLR4*) se expresa en las células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ y en ovocitos. Recientemente se ha demostrado que FR- δ es esencial para la fusión entre el óvulo y el espermatozoide y para la fertilización [76]. La proteína Izumo1 se expresa en espermatozoides y es el ligando de FR- δ , proteína re-llamada Juno. Tras la fertilización se produce el “shedding” de Juno en el huevo fertilizado para impedir la poliespermia. Los ratones Juno^{-/-} hembra son infértiles y los ovocitos Juno^{-/-} no se fusionan con el espermatozoide normal [76]. FR- γ (*FOLR3*) es un receptor soluble que se secreta en los tejidos hematopoyéticos y se encuentra en el suero [72].

Proteína	RFC	FR- α /FR- β /FR- δ	PCFT
Gen	<i>SLC19A1</i>	<i>FOLR1/FOLR2/FOLR4</i>	<i>SLC46A1</i>
Anclaje	Transmembrana	Unida a GPI	Transmembrana
Peso molecular (KDa)	60	29 (34)	50
Expresión	Ubicuo	Específica	Epitelial
Afinidad de folatos y antifolatos			
Ácido Fólico	Km= 200 - 400 μ M	Kd= 1 nM	Km= 0.5 - 2 μ M pH 5.5
5-MTHF	Km= 1 - 10 μ M	Kd= 1 - 10 nM	Km= 0.5 - 2 μ M pH 5.5
Antifolato	Km= 1 - 5 μ M	Kd> 100 nM	Km= 0.5 - 2 μ M pH 5.5
Conjugados de folato	No	Si	No
Ratón KO	Letal	FR- α Letal FR- β Fenotipo normal FR- δ No descrito	Deficiencia sistémica de folatos

Tabla 1. Características básicas de los transportadores RFC, PCFT y FR.

C. Antifolatos

Los antifolatos son antagonistas del ácido fólico y pertenecen a un grupo de fármacos conocidos como antimetabolitos, compuestos sintéticos con analogía estructural al metabolito normal que actúan como antagonistas del mismo.

C.1. Breve historia de los antifolatos: aminopterina y metotrexato

Los antifolatos entraron en la terapia contra el cáncer a finales de 1940. En 1948, los doctores Farber y Diamond describieron el “fenómeno de aceleración” en el que la administración de ácido fólico a niños con leucemia aguda aceleraba el proceso leucémico [77]. Propusieron que este fenómeno podría revertirse tratando a los pacientes con antagonistas del ácido fólico. La aminopterina indujo temporalmente la remisión en 10 de los 16 niños con leucemia aguda tratados, y se convirtió en el primer antifolato usado en clínica. Este hecho se considera el comienzo de la quimioterapia oncológica. El metotrexato (MTX), homólogo de la aminopterina pero con mejor índice terapéutico, se estableció como el primer antifolato usado en clínica para tratar osteosarcoma, coriocarcinoma y cáncer de mama e indujo la remisión completa en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) [78].

Para interferir en la proliferación del tejido conectivo a principios de 1950 se trató con aminopterina a pacientes con artritis reumatoide (AR) [79], y se observó una mejora de los signos y síntomas de la AR en 6 de los 7 pacientes estudiados. En 1980, Hoffmenster y colaboradores realizaron el primer ensayo clínico en pacientes con AR severa con dosis bajas de MTX que demostró gran eficacia anti-inflamatoria [80,81].

C.2. Características del metotrexato (MTX): dosis y farmacocinética

En la actualidad, el MTX es un agente quimioterapéutico utilizado en el tratamiento de numerosas enfermedades neoplásicas incluyendo leucemia linfoblástica aguda, linfoma no Hodgkin, osteosarcoma, cáncer de pulmón y cáncer de mama. En AR, el

MTX está incluido dentro del grupo de medicamentos modificadores de la enfermedad (DMARDs). El MTX también se utiliza en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes como la enfermedad de Crohn y la psoriasis [80]. Las dosis cambian significativamente según el tipo de enfermedad; en cáncer la dosis de MTX varía entre 20 - 250 mg/kg, mientras que en AR la dosis varía entre 0.1 - 0.3 mg/Kg y se administra semanalmente [79]. La alta concentración de MTX en cáncer pueden generar toxicidad, por lo que al día siguiente se administra una dosis de ácido fólico de rescate (10 - 15 mg/m²) [82,83]. En la AR, se recomienda comenzar con una dosis de MTX de 7.5 mg/semana, ajustándose hasta tener una respuesta óptima, y no pudiendo exceder de 20 - 25 mg/semana y, al día siguiente se administra una dosis de ácido fólico (5 - 20 mg) [84] o ácido fólico (5 mg) [85]. En AR, la respuesta terapéutica al tratamiento comienza entre 3 y 6 semanas después del inicio del mismo. Si el paciente responde bien, el tratamiento se mantendrá en torno a 2 años [79].

Estructuralmente la molécula del MTX está conformada por el ácido 4-amino-N10-metilpteroil glutámico, y, en la posición 4 del anillo de pterinas, el grupo amino sustituye al grupo hidroxilo respecto a la molécula de ácido fólico (Figura 7).

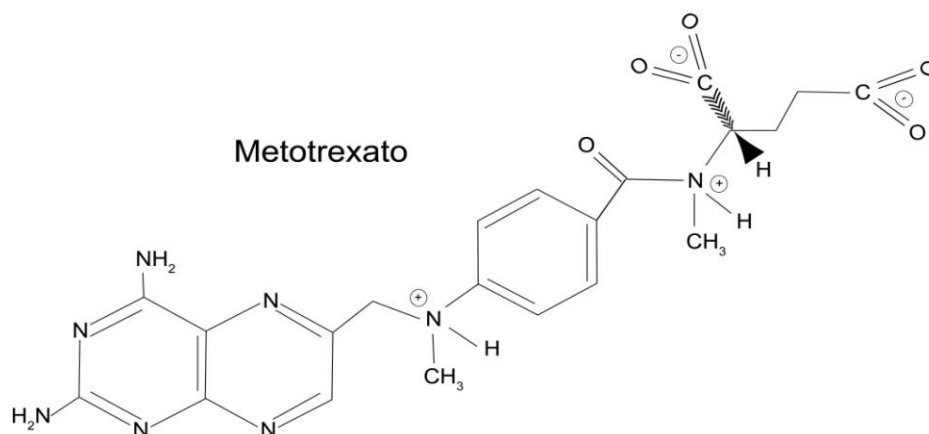


Figura 7. Estructura química del metotrexato.

El MTX puede ser administrado por vía oral, intravenosa, intramuscular o intratecal. Si la administración es por vía oral, el MTX se absorbe en la zona del yeyuno proximal mediante un transporte activo, incompleto y rápido que depende de cada paciente y de la dosis administrada. El MTX oral experimenta un primer paso en el hígado que contempla dos modificaciones: la 7-hidroxilación por el aldehído oxidasa,

produciendo 7-hidroximetotrexato responsable de la nefrotoxicidad y la poliglutamilación, responsable de la retención dentro de la célula [86,87], y que limita su biodisponibilidad al introducirlo en la circulación enterohepática [81,88,89]. Una vez absorbido en el intestino y transportado al torrente sanguíneo, se distribuye a lo largo del cuerpo mostrando mayor concentración en los compartimentos del tejido extravascular incluyendo el hígado, riñón, piel, bazo, células sanguíneas y líquido sinovial (a las 4 horas de la administración muestra la misma concentración que en el plasma) [81]. En el contexto de AR, se ha observado que se distribuye en mayor concentración en las articulaciones inflamadas que en las normales, y muestra una relación sinovia vs plasma de 0.9:1.2. El 95% del MTX administrado es metabolizado 24 horas después de su administración [90].

Godfrey C y colaboradores (1998) realizaron estudios farmacocinéticos en pacientes adultos con AR que indican que el MTX muestra un pico máximo en plasma ($1 \mu\text{M}$) durante las primeras horas, que desciende a $0.1 \mu\text{M}$ a las 10 horas de la administración (Figura 8A) [91,92]. En el caso del tratamiento de osteosarcoma la farmacocinética muestra un pico máximo de $1500 \mu\text{M}$ entre las 4 a 6 horas de su administración, que desciende a $0.5 \mu\text{M}$ a las 72 horas (Figura 8B) [82,93].

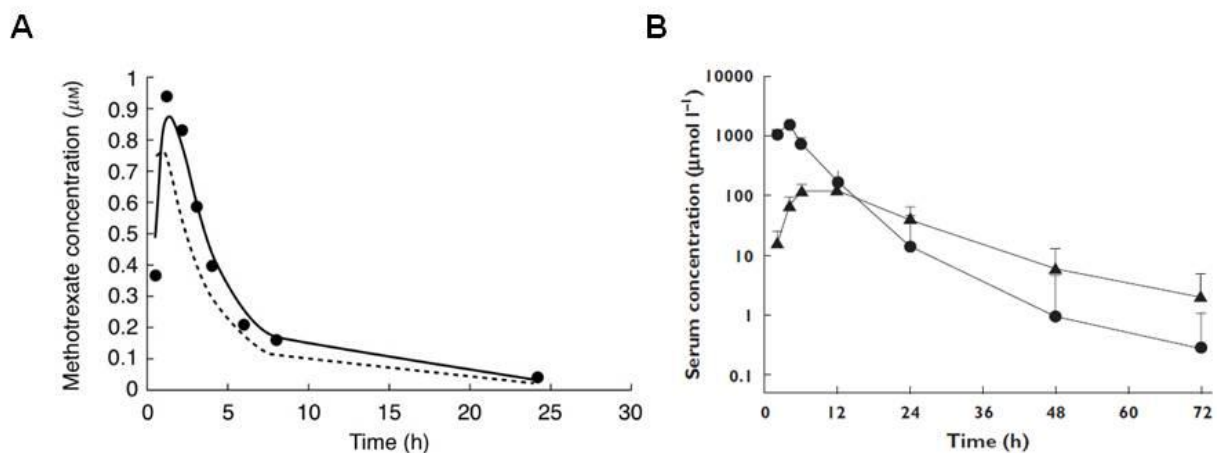


Figura 8. Farmacocinética de metotrexato en pacientes de artritis reumatoide (izquierda) y osteosarcoma (derecha) Modificadas de [91,92,93]. A. Modelo representativo predictivo (---) y observado (●) de la concentración de metotrexato (μM) en plasma respecto al tiempo (h). **B.** Concentración de metotrexato (●) y el 7-hidroximetotrexato (Δ) en suero respecto al tiempo en 65 pacientes de osteosarcoma.

El MTX es eliminado principalmente por filtración glomerular y por secreción en el túbulo proximal del riñón y, en pequeñas dosis, por vía biliar [81,88].

C.3. Metabolismo del MTX

El MTX entra en la célula por los transportadores de folato RFC y PCFT [88]. El MTX es un inhibidor competitivo de la dihidrofolato reductasa (DHFR) [60,94,95], la enzima responsable de la reducción de dihidrofolato (DHF) a tetrahydrofolato (THF) (Figura 5). Esta reacción es un paso clave en las reacciones dependientes del metabolismo de un solo carbono, e impide el reciclaje de 5,10-CH₂THF, lo que inhibe la síntesis de timidilato y la replicación y reparación del ADN. El MTX, al igual que el folato, se poliglutamila (MTX-Pgl) por la enzima folilpoliglutamato sintasa (FPGS). La poliglutamilación promueve la retención intracelular y aumenta el rango de dianas. MTX-Pgl es un potente inhibidor de la timidilato sintasa (TS, TYMS), directamente implicado en la síntesis de timidina; de la glicinamida ribonucleótido transformilasa (GART) y de la 5-aminimidazol 4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa (ATIC), enzimas implicadas en la síntesis de purinas *de novo*; y de la metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR) [94,95,96]. El MTX sale de la célula a través de transportadores de salida de folatos, miembros de los transportadores ABC "binding cassette" que incluyen ABCC1-5 y ABCG2, además de RFC que es bidireccional (Figura 9) [61].

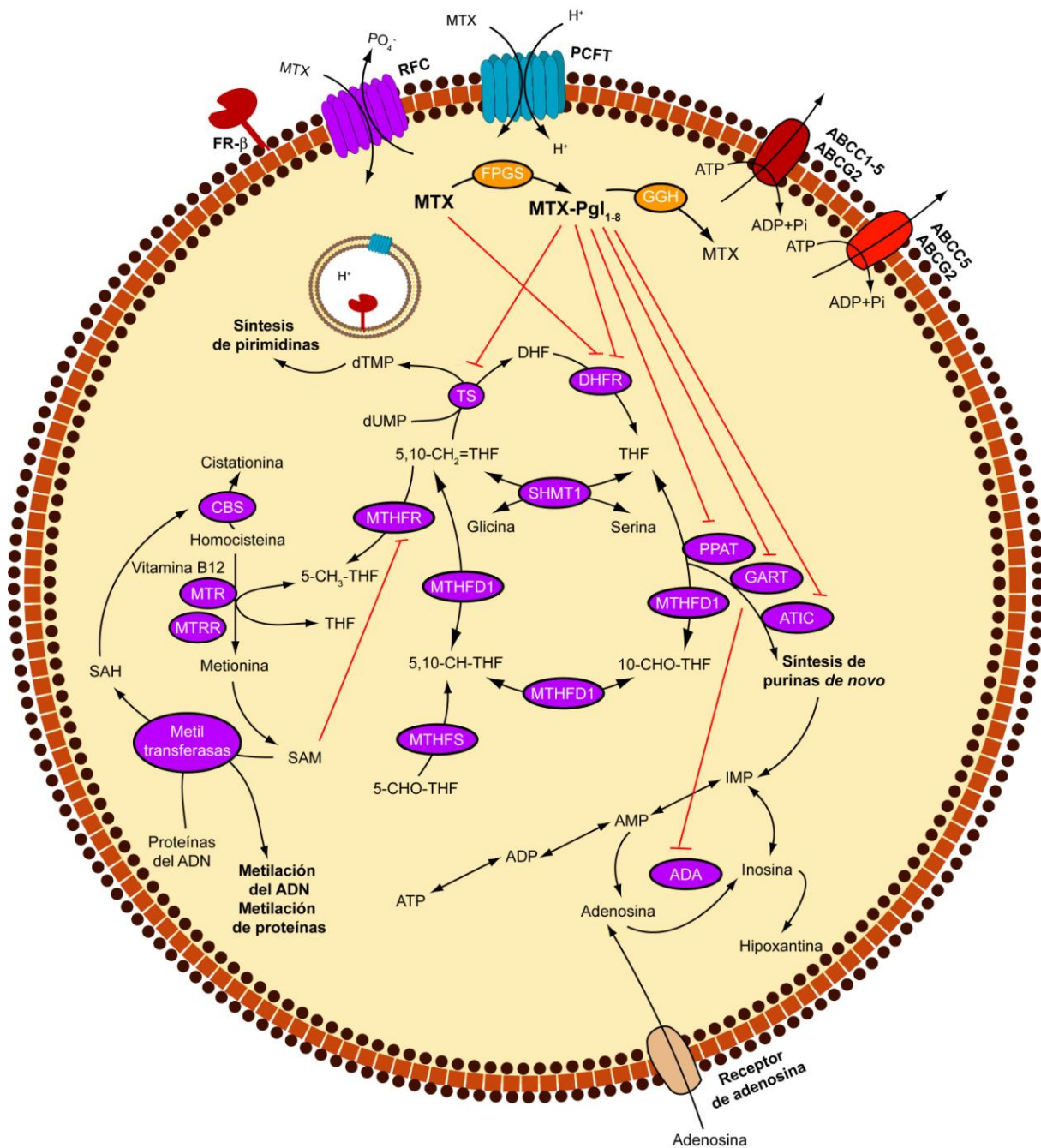


Figura 9. Metabolismo del MTX. MTX: Metotrexato; MTX-Pgl: Metotrexato poliglutamado; RFC: Transportador de folatos reducidos; PCFT: Transportador de folato acoplado a un protón; FR- β : Receptor de folato beta; FPGS: Foliilproliilglutamato sintasa; GGH: Gamma glutamil hidrolasa; TS: Timidilato Sintasa; dTMP: Desoxitimidina monofosfato; dUMP: Desoxiuridina monofosfato; DHF: Dihidrofolato; DHFR: Dihidrofolato reductasa; THF: Tetrahidrofolato; GART: glicinamida ribonucleótido transformilasa; ATIC: 5-Aminoimidazole-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa; MTHFR: Metiltetrahidrofolato reductasa; CBS: Cistationina beta sintasa; MTR: 5-metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferasa; MTRR: 5-metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferasa reductasa; MTHFS: 5,10-Meteniltetrahidrofolato sintetasa; MTHFD1: Metilenetetrahidrofolato deshidrogenasa 1; PPAT: fosforibosil pirofosfato amidotransferasa; SHMT1: Serina hidroximetiltransferasa 1; SAM: S-adenosil metionina; SAH: S-adenosil homocisteína; 10-CHO-THF: 10-formil tetrahidrofolato; ABCG2: Subfamilia de la proteína G unidad a ATP miembro 2; ATP: adenosina trifosfato; ADP: adenosina difosfato; AMP: adenosina monofosfato; IMP: iosina trifosfato; 5-CH₃-THF: 5-metil tetrahidrofolato; y 10-CHO-THF: 10-formil tetrahidrofolato.

El mecanismo de acción del MTX en cáncer implica la inhibición de la proliferación tumoral, mediante el bloqueo de la síntesis de purinas y pirimidinas en las células

que proliferan más activamente. En AR, con dosis más bajas y pauta de administración semanal, el MTX disminuye el dolor articular, el número de articulaciones inflamadas y mejora los parámetros analíticos indicadores de la enfermedad (DAS28, PCR, FR, entre otros) [97,98]. Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el MTX ejerce su acción anti-inflamatoria se desconoce. Se ha descrito que el MTX promueve la liberación de adenosina (por inhibición de ATIC) y la disminución de la acumulación de poliaminas, lo que podría contribuir a su acción anti-inflamatoria. El MTX inhibe la activación de células T, la expresión de citoquinas y moléculas de adhesión e induce apoptosis en células T. También se ha descrito que el MTX promueve la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) a través de la activación de Jun kinasa (JNK) [99]. Por otro lado, se desconocen las razones de la falta de respuesta clínica a MTX en algunos pacientes y su toxicidad en otros. Además, a excepción de los niveles de MTX-Pgl en eritrocitos, tampoco se conocen marcadores de respuesta a MTX.

D. Artritis reumatoide (AR)

D.1. Características de la AR

El término de AR se utilizó por primera vez en 1859 por Alfred Baring Garrod para distinguir poliartritis inflamatorias y artrosis poliarticulares de formas de artritis ya conocidas como la fiebre reumática o la gota. En 1922 se destinó únicamente para las poliartritis inflamatorias, y en 1941 fue aceptado por la Asociación Americana de Reumatología [97,100]. El término de artritis reumatoide proviene del griego: artritis se divide en la raíz artr- articulación y el sufijo iti- inflamación, y reumatoide dividido en la raíz rheuma/rheumatosis- flujo y del sufijo oid- semejante. La AR es la enfermedad inflamatoria más frecuente de las enfermedades crónicas, autoinmunes y sistémicas que afecta principalmente a múltiples articulaciones de manera simétrica, como articulaciones pequeñas de las manos y pies y articulaciones de carga como la rodilla, provocando la destrucción de su estructura, deformidad y, finalmente, una severa discapacidad funcional [98,100]. Se calcula que la prevalencia mundial de la AR está entre el 0.3 - 1.2%, y en España entre el 0.5 - 0.8% de la población adulta, diagnosticándose cada año 20.000 nuevos casos en España según la Sociedad

Española de Reumatología. La incidencia es superior en mujeres que en hombres (3:1), y el inicio de la enfermedad se produce en torno a los 40 - 60 años aunque puede manifestarse a cualquier edad.

El diagnóstico de la enfermedad se basa en criterios clínicos, radiológicos e inmunológicos establecidos por el Colegio de Reumatología Americana (ACR) y Liga Europea contra la Reumatología (EULAR) en 2010 [100] que permiten el diagnóstico tanto de pacientes con AR en estadios tempranos como en tardíos. Estos criterios se muestran en la Tabla 2.

Criterios ACR/EULAR 2010 para el diagnóstico de la artritis reumatoide		
Criterio	Variables	Puntos
Número de articulaciones afectadas	2 a 10 articulaciones grandes	1
	1 a 3 articulaciones pequeñas	2
	4 a 10 articulaciones pequeñas	3
	más de 10 articulaciones (al menos 1 pequeña)	5
Serología (FR o PCC)	positiva débil	2
	positiva fuerte (más de tres veces el valor normal)	3
Reactantes de fase aguda (VSG o PCR)	VSG o PCR elevadas	1
Duración de la artritis	más de 6 semanas	1
El diagnóstico de la artritis reumatoide exige la presencia de sinovitis de al menos una articulación, la ausencia de un diagnóstico alternativo que explique mejor la artritis y una puntuación de al menos 6 de los 10 puntos posibles.		

Tabla 2. Criterios de ACR/EULAR 2010 para diagnosticar a los pacientes de artritis reumatoide. FR: Factor reumatoide; PCC: antipéptido cíclico citrulinado; VSG: velocidad de sedimentación globular; PCR: Proteína C Reactiva [100].

La etiología de la AR es parcialmente conocida, multifactorial e incluye factores genéticos (como por ejemplo polimorfismos en el gen de HLA-DR), ambientales (tabaco), endocrinos (inicio de la menopausia o factores hormonales), derivados del sistema inmune (por la aparición de diversas moléculas autoinmunes como el factor reumatoide o anticuerpos anti-péptido cíclico citrulinado), agentes infecciosos (micoplasma, virus de Einstein Barr, citomegalovirus, parvovirus B19, virus de la rubeola y herpes) [101], entre otros. Actualmente no existe una hipótesis única que incluya todos los factores conocidos e integre todos los mecanismos patogénicos involucrados. Lo más probable es que ninguno de los factores sea el único causante de la enfermedad sino que la combinación de todos ellos determine el desarrollo de la AR y actúe también como moduladores de la enfermedad [102,103,104,105].

En la patogenia de la AR están implicadas la respuesta inmune innata y adaptativa. Existe una amplia gama de manifestaciones sistémicas de la enfermedad pero la alteración característica es una sinovitis inflamatoria que afecta principalmente a las articulaciones periféricas con distribución simétrica [105].

D.2. Membrana sinovial y líquido sinovial de articulaciones AR: características y composición celular

La articulación normal se compone de una cavidad sinovial en la que se distinguen el líquido sinovial, que lubrica la articulación para el movimiento, y la membrana sinovial, que tapiza toda la cavidad [106]. El líquido sinovial rellena la cavidad articular y consiste en un trasudado del plasma sanguíneo enriquecido en ácido hialurónico, que nutre y lubrica las superficies del cartílago manteniendo condiciones adherentes que permiten el movimiento. En condiciones normales, el líquido sinovial no presenta factores de coagulación, es viscoso, acelular y sin partículas. En el caso de pacientes con AR su líquido sinovial produce una infiltración de neutrófilos y en menor proporción linfocitos (aproximadamente el 10%) y sinoviocitos (macrófagos y fibroblastos) (Figura 10) [107,108].

La membrana sinovial se divide anatómica y funcionalmente en dos capas. La capa en contacto con la cavidad articular y en conexión con el líquido sinovial se denomina capa íntima o “lining” y por debajo se encuentra la capa subíntima o “sublining” (Figura 10) [107,108]. En condiciones normales, la capa íntima o “lining” consta de una fina capa de 2 ó 3 células de espesor y se compone de dos tipos celulares de morfología y linaje distintos: los sinoviocitos macrofágicos (macrófagos) y sinoviocitos fibroblásticos (fibroblastos). El “lining” se estructura por uniones celulares pero no constituye ni un epitelio ni un endotelio y carece de lámina basal, permitiendo así la comunicación con el “sublining” [109,110]. En los pacientes con AR se produce hiperplasia de los tipos celulares que componen el “lining”. Los macrófagos presentan un fenotipo común a los macrófagos residentes en otros tejidos conjuntivos y expresan los marcadores CD11b, CD68, CD14, CD16 y antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) [107]. Los sinoviocitos fibroblásticos son células mesenquimales con apariencia de fibroblastos con los que

comparten características fenotípicas como la expresión de colágeno de tipo IV y V, la vimentina y CD90. Además poseen el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi muy desarrollado debido a su gran capacidad secretora de proteínas de la matriz extracelular [108]. En condiciones normales, la capa subíntima o “sublining” está formado por tejido conectivo innervado y vascularizado por arteriolas y vesículas de mayor tamaño junto con los vasos linfáticos que drenan el exceso de fluido de la cavidad articular. En los pacientes con AR, el “sublining” sufre también un proceso de hiperplasia y angiogénesis que invade el tejido conectivo perdiendo su funcionalidad. Se infiltra de macrófagos, linfocitos y fibroblastos a través de los vasos de nueva formación [103,111].

Los tipos celulares residentes en la membrana sinovial son importantes en la patogenia. Los fibroblastos presentan un fenotipo activado [112], produciendo citoquinas (IL-6 [113], IL-15 [114], IL-18, IL-33 e IL-32 [115]) y factores que promueven la inflamación y destrucción del hueso (aumento en la expresión de RANKL) [116,117,118] y del cartílago adyacente debido a su capacidad de producir grandes cantidades de proteasas de la matriz extracelular del cartílago, entre las que destacan las metaloproteinasas (MMP1, MMP13 y MMP3 especialmente importantes en la AR [119]), catepsinas [120] y agrecanasas (ADAMTS-4 y 5) [109,121]. Los macrófagos producen potentes mediadores de la inflamación y destrucción del tejido, incluyendo citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α) [107,122], prostaglandinas (PGE₂) [123,124,125], metaloproteinasas (MMP9 y MMP12 [107]) y especies reactivas de oxígeno.

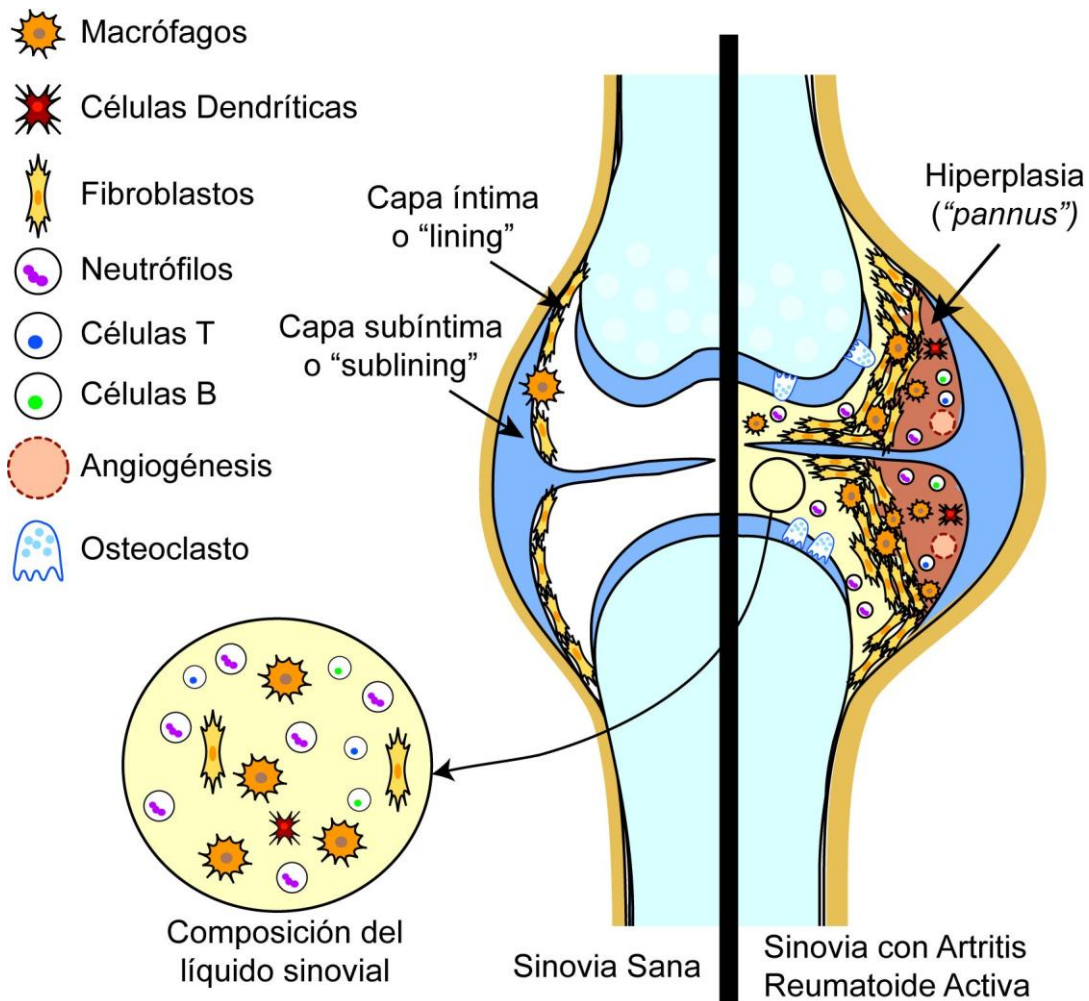


Figura 10. Representación esquemática de una articulación comparando la membrana sinovial sana (izquierda) y la membrana sinovial con artritis reumatoide activa (derecha). Se muestran los tipos celulares implicados en su patogenia de la artritis reumatoide. Izquierda, aumento de los tipos celulares que se encuentran en el líquido sinovial en condiciones inflamatorias.

D.3. Tratamiento de AR

Con el objetivo de lograr la mínima actividad clínica y la remisión de la enfermedad y de minimizar así el grado de afectación articular y de disminuir la discapacidad a largo plazo, se establece una línea de tratamiento a la que responde cada paciente individualmente [105]. No existe por tanto un tratamiento específico, ya que hasta la actualidad ningún tratamiento supone cura efectiva para la AR.

Los fármacos utilizados en el tratamiento de la AR se dividen en 3 clases:

- Anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), pilar importante para el tratamiento de la AR en los estadios iniciales de la inflamación. No modifican la patogenia

de la AR pero reduce el dolor y la inflamación articular, pudiendo mejorar la calidad de vida del paciente. Son principalmente el ibuprofeno y la aspirina.

- Corticosteroides, potentes supresores de la respuesta inflamatoria. Su uso es controvertido debido a la toxicidad y a sus efectos secundarios. Se suelen utilizar cuando los pacientes no responden a los AINES.
- Los fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad (FAMEs o DMARDs) pueden ser sintéticos o biológicos, capaces de retardar o parar la progresión de la AR. Los DMARD sintéticos son el metotrexato (MTX), leflunomida, sulfosalacina y las sales de oro. Los DMARD biológicos principales son anticuerpos anti- factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (infliximab, etanercept y adalimumab), anticuerpos anti- interleuquina 1 (IL-1) (anakinra), anticuerpos anti- receptor de IL-6 (tozilizumab) [126] y anticuerpos anti- CD20 (rituximab).

El avance en el conocimiento de las bases celulares y moleculares de la AR ha permitido que se hayan desarrollado los denominados DMARDs biológicos, compuestos capaces de actuar específicamente sobre las células o mediadores implicados en la patogenia de la AR [101,103,111]. Se utilizan cuando los pacientes responden inadecuadamente o tienen efectos secundarios nocivos a los DMARDs sintéticos. Los DMARDs biológicos están diseñados para bloquear la acción de citoquinas inflamatorias, principalmente TNF- α , IL-6 e IL1, para impedir la co-estimulación de las células T o la actividad de las células B [127].

D.4. Los macrófagos en la AR

Numerosos datos experimentales indican que los macrófagos juegan un papel en la patogenia de la AR. El incremento del número de macrófagos en el tejido sinovial correlaciona con el grado de erosión de las articulaciones y contribuye a la hiperplasia de la capa íntima o “lining” [128,129]. Además el número de macrófagos CD68⁺ del “sublining” difiere entre efectividad e inefectividad del tratamiento

[108,130], indicando que los macrófagos del “sublining” constituyen un biomarcador de la respuesta al tratamiento en pacientes con AR.

La importancia del GM-CSF y M-CSF en la artritis inflamatoria se ilustra por el hecho de que la deficiencia de GM-CSF en ratones y los ratones $Csf1^{op/op}$ son resistentes a la artritis inducida por colágeno [131,132], y que la administración de M-CSF exacerba la artritis [133]. Además el bloqueo de GM-CSF o M-CSF reduce la severidad de la artritis inducida por colágeno [133,134] y en ambos CSFs se han detectado en niveles elevados en el líquido y el tejido sinovial de pacientes con AR [135]. Como la depleción de GM-CSF y M-CSF es efectiva y disminuye la severidad de la enfermedad, en la actualidad están en curso diferentes ensayos clínicos dirigidos a reducir el GM-CSF o el M-CSF en AR [135].

Objetivos

Los objetivos de esta Tesis Doctoral son:

- Determinar la expresión y actividad funcional de los transportadores de folato (FR- β , RFC y PCFT) en la polarización de los macrófagos humanos.
- Estudiar el efecto del anti-folato metotrexato en la polarización de los macrófagos humanos.
- Determinar el estado de polarización de los macrófagos humanos en líquido y membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide.



Material y Métodos

Aislamiento de monocitos humanos y diferenciación de los macrófagos

Se utilizaron “buffy coats” de sangre periférica de donantes sanos obtenidos del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. El concentrado leucocitario fue sometido a un gradiente de densidad con Ficoll (Lymphoprep) y se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). El aislamiento de los monocitos de PBMCs se realizó mediante selección positiva con anticuerpos anti-CD14 acoplados a bolas magnéticas (CD14 Microbeads human, Miltenyi Biotec). La pureza y viabilidad se analizó mediante citometría de flujo.

Los monocitos se cultivaron a una concentración de 0.5×10^6 células/ml en placas de 12 pocillos (Costar) durante 7 días en medio RPMI 1640 (RPMI standard, que contiene 1 mg/L de ácido fólico, Gibco Life Technologies) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF, Sigma Aldrich) a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. La diferenciación de monocito a macrófagos se realizó en presencia de GM-CSF (1000 U/ml, Immunotools) o en presencia de M-CSF (10 ng/ml, ImmunoTools) que genera macrófagos con fenotipo pro-inflamatorio (MØ-GM) o anti-inflamatorio (MØ-M), respectivamente. Las citoquinas se añadieron cada dos días.

Aislamiento de las células CD14⁺ de líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR)

Las muestras del líquido sinovial de pacientes de AR se obtuvieron de tres hospitales madrileños: Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM), Hospital Universitario La Princesa (HULP) y Hospital Universitario 12 de Octubre (HU12O). Los pacientes de AR firmaron el consentimiento informado, y el estudio fue aprobado por el Comité Ético del HGUGM, HULP y HU12O.

Las muestras de líquido sinovial se obtuvieron de 44 pacientes con diferentes características demográficas y estado terapéutico de AR. A estos pacientes se les realizó una artrocentesis terapéutica de rodilla, técnica que consiste en la punción y

evacuación del líquido sinovial. Estas muestras se sometieron a análisis citológico, presentando un alto recuento celular, lo que confirmó en todos los casos AR activa.

De 10 muestras de líquido sinovial de pacientes con AR activa se aislaron las células CD14⁺. El líquido sinovial se diluyó en PBS (1:1), previo a la centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll. Las células mononucleares se aislaron y caracterizaron por citometría de flujo. Si el porcentaje de células CD14⁺ era mayor a un 75%, las células se aislaron con anticuerpos anti-CD14 acoplados a bolas magnéticas. La pureza y viabilidad de las células CD14⁺ aisladas se analizó mediante citometría de flujo. Las células recién aisladas se lisaron en tampón de lisis RLT (Qiagen) para la obtención de ADN, ARN y proteína.

Se cultivan las células a una concentración de 0.5×10^6 células/ml para los distintos tratamientos.

Aislamiento de las células CD14⁺ de líquidos ascíticos

La ascitis es la acumulación de líquido en la cavidad abdominal, en concreto, entre el peritoneo que recubre los órganos abdominales o peritoneo visceral y el peritoneo que cubre la pared abdominal o peritoneo parietal. Son varias etiologías las que pueden producir ascitis entre las que se encuentran el cáncer, que constituye el 10% de las causas de ascitis y se denomina ascitis maligna. Este tipo de ascitis suele contener una importante cantidad de células mononucleares.

El líquido ascítico de pacientes con cáncer gástrico, melanoma, cáncer de mama y cáncer de ovario se obtuvieron del HGUGM. Los pacientes recibieron el consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el Comité Ético del HGUGM.

El líquido ascítico tumoral se centrifugó por gradiente de densidad con Ficoll. Las células se aislaron con anticuerpos anti-CD14 acoplados a bolas magnéticas. La pureza, viabilidad y caracterización de las células CD14⁺ aisladas se analizó por citometría de flujo. Las células recién aisladas se lisaron en tampón de lisis RLT (Qiagen) para la obtención de ADN, ARN y proteína.

Cultivos celulares

El cultivo primario de fibroblastos se estableció a partir del crecimiento de un explante de donantes sanos con medio RPMI 1640 (RPMI standard, Gibco Life Technologies) con una mezcla de antibióticos que contenía 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina (obtenidos de la farmacia del HGUGM) y con un 10% de SBF (Sigma-Aldrich). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmosfera controlada con 5% de CO₂.

Los cultivos de células HEK 293T (línea celular humana de riñón de origen epitelial) se utilizaron para los experimentos de análisis de expresión génica. Se mantuvieron con medio RPMI 1640 (RPMI standard, Gibco Life Technologies) con un 10% de SBF (Sigma-Aldrich) y las mismas condiciones de cultivo que los fibroblastos.

Reactivos

El LPS (Ultra Pure E. coli 0111:B4 strain-TLR4) se utilizó a una concentración de 10 ng/ml, y se añadió durante 24 horas a MØ-GM o MØ-M. La activina A recombinante humana (Miltenyi Biotec) se utilizó a una concentración de 10 ng/ml, y se añadió junto con M-CSF durante el periodo de diferenciación. El anticuerpo bloqueante anti-activina A (100 ng/ml, R&D System) o un inhibidor de ALK4, ALK5 y ALK7 (SB431542, 10 µM, Sigma Aldrich) se añadió cada 24 horas durante toda la diferenciación a MØ-GM. El anticuerpo bloqueante anti-TGF-β1 (100 ng/ml, R&D System) se añadió cada 24 horas durante toda la diferenciación a MØ-GM. La interleucina 4 (IL-4, 1000 U/ml, R&D Systems) y el interferon γ (INF-γ, 500 U/ml, R&D System) se añadieron al final de la diferenciación de los macrófagos durante 48 horas.

El metotrexato (MTX, 5 nM a 5 µM, obtenido de la farmacia del HGUGM Pfizer, solución inyectable 500 mg/ 20 ml), pemetrexed (PMX, 50 nM, obtenido de la farmacia del Instituto de Investigación Biomédica de Gerona, Alimta Lilly, polvo para concentrado para solución por perfusión, 500 mg), raltitrexed monohidratado (ZD,

ZD1694, 50 nM, Sigma Aldrich), ácido folínico (AF, 100 µM, Sigma-Aldrich), timidina (dT, 10 µM, Sigma-Aldrich), pifitrina-α (PFT, 25 - 50 µM, Sigma-Aldrich), y la nutlina 3 (10 µM, Sigma-Aldrich) se añadieron una sola vez a los monocitos antes de añadir las citoquinas de diferenciación (GM-CSF o M-CSF) o a MØ-GM y MØ-M durante 24 ó 48 horas.

Citometría de Flujo

El análisis fenotípico se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia directa. Todas las incubaciones se realizaron en presencia de 50 µg/ml de IgG humana para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos a través de sus fracciones Fc. Como controles negativos se utilizaron anticuerpos isotipo específicos acoplados a los distintos fluoróforos o anticuerpos contra antígenos no expresados por la célula (P3X63, cedido por el Dr. Francisco Sánchez Madrid, HULP). Los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 1. La compensación de los valores de fluorescencia se llevó a cabo mediante el programa CellQuest (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) en el FACScan (Becton Dickinson) y utilizando amplificadores logarítmicos. El análisis de los resultados de la citometría se analizó mediante el programa FlowJo (versión 7.6.5).

Para las detección de proteínas intracelulares se siguió el protocolo comercial Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience). Posteriormente, se realizó el mismo protocolo que el indicado para marcaje extracelular.

Anticuerpos específicos de citometría de flujo				
Nombre	Clon	Isotipo	Fluorocromo	Casa comercial
CD14	MØP9	IgG2bk	FITC	BD pharmigen
CD163	Ber-Mac3	IgG1	FITC	MBL
CD163	RM3/1	IgG1	Alexa Fluor 647	Biologend
CD209	DCN46	IgG2bk	FITC	BD pharmigen
CD36	CB38	IgMk	FITC	BD pharmigen
CD40	5C3	IgGk	PE	BD pharmigen
CD50 (ICAM3)	TÜ41	IgG2bk	FITC	BD pharmigen
CD64	10.1	IgGk	FITC	BD pharmigen
CD80	L307.4	IgG1k	FITC	BD pharmigen

CD83	HB15e	IgG1k	PE	BD pharmigen
CD86	2331 (FUN1)	IgG1k	PE	BD pharmigen
Control γ1/γ2a	X40/X39	IgG1/ IgG2a	FITC/ PE	BD pharmigen
HLA-DR	L243	IgG2a	APC	BD pharmigen
P3X63	Cedido por el Dr. Francisco Sánchez Madrid			

Tabla 3. Anticuerpos específicos utilizados en citometría de flujo

Viabilidad celular

Para determinar la viabilidad celular se utilizaron los dos “kits” comerciales Cell Viability Solution (BD Via-Probe) y Annexin V-FITC (Miltenyi Biotec). En ambos se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Retrotranscripción y PCR cuantitativa: qRT-PCR

El aislamiento del ARN se llevó a cabo con el “kit” NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel), realizando el paso de la digestión con ADNasa y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para las muestras de pacientes aislamos y purificamos ARN, ADN y proteína con el “kit” AllPrep® DNA/RNA/Protein MiniKit (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Las concentración y pureza de ADN y ARN se cuantificó en el NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, ThermoScientific).

El ADN complementario (ADNc) se sintetizó con el “kit” High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los niveles de ARNm se cuantificaron utilizando oligonucleótidos y sondas del sistema UPL (Universal Probe Library, Roche Life Science) en el aparato LightCycler 480 (Roche Life Science). La determinación se realizó por triplicado en placas de 384 pocillos (Roche Life Science) y se normalizó con respecto a los niveles de expresión de *TBP* (Tata binding protein, NM_003194, Roche 101145). Las secuencias de oligonucleótidos de los genes se muestran en la tabla 4.

Gen	Fw	Rv	Sonda	Gene Bank
AREG	Tgatcctcacagctgttgct	tccattctctgtcgaagttct	#73	NM_001657.2
ATIC	gagggactgcaaaagctctc	ggaaatcccgtcaactcaga	#89	NM_004044
CCL17	cggtgtaccagacatctgagg	Cctgccctgcacagtaca	#01	NM_002987.2
CCL2	Agtctctgccgccttct	Gtgactggggcattgattg	#40	NM_002982.3
CCL20	Gctgctttgatgtcagtgtc	Gcagtcaaagtgcttgctg	#39	NM_004591.2
CCL4	Ctctccagcgtctcagc	accacaaagttgcgaggaag	#40	NM_002984.2
CCR2	Cccatcatctatgccttctg	ggcaatcctacagccaagag	#7	NM_001123041.2
CD32	Tgtgcatctgactgtgctttc	Cacctcagcagcagtggtt	#79	NM_004001
CD36	tggaacagaggctgacaactt	ttgatttgatagatatgggatgc	#76	NM_001001547.2
CD69	Caagttcctgtcctgtgtgc	gagaatgtgtattggcctgga	#9	NM_001781.2
CSF1	gaactgccagtgtagagggaat	gctggtcagacaacatctgg	#19	NM_172210.2
DHFR	Tcccagaacatgggcatc	tggtcattctctggaatatctga	#37	NM_000791
EGLN3	atcgacaggctgtctctcta	gatagcaagccaccattgc	#61	NM_022073.3
FOLR2	gagagaggccaactcagacac	Ccagaccatgtctttctgtcc	#03	NM_001113535.1
FPGS	ccctgccagttgactatgc	ctgtgaagttctgttgctctgc	#29	NM_004957
GART	tccttgagaaactggggta	gctgcaaccatgagaagacc	#65	NM_000819
GDF15	ccggatactcacgccaga	agagatacgcaggtgcaggt	#28	NM_004864.2
GGH	aggctggatcttacagagaaagac	ctgagcgtctgaggcaaca	#65	NM_003878
IGF1	tgtggagacaggggctttta	Atccacgatgcctgtctga	#67	NM_001111284.1
IL10	gtggagcaggtgaagaatgc	tactcatggtttgatagatgc	#125	NM_000572.2
IL1A	ggttgagttaagccaatcca	Tgctgacctaggcttgatga	#6	NM_000575.3
IL24	cccagaaactgtgggaagc	Gggcactcgtgatgtatcc	#26	NM_001185156.1
IL6	gatgagtacaaaagtcctgatcca	Ctgcagccactggttctgt	Real Time Ready	NM_000600.3
INHBA	ctcggagatcatcacgtttg	ccttggaatctcgaagtc	#72	NM_002192.2
LIF	tgccaatgccctctttatc	Gtccaggttgtggggaac	#26	NM_002309.3
MET	aaatgtgcatgaagcaggaa	tctctgaattagagcagattga	#59	NM_000245.2
MMP1	gctaacctttgatgtataactacga	Ttgtgcgatgtagaatctg	#7	NM_002421.3
MMP10	gcaaaagaggaggactcaa	tcacatcctttcagaggtgta	#61	NM_002425.2
MMP12	tgtcactaccgtggaaataag	aacactggctttgtctctcag	#41	NM_002426.4
MTHFR	ccgggttaattaccacttg	Attcggctgcagttcagg	#9	NM_005957
PU.1	ccactggaggtgtctgacg	ctggtacagcggatcttct	#1	U34046.1
RSAD2	cacgtaaactagatcaggaacaa	tcaacaaactgatgggatatt	#55	NM_080657.4
SERPIN2	catggagcatctctgcccac	Actgcattggctcccactt	#01	NM_002575.2
SLC19A1	cagttctctgtgccatc	ggcaaagaacgtgttgacc	#37	NM_194255.2
SLC2A1	ggttggtccatactcatgacc	cagataggacatccaggttagc	#67	NM_006516.2
SLC40A1	caaagggttgattgattgtg	Cctctgattgtgcatc	#2	NM_014585.5
SLC46A1	catccggctgttctgat	Ctgctggaactcagagtgga	#89	NM_080669.5
TBP	cggctgttaactcgcctc	cacacgccaagaacagtgga	#3	NM_003194
THSB1	caatgccacagttcctgatg	Tggagaccagccatcgtc	#56	NM_003246
TNFA	cagcctctctcctctctgat	gccagagggctgattagaga	#29	NM_000594.3
TYMS	cccagttatggcttcagt	gcagttggcaactcctgt	#43	NM_001071

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en qRT-PCR.

Los niveles de ARNm de genes específicos de polarización de macrófagos se cuantificaron mediante “microfluidic gene cards”. Las “microfluidic gene cards” son placas de 384 pocillos que contienen incluidos los oligonucleótidos y sondas para

genes de interés y genes control ya plaqueados en los pocillos (Roche Life Science). La determinación de los niveles de ARNm se realizó por triplicado, y los niveles medios de expresión se normalizaron a los tres genes de referencia (*TBP*, *HPRT1*, *RPLP0*). Los resultados se cuantificaron utilizando el método de la doble derivada de Ct ($\Delta\Delta Ct$).

ELISA

La concentración de las citoquinas Activina A (Human/Mouse/Rat Activin A Quantikine ELISA, R&D System), TGF- β (Quantikine ELISA, R&D System), M-CSF (DuoSet ELISA, R&D System), LIF (Platinum ELISA, eBioscience), IL-23 (Platinum ELISA, eBioscience), GM-CSF (ELISA Max Deluxe, BioLegend), IL-10 (ELISA Max Deluxe, BioLegend), TNF- α (ELISA Max Deluxe, BioLegend), IL-6 (ImmunoTools), la quimioquina CCL20/MIP-3 α (DuoSet ELISA, R&D System) y la metaloproteasa MMP12 (Antibodies on-line) en los sobrenadantes celulares, en el líquido sinovial y en el líquido ascítico se determinó mediante ELISA comercial, siguiendo las recomendaciones de cada fabricante.

Inmunofluorescencia

Células

Se tapizaron cristales de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos con Poli-L-Lisina (Poly-L-Lisine 0.01% Solution Endotoxin free, Sigma Aldrich), fibronectina (fibronectina humana de plasma, Sigma Aldrich) o colágeno (Purified Bovin Collagen Solution, Nutragene Advanced Matriz) durante 30 minutos a 37°C. Se incubaron 10.000 células/pocillo, se fijaron con 4% formaldehído (Solución de formaldehído, 37%, Sigma Aldrich) en PBS durante 5 minutos a 37°C.

La inmunofluorescencia se realizó en cámara húmeda. Para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos a través de sus fracciones Fc, se bloquearon las células con inmunoglobulinas humanas (10 $\mu g/ml$) durante 10 minutos a 37°C, y posteriormente se incubó con las diluciones correspondientes de anticuerpos

primarios 1 hora a 37°C. A continuación se lavó 3x en PBS, se incubaron los anticuerpos secundarios durante 45 minutos, se volvió a lavar en PBS (3x) y los núcleos se tiñeron con DAPI (CalbioChem) durante 10 minutos. Las muestras se montaron en medio de montaje para fluorescencia de Dako (Dako Cytomation).

En el caso de marcaje intracelular las células se permeabilizaron con 0.1% de saponina (Sigma) durante 10 minutos a 37°C. En el caso de marcaje nuclear las células se permeabilizaron con 0.2% de Tritón X100 (Sigma) durante 3 minutos a temperatura ambiente.

Tejidos

Las muestras de tejido humano se obtuvieron de pacientes sometidos a un tratamiento quirúrgico en el HGUGM y en el Hospital Clinic de Barcelona (colaboración con Dra. Azucena Salas). Los tejidos de colon control se obtuvieron de las zonas más alejadas de las biopsias de colitis ulcerosa supuesta como zona sana. Así mismo se consiguieron los tejidos de colitis ulcerosa. Los tejidos de placenta se obtuvieron de partos a término de 2 mujeres de la maternidad del HGUGM. Las muestras de tejido hepático se obtuvieron de sobrantes tisulares utilizados para trasplantes hepáticos y procedentes de 2 donantes sanos de HGUGM.

Las muestras de tejido sinovial se obtuvieron de sinovectomías quirúrgicas abiertas de 10 pacientes con AR del HGUGM, HULP y HU12O con un avance progresivo de su enfermedad, que requerían reemplazamiento articular mediante prótesis de rodilla. Las muestras de tejido sinovial control se obtuvieron mediante sinovectomía artroscópica de 6 pacientes con problemas ortopédicos menores y de naturaleza leve, con pruebas de imagen (resonancia magnética), estudio artroscópico y estudio histológico normales.

Los tejidos se orientaron, se congelaron en OCT (Compound Tissue-Tek, Sakura) y se almacenaron en congelación a -80°C. Los tejidos se cortaron en el criostato en secciones de 4 µm y se fijaron con acetona (99.5%, Pancreac) a -20°C.

Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia					
Nombre	Clon	Isotipo	Especie	Casa comercial	Referencia
Suero de ratón	-	-	-	Jackson InmunoReseach	015-000-001
CD90-FITC	5E10	IgG1	Ratón	BD Pharmigen	555595
FAP	F11-24	IgG1	Humano	Santa Cruz Biotechnology	sc-65398
PHD3	Policlonal	IgG	Conejo	Abcam	ab30782
CD163	Ber-Mac3	IgG1	Ratón	MBL	K0147-3
CD31	Lia2/5.1	IgG1	Ratón	Cedido por el Dr. Francisco Sánchez Madrid	
CCR6 / CD196	53103.111	IgG2	Ratón	R&D	53103.111
CCR2	Policlonal	IgG	Cabra	Abcam	ab1668
CCL20 / MIP3alpha	Policlonal	IgG	Conejo	Abcam	ab9829
CD68	PG-M1	IgG3	Ratón	Dako Cytomation	M0876
TNFalpha	Policlonal	IgG	Conejo	Abcam	ab6671
TNFalpha	52B83	IgG1	Ratón	Abcam	ab1793
PHD3	EG18e/d5	IgG1	Ratón	Abcam	ab82886
PCFT / HCP1	Policlonal	IgG	Conejo	Abcam	ab25134
INHBIN beta A	Policlonal	IgG	Conejo	Abcam	ab56057
MMP12	Policlonal	IgG	Conejo	Abcam	ab66157
p53	DO-1	IgG2a	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-126
RFC /SLC19A1	Policlonal	IgG	Conejo	Abcam	ab62302
Tetrahidrofolato	8/33	IgG1	Ratón	Abcam	ab20475
Timidilato sintasa	EPR4545	IgG	Conejo	Abcam	ab108995

Tabla 5. Anticuerpos primarios utilizados en inmunofluorescencia.

Anticuerpos secundarios				
Nombre	Isotipo	Fluoroforo	Concentracion	Casa comercial
Donkey Anti-Rabbit	IgG (H+L)	Cy3	0,75 mg/ml	Jackson InmunoResearch
Goat Anti-Mouse	IgG (H+L)	FITC	0,75 mg/ml	Jackson InmunoResearch
Donkey Anti-Mouse	IgG (H+L)	Alexa Fluor 488	0,75 mg/ml	Jackson InmunoResearch
Donkey Anti-Rabbit	IgG (H+L)	FITC	0,75 mg/ml	Jackson InmunoResearch
Donkey Anti-Rabbit	IgG (H+L)	Cy5	0,75 mg/ml	Jackson InmunoResearch
Donkey Anti-Mouse	IgG (H+L)	Cy5	0,75 mg/ml	Jackson InmunoResearch
Donkey Anti-Goat	IgG (H+L)	Cy2	0,75 mg/ml	Jackson InmunoResearch
Donkey Anti-Rabbit	IgG (H+L)	Alexa Fluor 647	0,75 mg/ml	Jackson InmunoResearch
Donkey Anti-Mouse	IgG (H+L)	Cy3	0,75 mg/ml	Jackson InmunoResearch
Donkey Anti-Goat	IgG (H+L)	FITC	0,75 mg/ml	Jackson InmunoResearch

Tabla 6. Anticuerpos secundarios utilizados en inmunofluorescencia.

Experimentos de transporte de ácido fólico, 5-MTHF y MTX

La actividad de transporte de ácido fólico, 5-MTHF y MTX se realizó con los compuestos marcados con tritio: 3',5',7,9-[³H] ácido fólico (19.4 Ci/mmol, Campro Scientific GmbH), 3',5',7,9-[³H] (6S)- 5 metiltetrahidrofolato (16.4 Ci/mmol, Campro

Scientific GmbH) y 3',5',7-³H(N)-metotrexato sal disódico (25 Ci/mmol, Campro Scientific GmbH).

Todos ellos se utilizaron a una concentración de 50 nM. Los experimentos de transporte se realizaron en "buffer" Krebs (123 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 0.84 mM CaCl₂, 5 mM D-glucosa, 10 mM HEPES, y 10mM MES) a un pH 5.5 ó 7.4 (ajustado con NaOH). La actividad del transportador de folato acoplado a protones (PCFT) se determinó en el "buffer" Krebs a pH 5.5, condiciones óptimas de funcionalidad de este transportador. La actividad de RFC y FR-β se determinó en el "buffer" Krebs a pH 7.4. Los macrófagos MØ-GM o MØ-M (3x10⁵ células/eppendorf) se lavaron dos veces con 1 ml de "buffer" Krebs (pH 7.4, precalentado a 37°C) y se resuspendieron en 300 µl de "buffer" Krebs (pH 7.4 ó pH 5.5) por condición. Inmediatamente después se añadió el ácido fólico, 5-MTHF o MTX radiactivo y las células se incubaron en un baño a 37°C durante diferentes tiempos. El transporte se detuvo cambiando la temperatura (4°C, incubación en hielo). Las células se lavaron en "buffer" Krebs (pH 7.4, 4°C) para eliminar el (anti)-folato tritado no incorporado a la célula y las células se lisaron con 1% SDS y 0.2 N NaOH. Se incluyeron controles a 4°C para diferenciar entre unión a receptores y transporte intracelular. La determinación de la radiactividad se realizó en el contador de centelleo con los lisado celulares en presencia de líquido de centelleo (1:4).

La concentración de proteína se determinó mediante el DC *protein assay* (BioRad, Hercules, CA, USA). Para determinar el transporte celular de (anti)-folatos se calculó la relación pmol/mg proteína a diferentes tiempos.

“Microarrays” de expresión génica

Se aisló ARN de tres donantes independientes de monocitos expuestos o no a MTX (5 µM) y posteriormente diferenciados a macrófagos MØ-GM ó MØ-M durante 7 días. El ARN se cuantificó con el NanoDrop y su calidad se determinó en el Bioanalyzer (Agilent 2100 Technologies, Parque Científico de la Universidad Complutense de Madrid). Los “microarrays” se procesaron en la Unidad de Genómica del CNIC.

Se marcaron 200 ng de ARN con el “kit Low Input Quick Amp Labeling” (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). Se utilizó el cebador del promotor oligodT del fago T7 para retrotranscribir los ARNs, y se marcaron con el (Cy3)-labeled CTP. Los ARN marcados se hibridaron en *Human v2 4x44K array* (G4845A, Agilent Technologies). Los datos obtenidos se procesaron en el GeneSpring v12 (Agilent). Los valores crudos (en logaritmo en base 2) se limitaron a 1 y se normalizaron mediante cuantiles. Para el análisis de la expresión génica diferencial se utilizó el programa “Limma” de Bioconductor. Los valores de p se corrigieron por el método de Benjamini Hochsberg [136]. Se realizó un análisis funcional utilizando el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (www.ingenuity.com). Los arrays se han depositado en la base de datos “Gene Expression Omnibus” con el número de acceso GSE64531.

Silenciamiento de ARN (siARN)

Se utilizaron tres siARN distintos para silenciar PCFT (silencer select s41449, s223224 y s223225), dos siARN distintos para silenciar la timidilato sintasa (TS) (silencer select s14538, s14539) y un control negativo siARN (silencer select Negative Control #1) (Ambion, Life Technologies). Los macrófagos (7.5×10^5 células) se transfectaron con siARN (100 nM) y el reactivo Hiperfect (QIAGEN). 48 horas después de la transfección se comprobaron los niveles de expresión del ARNm por qRT-PCR. En el caso del silenciamiento de PCFT, 48 horas después de la transfección se determinó la capacidad de transporte del 5-MTHF a pH 5.5. En el caso del silenciamiento de TS, 24 horas después de la transfección las células se trataron con MTX, PMX ó PFT, y 48 horas más tarde (72 horas desde la transfección), se midió la respuesta a MTX por qRT-PCR.

“Western Blot”

Los monocitos o macrófagos se lisaron en “buffer” RIPA (150 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8, 1% NP-40, 2 mM Pefabloc, 2 mg/ml aprotinina/antipaina/leupeptina/pepstatina, 10 mM NaF, y 1 mM Na_3VO_4). Entre 10 y

50 microgramos del lisado celular se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas se incubaron con los diferentes anticuerpos (Tabla 7 y 8) y las bandas se visualizaron mediante quimioluminiscencia con el “kit” de Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific).

Anticuerpos primarios “Western blot”				
	Clon	Especie	Casa Comercial	Referencia
PHD3	Policlonal	Conejo	Abcam	ab30782
Smad2 fosforilado (pSmad2-Ser465/467)	A5S	Conejo	Millipore	04-953
Timidilato sintasa (TS)	Policlonal	Conejo	abcam	ab108995
GAPDH	6C5	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	sc-32233
Vinculina	hVIN-1	Ratón	Sigma -Aldrich	V9131

Tabla 7. Anticuerpos primarios utilizados en “Western blot”.

Anticuerpos secundarios para “Western blot”					
	Clon	Especie	Uso	Casa Comercial	Referencia
Anti - Ratón inmunoglobulinas	Policlonal	Conejo	1/2000	DAKO	P0260
Anti - Conejo inmunoglobulinas	RG-16	Ratón	1/200000	Sigma-Aldrich	A2074


Tabla 8. Anticuerpos secundarios utilizados en “Western blot”.

Clonación de timidilato sintasa (TS)

El ADNc de TS se amplificó de MØ-GM utilizando los oligonucleótidos 5'-CTCGAGCCGCGCCGCGCCATGCCTGTG-3' y 5'-CCCCAAGCTTGAAAGCACCCCTAACAGCCATT-3'. El fragmento resultante se digirió con las enzimas de restricción HindIII/XhoI y se clonó en el plásmido pcDNA3.1 (-). Los clones positivos se secuenciaron. Para sobreexpresar TS, células HEK 293T se transfectaron transitoriamente con Superfect (Qiagen, Hilden, Alemania).

Microscopía confocal multicolor

La captura de imágenes se realizó mediante el microscopio confocal Leica (SP2, Leica Microsystem) con los objetivos de 20xPL-APO NA0.7 y 63xPL-APO NA1.3 (con glicerol). Todo el procesamiento de imágenes fue analizado con el software MacBiophotonics Image J (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of



Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014), con el que se cuantificó la media de intensidad de fluorescencia (ROI, unidad arbitraria). Se analizaron al menos tres muestras de manera independiente para cada tipo de tejido, y se cuantificaron todos los macrófagos presentes en tres campos elegidos al azar. Después de restar el fondo, los datos se representaron usando el software Graphpad Prism 5.0 (San Diego California USA, www.graphpad.com).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó usando la t-student, tomando como p valor significativo 0'05 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; y *** $p < 0.001$). Las correlaciones entre las diferentes variables numéricas fueron analizadas usando el test de Spearman.



Resultados

Características fenotípicas y funcionales de los MØ-GM y MØ-M *in vitro* e *in vivo*

Como se comentó en la introducción, los macrófagos (MØ) son células de enorme plasticidad y exhiben características funcionales contexto-dependientes [137]. El sistema de diferenciación de macrófagos humanos, derivados de monocitos de sangre periférica en presencia de GM-CSF (MØ-GM) o M-CSF (MØ-M) genera macrófagos con características fenotípicas y funcionales diferentes que se detallan a continuación.

Se analizó la expresión de los receptores “scavenger” CD163 (receptor de hemoglobina/haptoglobina), CD68 y CD36 (receptor de trombospondina), los marcadores mieloides CD14 (antígeno de diferenciación de monocito), HLA-DR (complejo mayor de histocompatibilidad clase II), moléculas co-estimuladoras CD40, CD86 y CD80, CD206 (receptor de manosa), CD83, CD209 (DC-SIGN), CD50 (ICAM-3) y FR- β (receptor de folato β) mediante citometría de flujo en 6 donantes independientes de MØ-GM y MØ-M. Los MØ-M expresaron niveles más altos de CD163, CD14, CD86, CD36, HLA-DR y CD68 que los MØ-GM [43,138,139,140] (Figura 11A). Además, tal y como estaba descrito, la expresión de CD209 [141] y FR- β [47] se detectó específicamente en MØ-M y no en MØ-GM. Por otra parte, la expresión de CD40, CD206 [140] y CD50 fue mayor en MØ-GM que MØ-M. Ninguna población celular expresó CD80 [139] ni CD83, marcador característico de células dendríticas [142] (Figura 11A).

En respuesta al ligando de TLR4 LPS y de acuerdo con los datos descritos previamente [143], los MØ-GM estimulados con LPS durante 24 horas produjeron altas cantidades de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-23 e IL-6 y no secretaron IL-10, mientras que los MØ-M estimulados con LPS durante 24 horas produjeron altos niveles de IL-10, bajos niveles de citoquinas pro-inflamatorias TNF- α y IL-6, y nulos de IL-23 (Figura 11B). En consecuencia, los macrófagos diferenciados con M-CSF tienen un fenotipo FR- β^+ , CD209⁺, CD163^{alto}, CD14^{alto}, IL-10^{alto}, TNF- α^{bajo} , IL-6^{bajo} e IL-23⁻, mientras que los macrófagos diferenciados con GM-CSF son FR- $\beta^{\text{-bajo}}$, CD209⁻, CD163^{bajo}, CD14^{bajo}, IL-10^{bajo}, TNF- α^{alto} , IL-6^{alto} e IL-23⁺.

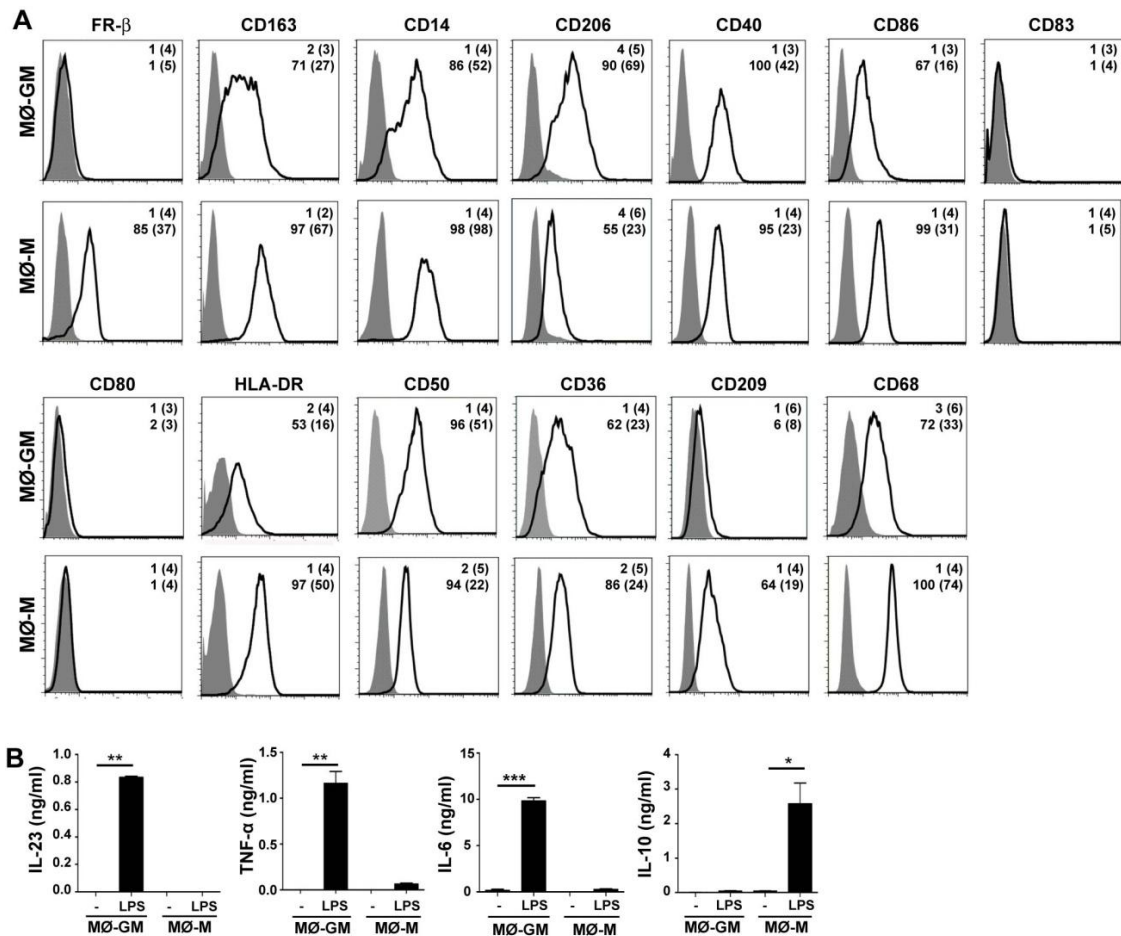


Figura 11. Caracterización fenotípica y funcional de MØ-GM y MØ-M. **A.** Detección de FR-β, CD163, CD14, CD206, CD40, CD86, CD83, CD80, CD50, CD36 y HLA-DR en la superficie celular e intracelular de CD209 y CD68 en los MØ-GM y MØ-M por citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células positivas y la media de intensidad de fluorescencia (entre paréntesis). Los experimentos se realizaron en 6 donantes independientes y se muestra uno representativo. **B.** Detección de IL-23, TNF-α, IL-6 e IL-10 por ELISA en los MØ-GM y MØ-M tratados con LPS (10 ng/ml) durante 24 horas. Se indica la media y desviación estándar (SD) de 5 donantes independientes (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$).

Por otra parte, y debido a que en este trabajo caracterizaremos la expresión de los transportadores de folato y otros marcadores de polarización en macrófagos en tejido, evaluamos la expresión de marcadores pan-macrófago para poder identificar y distinguir los macrófagos residentes con otros tipos celulares y en cualquier contexto tisular. Se evaluó la expresión de CD68 y CD163 que son marcadores tanto de MØ-GM como MØ-M (Figura 11A), cuantificando su expresión en diferentes tejidos y en diferente contexto (placenta; hígado; colon sano vs colitis; membrana sinovial sana vs membrana sinovial de AR). Se observó co-localización de las células que expresaban CD68⁺ con las células CD163⁺ en todos los tejidos analizados y la cuantificación de la fluorescencia de ambos marcadores mostró que el 97% de los macrófagos CD68⁺ [140,144] fueron CD163⁺ (Figura 12). A pesar de que ambos marcadores identifican y distinguen los macrófagos (marcadores pan-

macrófago) en tejido homeostático e inflamatorio, CD163 delimita el contorno celular a diferencia de CD68 que marca los lisosomas (Figura 12). Por tanto, se selecciona CD163 como marcador pan-macrófago en todo el trabajo, ya que distingue los macrófagos en tejido homeostático e inflamatorio y delimita el contorno celular de los macrófagos.

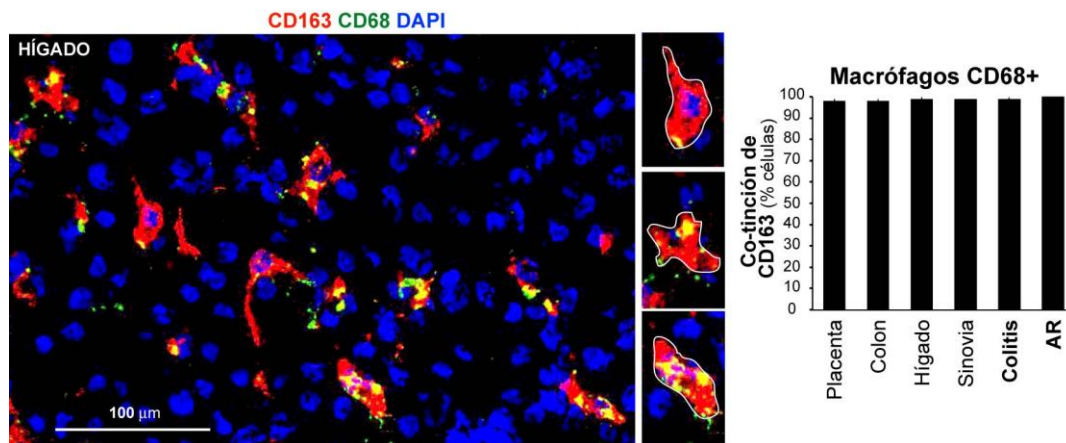


Figura 12. Expresión y cuantificación de los marcadores “pan-macrófago” CD163 y CD68 en distintos tejidos. Detección (izquierda) y cuantificación (derecha) de CD163 y CD68 en macrófagos en los tejidos indicados en condiciones homeostáticas (placenta, colon, hígado y membrana sinovial normal, sinovia) y en condiciones inflamatorias (colitis ulcerosa y membrana sinovial de artritis reumatoide, AR). Se cuantificaron más de 200 células CD68⁺ para cada tejido y se analizó su expresión de CD163. Se representa el porcentaje medio y la SD. En el hígado se muestra que CD163 (rojo) es un excelente marcador de macrófagos porque delimita mejor el contorno celular que CD68 (ver 20x, derecha). Los núcleos se tiñeron con DAPI.

Con objeto de diferenciar el contexto del tejido (homeostático vs inflamatorio), se analizó además la expresión de los marcadores CD209, presente sólo en MØ-M *in vitro* y en células dendríticas [141], y TNF- α , presente en MØ-GM (Figura 11A, 11B). Se observó que los macrófagos de los tejidos en situaciones homeostáticas muestran un perfil de expresión CD163⁺CD209⁺TNF- α ⁻ similar al MØ-M generado *in vitro* (Figura 13A), mientras que los macrófagos en los tejidos inflamatorios muestran un perfil de expresión CD163⁺CD209⁻TNF- α ⁺, similar a MØ-GM generados *in vitro* (Figura 13B). La cuantificación de los dos marcadores (CD209 y TNF- α) en macrófagos CD163⁺ en distintos tejidos en diferentes contextos confirmó los resultados (Figura 13C). En conjunto, los resultados anteriores demuestran que la expresión de CD163 y CD209 discrimina los macrófagos en tejido homeostático, y que la expresión de CD163 y TNF- α discrimina los macrófagos en tejido inflamatorio y todos se utilizarán como marcadores de los macrófagos a lo largo del trabajo.

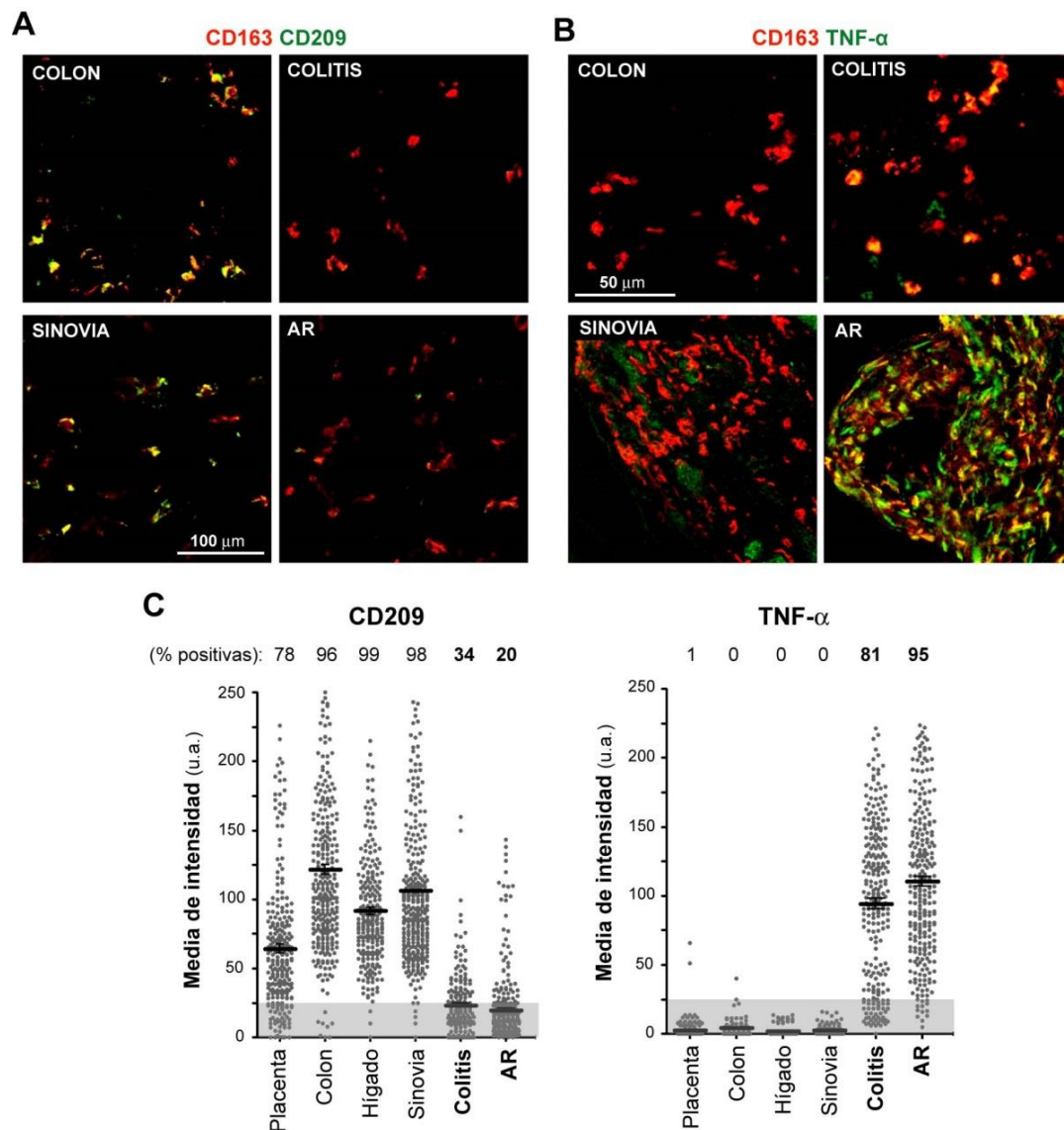


Figura 13. Expresión y cuantificación de CD209 y TNF- α en los macrófagos CD163⁺ en tejidos en homeostasis e inflamación. A. Detección de CD163 (rojo) y CD209 (verde) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en colon sano y colitis ulcerosa (colón/colitis) y membrana sinovial sana o de AR (sinovia/AR). **B.** Detección de CD163 (rojo) y TNF- α (verde) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en colon sano y colitis ulcerosa (colón/colitis) y membrana sinovial sana o de AR (sinovia/AR). **C.** Se calculó la media de intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, u.a.) de CD209 y TNF- α en las regiones de interés dibujadas alrededor de cada macrófago CD163⁺ (descartando el fondo). Se cuantificaron entre 150 y 300 células en cada muestra de tejido. Se representa la media \pm S.E.M. de 3 donantes independientes (>3 campos/donante) y se consideran células positivas aquellas que presentan valores superiores a 25 u.a.

Internalización y acumulación de tetrahidrofolato (THF) en los macrófagos

Previamente se ha descrito que los M \emptyset -M tienen una mayor capacidad de internalizar conjugados de folato (folato-FITC) que los M \emptyset -GM y que esta capacidad es dependiente del receptor de folato β , FR- β [47]. Como el conjugado de folato no es una forma natural de folato, se analizó la captación de 5-metiltetrahidrofolato (5-

MTHF), forma de folato mayoritaria en suero [52,53,54], en MØ-GM y MØ-M en condiciones fisiológicas (pH 7.4). Los MØ-M internalizaron significativamente más 5-MTHF que los MØ-GM y esta actividad alcanzó el “plateau” a los 60 minutos (Figura 14A). Para determinar si la diferencia en la internalización se debía a la diferencia en expresión de FR- β se realizaron dos experimentos, uno de competición con ácido fólico frío y otro de bloqueo de FR- β con un anticuerpo monoclonal bloqueante anti-FR- β . En presencia de ácido fólico frío (20x), la captación de 5-MTHF en MØ-M se inhibió un 80% mientras que en MØ-GM no se vio afectada (Figura 14B). La pre-incubación con un anticuerpo específico contra FR- β inhibió un 48% la internalización de 5-MTHF en MØ-M (Figura 14C). Estos resultados indican que los MØ-M internalizan 5-MTHF a través de FR- β . También se determinó la internalización de 5-MTHF en el sistema de polarización de los macrófagos M1 y M2 con las citoquinas IFN- γ e IL-4, estimulando a MØ-GM y MØ-M durante 48 horas con dichas citoquinas [38]. La internalización de 5-MTHF fue significativamente mayor en los MØ-GM y MØ-M activados con IL-4 que con IFN- γ (Figura 14D).

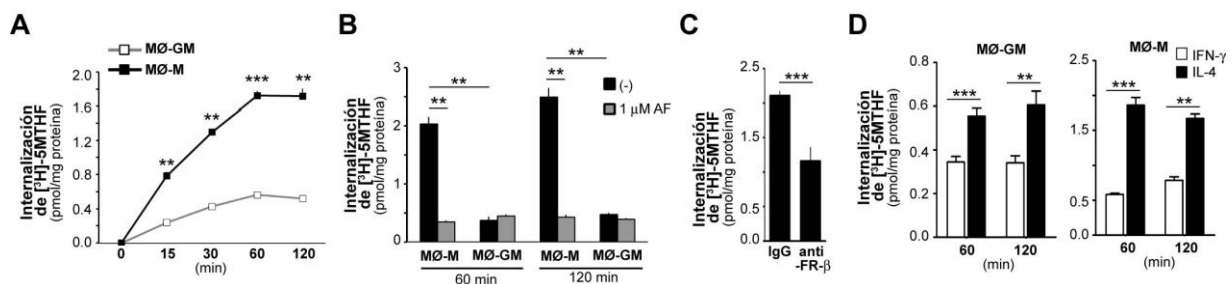


Figura 14. Internalización de 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF) en los MØ-M y MØ-GM a pH fisiológico (pH 7.4) y especificidad por FR- β . **A.** Internalización de [3 H]-5-MTHF (50nM) en los MØ-GM y MØ-M durante el tiempo indicado. **B y C.** Especificidad del transporte de 5-MTHF. **B.** La internalización de [3 H]-5-MTHF (50 nM) se evaluó en presencia o ausencia de ácido fólico frío (1 μ M) en los MØ-GM y MØ-M. **C.** Los MØ-M se pre-incubaron con el anticuerpo FR- β o un anticuerpo isotipo específico (IgG1, 1 μ g/ml) durante 10 minutos a 37°C y la internalización de [3 H]-5-MTHF se evaluó durante 20 minutos. **D.** Internalización de [3 H]-5-MTHF en los MØ-GM y MØ-M tratados durante 48 horas con INF- γ o IL-4. **(A-D)** Se indica la media y la SD de 3 donantes independientes (** p <0.005; *** p <0.001).

Debido a las diferencias observadas en la internalización de 5-MTHF en macrófagos, se analizó la acumulación de tetrahydrofolato (THF), molécula intermediaria del metabolismo de folato, en los MØ-GM y MØ-M mediante inmunofluorescencia. El marcaje de THF indicó que únicamente los MØ-M acumulan THF cuando se exponen a concentraciones fisiológicas de ácido fólico (Figura 15A). También se evaluó el contenido de THF en tejidos homeostáticos e involucrados en la absorción de folato como son la placenta y el colon [53,73] y en tejidos en condiciones inflamatorias como la colitis ulcerosa (Figura 15B). Se detectó que los macrófagos

CD163⁺ de colon y placenta expresan THF, mientras los macrófagos CD163⁺ en condiciones inflamatorias (colitis ulcerosa) no expresan THF. Tal y como se ha descrito previamente, la expresión de CD163⁺THF⁺ en placenta y colon se limitó a los macrófagos CD209⁺TNF- α ⁻, característicos de un perfil MØ-M, mientras que la expresión de CD163⁺THF⁻ en colitis ulcerosa se limitó a macrófagos CD209⁻TNF- α ⁺, característicos de un perfil MØ-GM (Figura 15C). En conjunto, los resultados anteriores demuestran que la internalización y acumulación de THF caracterizan a MØ-M tanto *in vitro* como *in vivo*.

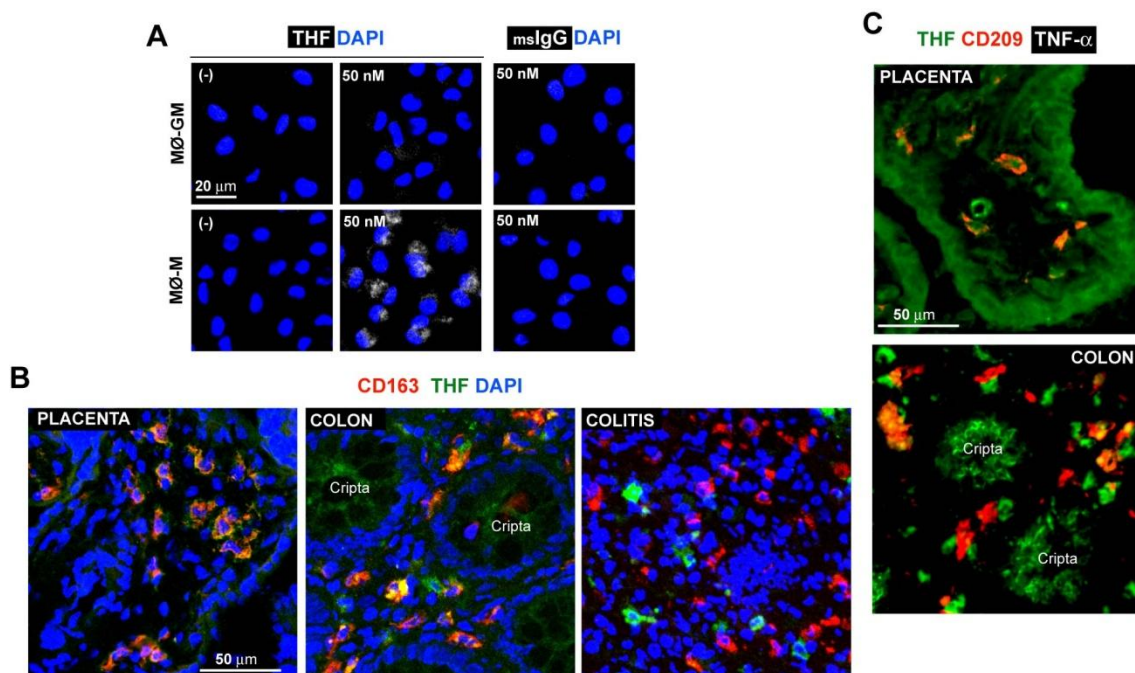


Figura 15. Expresión del tetrahidrofolato (THF) en los MØ-GM y MØ-M y en macrófagos en distintos tejidos. **A.** Detección de THF (blanco) y control (msIgG) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en MØ-GM y MØ-M. Los macrófagos se cultivaron con RPMI deplecionado de ácido fólico durante 24 horas. Se añadió ácido fólico (50 nM) durante 3 horas y las células se fijaron y permeabilizaron (0.1% saponina) antes de teñir con anti-THF. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Escala, 20 μ m. **B.** Detección de CD163 (rojo) y THF (verde) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en placenta, colon y colitis ulcerosa. Los núcleos se tiñeron con DAPI. **C.** Detección de THF (verde), CD209 (rojo) y TNF- α (blanco) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en placenta y colon. Escala, 50 μ m.

Expresión de moléculas implicadas en la internalización, retención y salida de folatos en los macrófagos

El folato y otros derivados reducidos como el 5-MTHF pueden entrar en la célula a través de dos transportadores de membrana además del FR- β . El transportador más ubicuo es RFC (transportador de folato reducido), codificado por el gen *SLC19A1* [145]. Recientemente, se ha descubierto el transportador PCFT (transportador de

folato acoplado a protón) codificado por el gen *SLC46A1* y que transporta folato a pH ácido [60]. Para elucidar las bases moleculares de las diferencias de captación y acumulación de folato en los MØ-GM y MØ-M, se estudió la expresión y funcionalidad de los transportadores de folato RFC, PCFT y FR-β [96], y la expresión de las moléculas implicadas en la retención (folilpoliglutamatosintasa (*FPGS*) y gammaglutamil hidrolasa (*GGH*)) y salida de folato (los genes de la familia de receptores de proteína multidrogas (*MRPs*) también conocidos como la subfamilia de receptores de unión a ATP (*ABCC1-5* y *ABCG2*) en macrófagos. Utilizando los datos del perfil de expresión génica de los MØ-GM y MØ-M previamente publicados (GSE27792) [48] se determinó que los MØ-M expresan niveles significativamente mayores de *SLC46A1* y *FOLR2*, mientras que los MØ-GM expresan niveles más altos de *SLC19A1* (Figura 16). La expresión de moléculas de retención (*FPGS* y *GGH*) no cambió significativamente en los distintos tipos de macrófagos (Figura 16). Respecto a las moléculas implicadas en la salida de folato de las células, los MØ-GM expresaron niveles significativamente mayores de los genes *ABCC3* y *ABCG2*, mientras que la expresión de *ABCC5* fue mayor en MØ-M (Figura 16). Estos resultados indican que los MØ-M tienen mayor expresión de genes (*FOLR2* y *SLC46A1*) que codifican moléculas implicadas en la internalización de folato (FR-β y PCFT, respectivamente), mientras que los MØ-GM muestran mayor expresión de genes, implicados en la salida de folato y el transportador bidireccional RFC (*SLC19A1*).

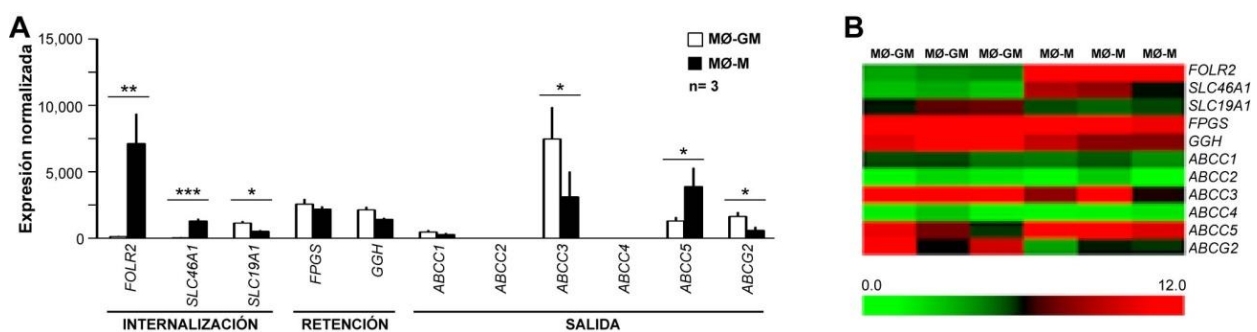


Figura 16. Expresión de los genes implicados en la internalización, retención y salida de folato en los MØ-GM y MØ-M. A. Expresión relativa de los genes implicados en la internalización, retención y salida de folato en MØ-GM y MØ-M determinado mediante un análisis de “microarrays” (GSE27792). Se muestran los valores de intensidad de fluorescencia para cada sonda (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$). B. Representación por la agrupación de los valores de expresión génica de los genes implicados en el transporte de folato utilizando el programa “Multiple Experiment Viewer” (MEV).

Los resultados de expresión génica de los transportadores de folato *SLC19A1*, *SLC46A1* y *FOLR2* se validaron a nivel de proteína en MØ-GM, MØ-M y en

monocitos. FR- β y PCFT se expresaron en la superficie celular de los M \emptyset -M [47] (Figura 17A) y ambas proteínas co-localizaron en un compartimento endosómico perinuclear enriquecido en moléculas GPI [146] (Figura 17B). Sin embargo, los M \emptyset -M expresaron bajos niveles de RFC. Por el contrario, los monocitos expresaron altos niveles de RFC, bajos niveles de FR- β y no se detectó PCFT. Finalmente y al igual que los monocitos, los M \emptyset -GM expresaron altos niveles de RFC, bajos de PCFT, y no se detectó FR- β (Figura 17A). Como se muestra en la Figura 17C-D, la expresión de los transportadores de folato a lo largo de la diferenciación monocito-macrófago reveló que los niveles de *SLC19A1*, *SLC46A1* y *FOLR2* no cambiaron durante la diferenciación hacia M \emptyset -GM, mientras que los niveles de *FOLR2* y *SLC46A1* aumentaron progresivamente a partir del día 3 de la diferenciación a M \emptyset -M.

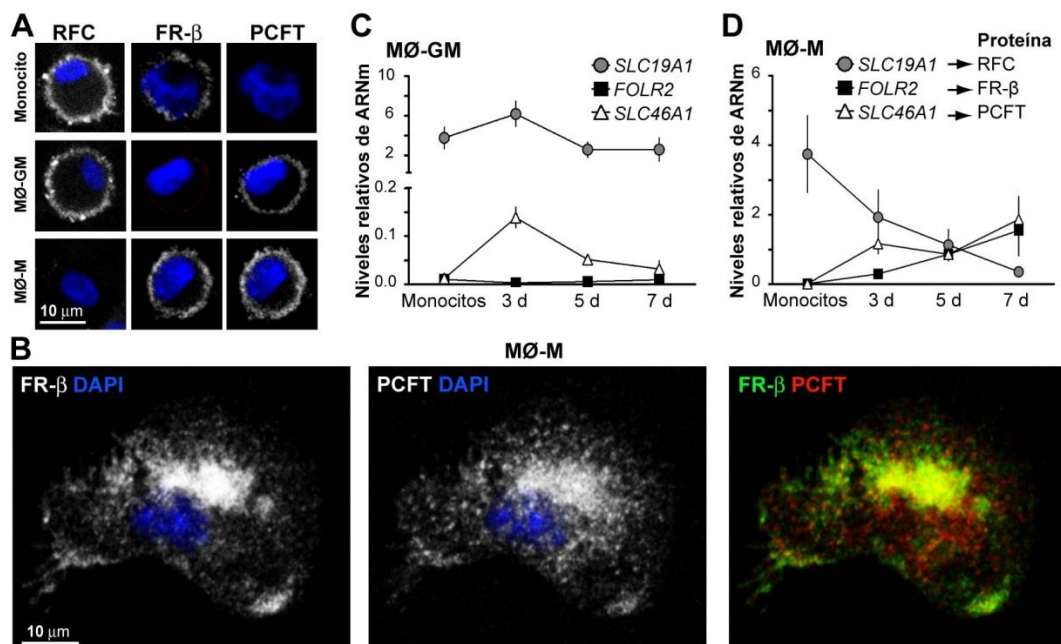


Figura 17. Expresión de los transportadores de folato en los monocitos, M \emptyset -GM y M \emptyset -M. A y B. Detección de RFC, FR- β y PCFT en monocitos (A), M \emptyset -GM (A) y M \emptyset -M (A y B) por inmunofluorescencia y microscopía confocal utilizando anticuerpos específicos. En A, las células se adherieron a Poli-L-Lisina durante 10 minutos y se tiñeron sin permeabilizar y en B, las células se adherieron a Poli-L-Lisina durante 1 hora y se permeabilizaron con 0.1% de saponina durante 10 minutos a 37°C. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Escala, 10 μ m. C y D. Detección de ARNm de *SLC19A1*, *FOLR2* y *SLC46A1* a lo largo de la diferenciación de monocito a M \emptyset -GM (C) o M \emptyset -M (D) por qRT-PCR. Se indica la media y la SD de 3 donantes independientes ($p < 0.001$ para *SLC19A1*; $p < 0.05$ para *FOLR2* y *SLC46A1* comparando monocitos con macrófagos diferenciados durante 7 días). Se indica el nombre del gen y la proteína.

Internalización de 5-MTHF en los macrófagos a pH ácido

En condiciones de pH ácido (pH 5.5), la internalización de ácido fólico (y 5-MTHF) fue mayor en M \emptyset -M que en M \emptyset -GM (Figura 18A), lo que concuerda con su mayor

expresión de PCFT. La funcionalidad del PCFT se demostró en experimentos de silenciamiento génico utilizando tres siARN distintos (siPCFT#1, #2 y #3). Los tres siARN de PCFT disminuyeron la expresión del gen *SLC46A1* (que codifica para PCFT) entre un 60 y un 80% respecto al siARN control (siC) (Figura 18B) y disminuyeron significativamente la captación de 5-MTHF a pH 5.5 en MØ-M (Figura 18C). En su conjunto, estos resultados indican que los MØ-GM y MØ-M difieren de su capacidad de transportar folatos. Los MØ-M internalizan más 5-MTHF a pH 7.4 (FR- β -dependiente) y pH 5.5 (PCFT-dependiente) que los MØ-GM.

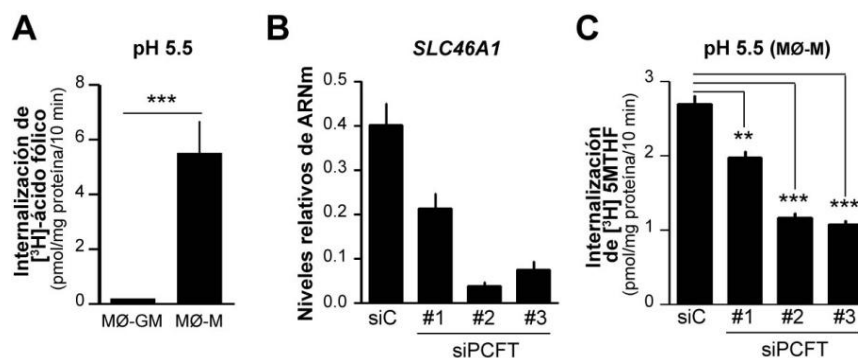


Figura 18. Internalización de ácido fólico y 5-MTHF a pH ácido (pH 5.5) en los MØ-GM y MØ-M y especificidad por PCFT. A. La internalización de [³H]-ácido fólico (50 nM) se evaluó a pH 5.5 durante 10 minutos en MØ-GM y MØ-M. Se indica la media y la SD de 3 donantes independientes. **B.** Detección de *SLC46A1* en MØ-M transfectados con un siARN control (siC) y tres siARNs diferentes para PCFT (siPCFT; #1, #2, #3) por qRT-PCR. Se realizaron dos experimentos independientes y se muestra uno representativo. **C.** La internalización de [³H]-5MTHF (50 nM) se evaluó a pH 5.5 durante 10 minutos en MØ-M transfectados con un siARN control (siC) y tres siARNs diferentes para el PCFT (siPCFT; #1, #2, #3; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$).

Internalización de metotrexato (MTX) en los macrófagos

Previamente se ha demostrado que la internalización de 5-MTHF en macrófagos depende de FR- β a pH 7.4 y de PCFT a pH 5.5, ambos transportadores más expresados en los MØ-M. Para estudiar la funcionalidad del transportador RFC, se determinó la internalización del anti-folato MTX [61] en MØ-GM y MØ-M. RFC muestra una afinidad alta por el MTX (1 - 5 μ M versus PCFT: 0.5 - 2 μ M a pH 5.5 y FR- β : >100 nM) en condiciones fisiológicas [64,65,68]. No se encontraron diferencias significativas en el transporte de MTX en MØ-GM y MØ-M a pH 7.4 (Figura 19), lo que sugiere que la mayor expresión de RFC en MØ-GM no es indicativo de mayor funcionalidad. Sin embargo, a pH 5.5 los MØ-M captan más MTX que los MØ-GM (Figura 19).

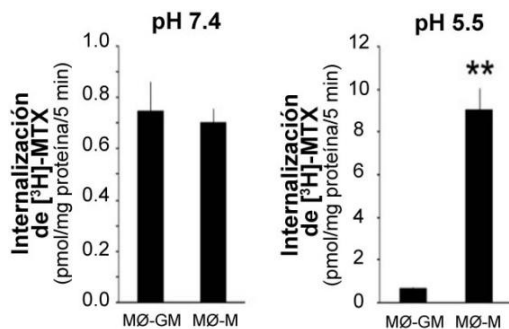


Figura 19. Internalización de metotrexato (MTX) en MØ-M y MØ-GM a pH fisiológico (pH 7.4) y pH ácido (pH 5.5). Internalización de [³H]-MTX (50 nM) en MØ-GM y MØ-M durante el tiempo indicado a pH 7.4 (izquierda) y a pH 5.5 (derecha) (** $p < 0.005$).

Expresión de los transportadores de folato *in vivo*: FR- β y PCFT se co-expresan en los macrófagos residentes en tejidos implicados en la absorción y tránsito de folato

Hemos demostrado que los macrófagos difieren en su capacidad de acumular THF en tejido normal e inflamatorio y que la expresión de los transportadores de folato es dependiente de la polarización *in vitro*. Con objeto de determinar si la expresión de transportadores de folato discrimina polarización *in vivo*, se evaluó la expresión de los transportadores de folato en macrófagos en tejidos en situaciones normales/homeostáticas (colon, placenta a término, hígado y membrana sinovial) y en situaciones inflamatorias (colitis ulcerosa y membrana sinovial de pacientes con AR activa). En el caso de los tejidos con predominancia de los MØ-M (colon, placenta e hígado), el análisis de inmunofluorescencia mostró que los macrófagos CD163⁺/CD209⁺ de las criptas del colon co-expresaban FR- β y PCFT, mientras que en los enterocitos sólo se expresó PCFT (Figura 20A). En la placenta humana a término, FR- β y PCFT también se detectaron en los macrófagos CD163⁺/CD209⁺, localizados debajo del sincitiotrofoblasto PCFT⁺. En el hígado, FR- β y PCFT se detectaron en las células de Kupffer de los sinusoides hepáticos (Figura 20B, C). El análisis de expresión de ARNm de los distintos tipos celulares existentes en el hígado (hepatocitos, células endoteliales de sinusoides, células de Ito, y células de Kupffer), confirmó que *FOLR2* y *SLC46A1* se expresaron exclusivamente en las células de Kupffer PU.1⁺ (SPI1) (Figura 20C). Estos resultados permiten concluir que FR- β y PCFT se expresan en los macrófagos CD163⁺/CD209⁺ residentes de tejidos involucrados en la absorción y tránsito de folato y que tienen una predominancia de MØ-M.

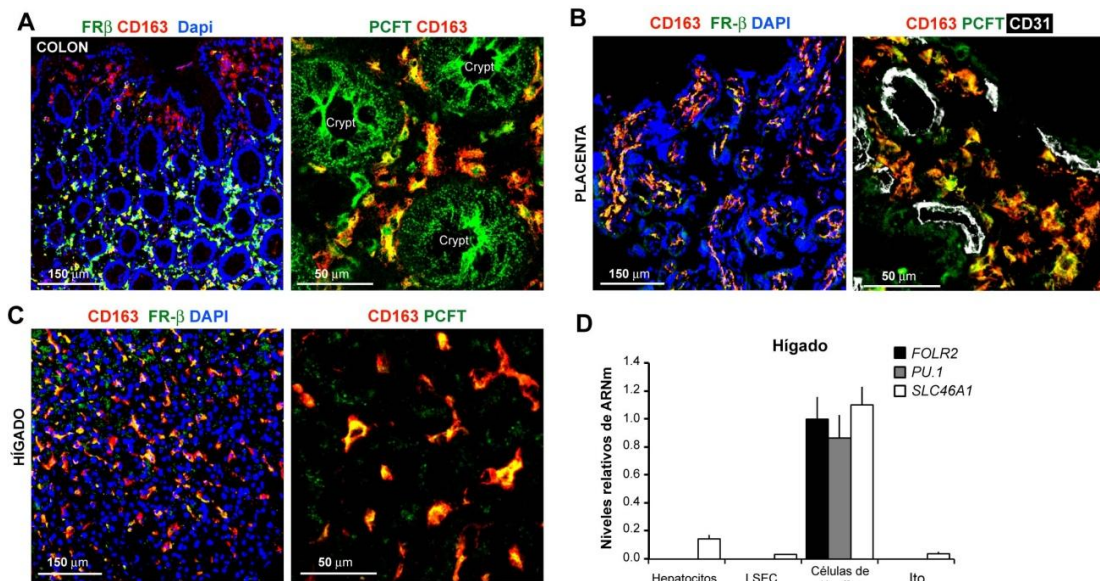


Figura 20. Expresión de los transportadores de folato FR-β, PCFT y RFC en los macrófagos CD163⁺ de tejidos en homeostasis. Detección de CD163 y FR-β (izquierda), PCFT (centro) y CD31 (centro) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en colon (A), placenta (B) e hígado (C). CD163 se muestra en rojo, los transportadores de folato se muestran en verde y CD31 (endotelio) se muestra en blanco. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Escala: 150 μm, y la ampliación a 50 μm. C. Detección de ARNm de *FOLR2*, *PU.1* y *SLC46A1* en hepatocitos, células endoteliales de sinusoides hepáticos (LSEC), células de Kupffer y células de Ito (Ito) humanas por qRT-PCR. Los resultados se referenciaron al valor de *FOLR2* en las células de Kupffer.

Expresión de los transportadores de folato *in vivo*: FR-β y RFC se co-expresan en los macrófagos en tejido en condiciones inflamatorias

En el caso de los macrófagos de tejido inflamatorio, el análisis de inmunofluorescencia se realizó en tejido de pacientes con colitis ulcerosa y en la membrana sinovial de pacientes con AR activa. Contrariamente al perfil de expresión de transportadores de folato en los macrófagos en colon sano FR-β⁺PCFT⁺RFC⁻, los macrófagos CD163⁺ de la colitis ulcerosa fueron RFC⁺ (Figura 21A). De manera similar sucedió en los tejidos de artritis reumatoide. Mientras que los macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial sana expresaron FR-β pero no RFC, los macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de pacientes con AR activa fueron FR-β⁺ y RFC⁺ (Figura 21C). El análisis cuantitativo de la expresión de FR-β y RFC en los macrófagos CD163⁺ de los tejidos homeostáticos (colon y membrana sinovial sana) e inflamatorios (colitis ulcerosa y membrana sinovial de pacientes con AR activa) (Figura 21B, D), confirmó que RFC se expresa predominantemente en los macrófagos en condiciones inflamatorias, por lo que representa un valioso marcador de MØ-GM.

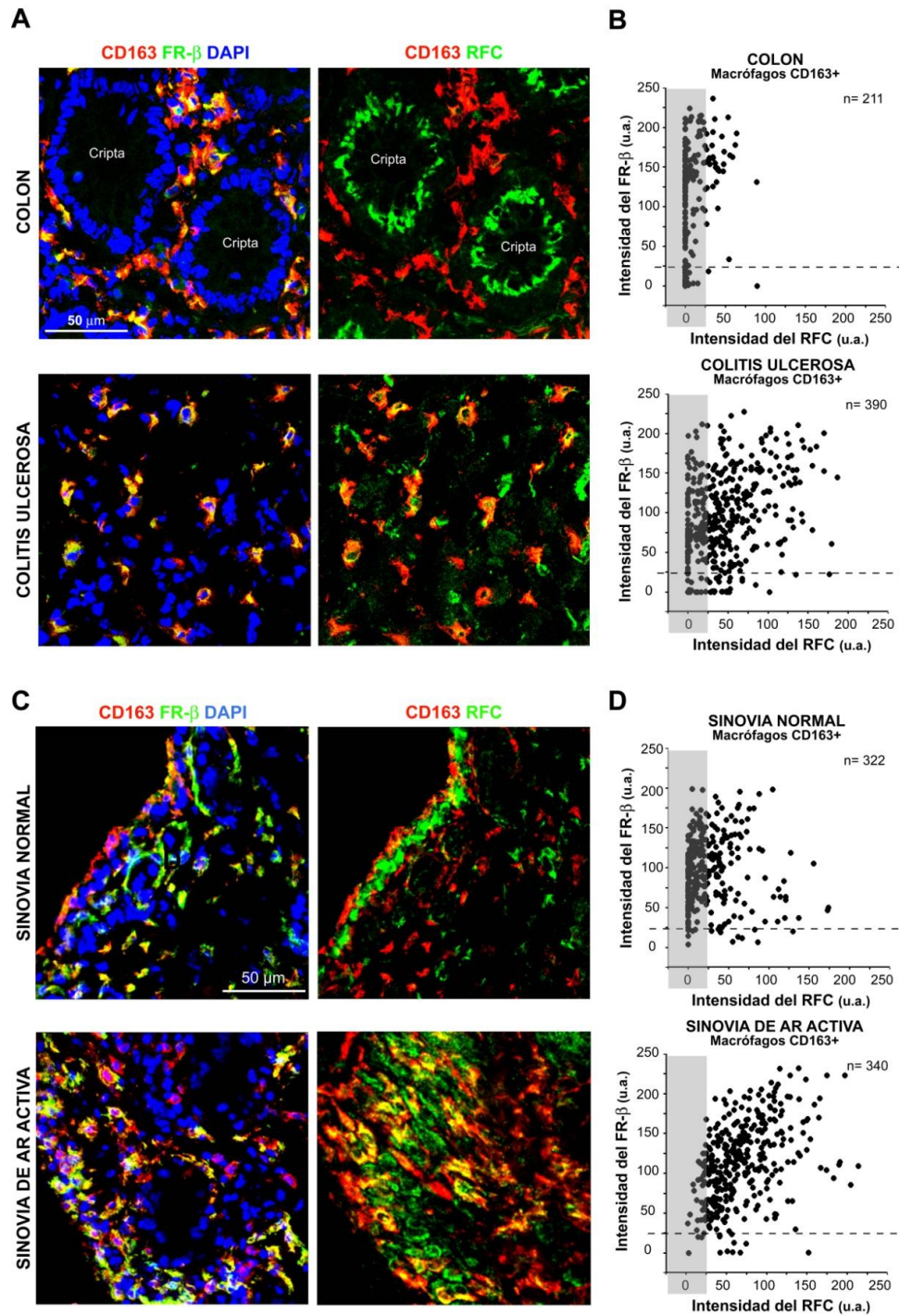


Figura 21. Expresión de los transportadores de folato FR- β y RFC en los macrófagos CD163⁺ de tejidos en inflamación. **A.** Detección de CD163 (rojo), FR- β (verde, izquierda) y RFC (verde, derecha) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en colon (arriba) y colitis ulcerosa (abajo). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Escala: 50 μ m. **B.** Se calculó la media de intensidad de fluorescencia (u.a.) de FR- β y RFC en las regiones de interés dibujadas alrededor de cada macrófago CD163⁺ (descartando el fondo) posicionado alrededor de las criptas del colon (COLON, arriba) y en la colitis ulcerosa (COLITIS ULCEROSA, abajo). Se representa la media \pm S.E.M. de 3 donantes independientes (>3 campos/donante) y se consideran células positivas aquellas que presentan valores superiores a 25 u.a. **C.** Detección de CD163 (rojo), FR- β (verde, izquierda) y RFC (verde, derecha) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en membrana sinovial control (arriba) y membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide (AR) activa (abajo). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Escala: 50 μ m. **D.** Se calculó la media de intensidad de fluorescencia (u.a.) de FR- β y RFC en las regiones de interés dibujadas alrededor de cada macrófago CD163⁺ (descartando el fondo) de las membranas sinoviales control (SINOVIA NORMAL, superior) y con AR activa (SINOVIA DE AR ACTIVA, inferior). Se representa la media \pm S.E.M. de 3 donantes independientes (>3 campos/donante) y se consideran células positivas aquellas que presentan valores superiores a 25 u.a.

En el contexto de la AR, también se analizó la expresión de transportadores de folato en células CD14⁺ aisladas del líquido sinovial de pacientes con AR activa. Estas células se encuentran embebidas en un medio pro-inflamatorio [129,147]. Las células CD14⁺ del líquido sinovial de pacientes con AR expresaron *SLC19A1* y *TNFA*, y carecieron de *FOLR2* y *SLC46A1* (Figura 22A). Los resultados a nivel de ARNm se confirmaron a nivel de proteína obteniendo un patrón RFC^{alto}PCFT^{bajo}TNF- α ^{alto} y casi desprovisto de FR- β (Figura 22B).

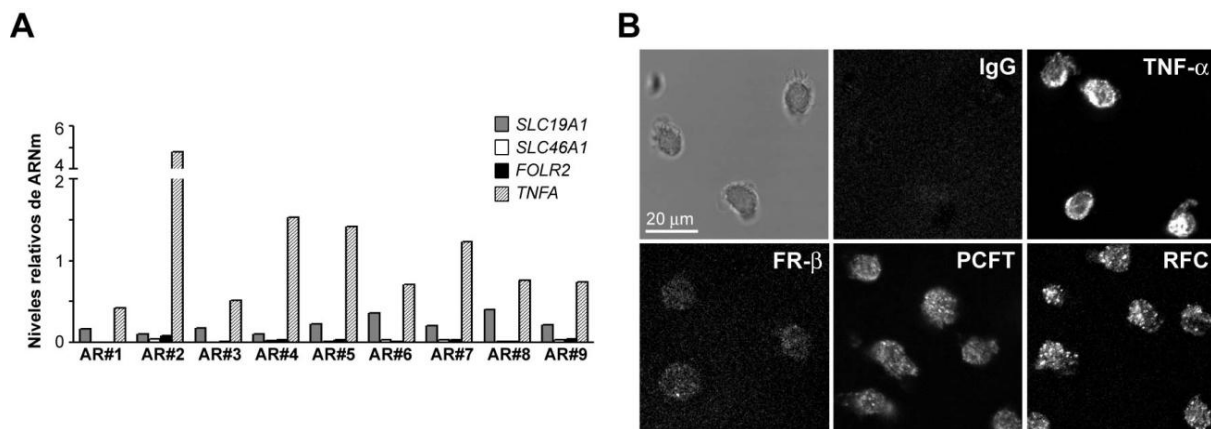


Figura 22. Expresión de los transportadores de folato FR- β , PCFT y RFC en células CD14⁺ del líquido sinovial de pacientes con AR. **A.** Detección de ARNm de *SLC19A1*, *SLC46A1*, *FOLR2* y *TNFA* en células CD14⁺ del líquido sinovial de 9 pacientes con AR por qRT-PCR. **B.** Detección de TNF- α , FR- β , PCFT y RFC por inmunofluorescencia y microscopía confocal en células CD14⁺ del líquido sinovial de pacientes con AR. Escala: 20 μ m. Se muestra el DIC (microscopía diferencial de contraste de interferencia) en la imagen. Escala, 20 μ m. El experimento se realizó en 2 donantes independientes y se muestra uno representativo.

La cuantificación de la expresión de los tres transportadores de folato RFC, PCFT y FR- β en macrófagos CD163⁺ en todos los tejidos analizados mostró que RFC se expresa preferencialmente en tejido inflamatorio. Por el contrario, el PCFT y el FR- β se expresan mayoritariamente en tejidos en condiciones homeostáticas (Figura 23). Toda esta serie de experimentos demuestra que el perfil de expresión de transportadores de folato refleja el estado inflamatorio del tejido, y se puede utilizar para discriminar entre los estados de polarización de los macrófagos *in vitro* e *in vivo*.

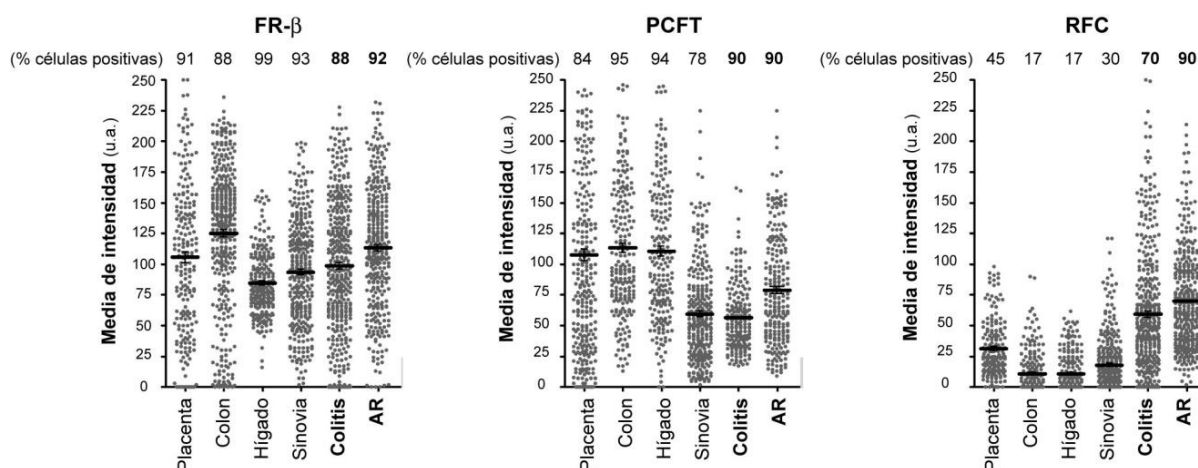


Figura 23. Resumen de la expresión de los transportadores de folato FR- β , PCFT y RFC en macrófagos CD163⁺ en los distintos tejidos analizados. Cuantificación del marcaje de FR- β , PCFT y RFC en macrófagos de los tejidos en homeostasis (placenta, colon, hígado y membrana sinovial control, sinovia) y tejidos en inflamación (colitis ulcerosa, colitis, y membrana sinovial de artritis reumatoide, AR). Se calculó la media de intensidad de fluorescencia (u.a.) de cada proteína en las regiones de interés dibujadas alrededor de cada macrófago CD163⁺ (descartando el fondo). Se cuantificaron entre 150 y 350 células en cada muestra de tejido. Se representa la media \pm S.E.M. de 3 donantes independientes (>3 campos/donante) y se consideran células positivas aquellas que presentan valores superiores a 25 u.a.

Activina A regula la expresión de *SLC19A1* (RFC) y la internalización de 5-MTHF en M ϕ -GM

Para determinar las bases moleculares de la expresión preferencial de RFC en macrófagos pro-inflamatorios, se realizaron experimentos de re-polarización en M ϕ -M. Estos experimentos consisten en estimular los M ϕ -M con GM-CSF (que revierte la polarización) o M-CSF (que mantiene la polarización, control) durante 48 horas. La re-polarización con GM-CSF aumentó significativamente la expresión de *SLC19A1* en M ϕ -M (Figura 24A). Previamente se ha descrito el papel de la activina A en polarización de macrófagos [48]. La activina A producida por M ϕ -GM contribuye a mantener el fenotipo pro-inflamatorio de M ϕ -GM e inhibe la expresión de marcadores de polarización anti-inflamatorios como FR- β [47]. La posible contribución de activina A a la expresión de *SLC19A1* se evaluó, tratando directamente M ϕ -M con activina A recombinante. Activina A aumenta significativamente la expresión de ARNm de *SLC19A1*, mientras que disminuye los niveles de ARNm de *FOLR2* [137] (Figura 24B). Para confirmar la dependencia de activina A en la expresión de *SLC19A1* en M ϕ -GM, estos se diferenciaron durante 7 días en presencia de un anticuerpo bloqueante anti-activina A o SB431542 (inhibidor de la fosforilación de Smad2/3). Como se muestra en la Figura 24C-D, en ambas situaciones la expresión de ARNm de *SLC19A1* disminuyó mientras que la expresión

de ARNm de *FOLR2* aumentó significativamente. Estos resultados demuestran que la activina A contribuye a la regulación de la expresión de *SLC19A1* y *FOLR2* en los MØ-GM y que controla el perfil de expresión de transportadores de folato en macrófagos. Funcionalmente, los MØ-GM internalizaron más 5-MTHF cuando se generaron en presencia de un anticuerpo bloqueante anti-activina A, lo que indica que la activina A modula la captación de 5-MTHF en macrófagos (Figura 24E).

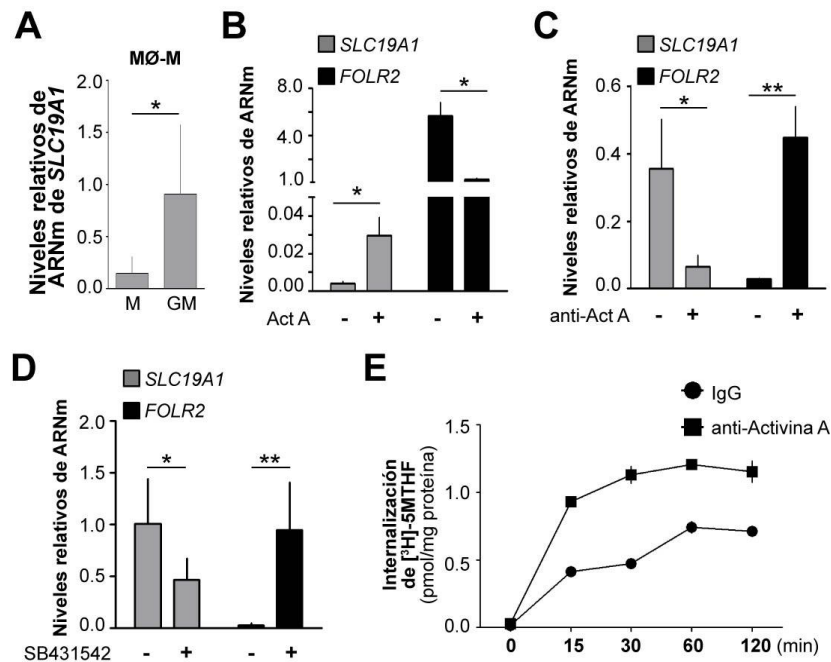


Figura 24. La activina A regula la expresión del ARNm de *SLC19A1* y la internalización de 5-MTHF en los MØ-GM. **A.** Detección de ARNm de *SLC19A1* por qRT-PCR en MØ-M tratados con M-CSF (M) o GM-CSF (GM) durante 48 horas. Se indica la media y la SD de 4 experimentos independientes. **B.** Detección de ARNm de *SLC19A1* y *FOLR2* por qRT-PCR en MØ-M diferenciados en ausencia (-) o presencia de activina A (ActA; 10 ng/ml; +). **C.** Detección de ARNm de *SLC19A1* y *FOLR2* por qRT-PCR en MØ-GM generados en presencia de un anticuerpo isotipo específico (IgG1; -) o un anticuerpo bloqueante anti-activina A (anti-Act A; +). **D.** Detección de ARNm de *SLC19A1* y *FOLR2* por qRT-PCR en MØ-GM generados en presencia de SB431542 (+) o DMSO (-). **(B-D)** Se indica la media y SD de 5 donantes independientes. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$). **E.** La internalización de [³H]-5-MTHF (50 nM) se evaluó a pH 7.4 durante los tiempos indicados en MØ-GM generados en presencia del anticuerpo bloqueante anti-activina A o un anticuerpo control (IgG). El experimento se realizó en 3 donantes independientes y se muestra uno representativo.

El ácido fólico disminuye la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en los MØ-GM

Dado que los MØ-GM y MØ-M difieren en el transporte de 5-MTHF, se analizó si existía una relación entre el metabolismo del folato y la polarización de macrófagos. Para ello se determinó la expresión de marcadores de polarización y citoquinas en los MØ-GM y MØ-M generados con RPMI deplecionado de ácido fólico y con suero dializado y en ausencia o presencia de 2.3 μ M de ácido fólico (AFol). La presencia

de AFol no modificó la expresión de marcadores específicos de polarización (Figura 25 y datos no mostrados).

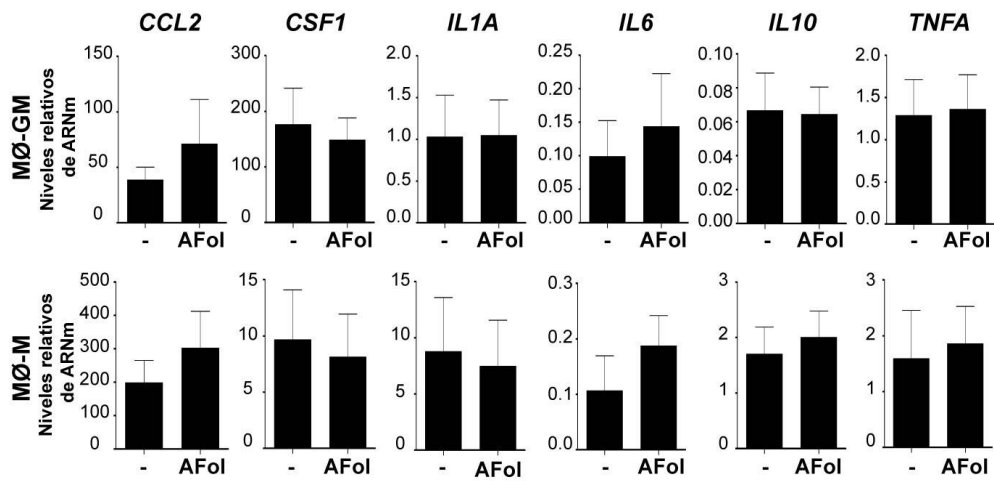


Figura 25. Efecto del ácido fólico en la expresión génica de citoquinas y quimioquinas en los MØ-GM y MØ-M. Detección de ARNm de *CCL2*, *CSF1*, *IL1A*, *IL6*, *IL10* y *TNFA* por qRT-PCR en MØ-GM (panel superior) y MØ-M (panel inferior) generados en ausencia (-) o presencia de 2,3 μ M de ácido fólico (AF). Las células se cultivaron durante 7 días en RPMI carente de ácido fólico con 10% de suero dializado. Se indica la media y SD de 6 donantes independientes.

Sin embargo, el AFol disminuyó significativamente los niveles de ARNm de *TNFA*, *IL6*, *CSF1* y *CCL2* tras la estimulación con LPS exclusivamente en los MØ-GM. Estos resultados indican que el AFol condiciona la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6) y quimioquinas (CCL2) en respuesta a LPS en los MØ-GM (Figura 26).

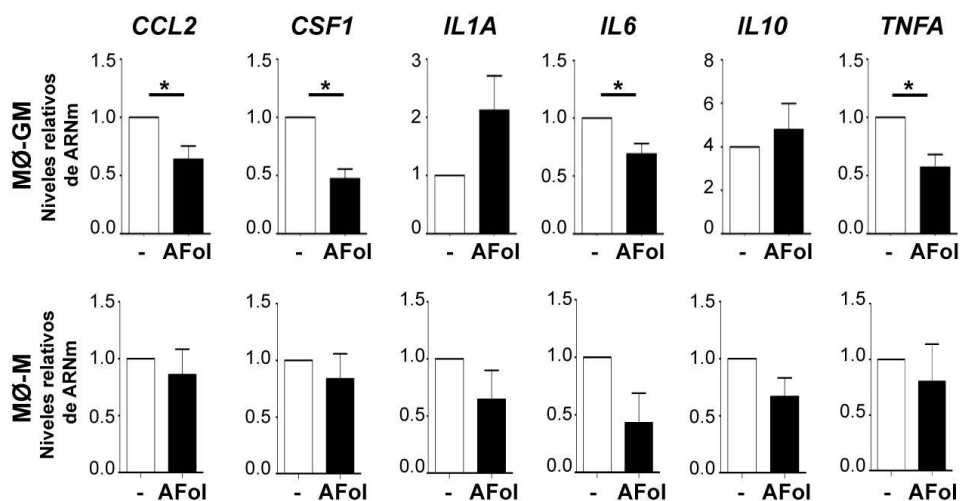


Figura 26. Efecto del ácido fólico en la expresión génica de citoquinas y quimioquinas en los MØ-GM y MØ-M en respuesta a LPS. Detección de ARNm de *CCL2*, *CSF1*, *IL1A*, *IL6*, *IL10* y *TNFA* por qRT-PCR en MØ-GM (panel superior) y MØ-M (panel inferior) generados en ausencia (-) o presencia de 2,3 μ M de ácido fólico (AFol) y estimuladas con LPS (10 ng/ml) durante las últimas 20 horas. Las células se cultivaron durante 7 días en RPMI carente de ácido fólico con 10% de suero dializado. Se indica la media y SD de 6 donantes independientes.

Efecto del antifolato metotrexato en los macrófagos

Otra aproximación que estudiaremos para determinar si existía una relación entre el metabolismo del folato y la polarización de macrófagos fue mediante el uso de antifolatos. Los antifolatos son antagonistas del ácido fólico que bloquean diferentes enzimas del metabolismo de un solo carbono. El metotrexato (MTX) es el antifolato más utilizado en clínica [88,95,96,148,149] y funciona como agente anti-proliferativo en cáncer y agente anti-inflamatorio en enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (AR). El mecanismo de acción como agente anti-proliferativo se conoce ya que MTX bloquea la proliferación de células DHFR⁺ (células tumorales) [95,150,151]. Sin embargo, el mecanismo de acción del MTX como agente anti-inflamatorio se desconoce. Como los macrófagos contribuyen en gran medida a la patología de la AR y a la progresión tumoral, se estudió la respuesta a MTX de macrófagos pro- y anti-inflamatorios a largo (7 días) y corto (24 – 48 horas) plazo.

Identificación del perfil de expresión génica de los monocitos expuestos a MTX a largo plazo

Para determinar la influencia del MTX en la diferenciación de monocito a macrófago, los monocitos se expusieron a una única dosis de MTX inmediatamente antes del proceso de diferenciación con GM-CSF o M-CSF durante 7 días (Figura 27).

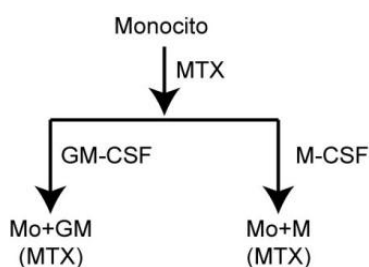


Figura 27. Representación esquemática del experimento. El MTX (5 μ M) se añadió una única vez a los monocitos recién purificados y previo a la diferenciación con GM-CSF o M-CSF. El ARNm se aisló a día 7 de diferenciación con GM-CSF (Mo+GM) o M-CSF (Mo+M).

En primer lugar, previo al análisis de expresión génica por “microarrays”, se analizó el efecto del MTX sobre la viabilidad celular de los macrófagos, los marcadores de polarización CD163 y FR- β y la secreción de citoquinas en respuesta a LPS. El MTX no modificó la viabilidad de los MØ-GM y los MØ-M (Figura 28A), ni alteró la expresión de CD163 y FR- β (Figura 28B), ni modificó la producción de TNF- α , IL-6 o

IL-10 en respuesta a LPS (Figura 28C). Estos resultados indican que el MTX no cambia la polarización de los macrófagos.

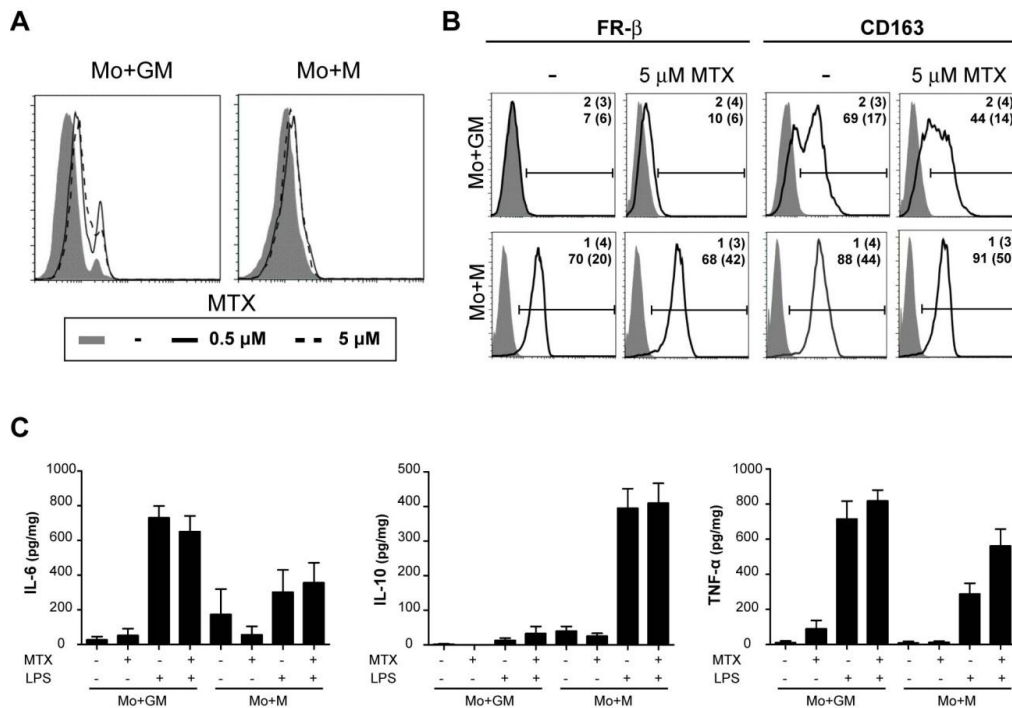


Figura 28. Caracterización de la viabilidad y del fenotipo de los Mo+GM y Mo+M tratados con MTX. A. Detección de la viabilidad celular por citometría de flujo en Mo+GM y Mo+M sin tratar (-) o tratados con MTX (0.5 y 5 μ M). Los experimentos se realizaron en 3 donantes independientes y se muestra uno representativo. **B.** Detección de FR- β y CD163 en Mo+GM y Mo+M sin tratar o tratados con MTX (5 μ M) durante 7 días por citometría de flujo. Se indica el porcentaje de células positivas y la media de intensidad de fluorescencia (entre paréntesis). Los experimentos se realizaron en 6 donantes independientes y se muestra uno representativo. **C.** Detección de IL-6, IL-10 y TNF- α por ELISA en Mo+GM y Mo+GM diferenciados en ausencia (-) o presencia de MTX (+, 5 μ M) y estimulados o no con LPS (+, 10 ng/ml) durante las últimas 24 horas.

El tratamiento prolongado con MTX resultó en la generación de un perfil transcripcional, en el que aumentó la expresión de 1200 genes y disminuyó la expresión de 824 genes en macrófagos diferenciados con GM-CSF (Mo+GM) respecto a Mo+GM sin tratar. Por el contrario, la presencia del MTX tuvo un efecto muy diferente en perfil transcriptómico de macrófagos diferenciados con M-CSF (Mo+M), en el que solo aumentó la expresión de 73 genes y disminuyó la de 10 genes (Figura 29A, Tabla 9). Estos resultados sugieren que el efecto del MTX es mayor en los (Mo+GM) en comparación con los diferenciados con M-CSF (Mo+M). La comparación entre los genes modificados por MTX en Mo+GM y Mo+M (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) indicó que 1956 genes fueron exclusivamente modulados en Mo+GM, mientras que 15 genes fueron únicamente modulados por Mo+M, y 68 genes fueron comúnmente modulados por MTX (Figura 29B).

A	Símbolo	Log ₂ FC	p-valor ajustado	Símbolo	Log ₂ FC	p-valor ajustado
Genes "upregulados" de Mo+GM	CCL20	8,6231	0,0035	AZU1	-2,8427	0,0014
	VGF	8,1866	0,0022	PDE9A	-2,8440	0,0014
	MMP10	7,8972	0,0014	HSPA6	-2,9124	0,0023
	IL24	7,0336	0,0013	TCEA3	-2,9163	0,0017
	RRAD	6,9096	0,0015	ADAMTS10	-2,9228	0,0028
	MMP1	6,8917	0,0023	RNASE3	-2,9847	0,0192
	EDN1	6,8055	0,0021	RNASE2	-2,9996	0,0161
	RND3	6,6856	0,0026	P2RY12	-3,0084	0,0024
	ABCB5	6,5076	0,0036	RNASE2	-3,0111	0,0178
	KRT23	6,4602	0,0074	ADRB1	-3,0325	0,0098
	NEURL3	6,4368	0,0052	ADSSL1	-3,0925	0,0040
	CCL4	6,3714	0,0037	NFE2	-3,1872	0,0029
	LIF	6,2426	0,0014	RNASE4	-3,2023	0,0014
	CAMK1G	5,9884	0,0047	SERPINB10	-3,2225	0,0060
	TNFSF15	5,9670	0,0013	AQP7	-3,3934	0,0019
	MET	5,9553	0,0016	TNNT3	-3,4732	0,0014
	CLDN14	5,7570	0,0037	CRH	-3,5512	0,0096
	ARC	5,7272	0,0013	LEP	-3,6789	0,0257
	RSAD2	5,6707	0,0062	AQP7P1	-3,7193	0,0027
	NEFM	5,6161	0,0013	PAGE2B	-3,9029	0,0016
ITGB1BP3	5,4469	0,0017	MTL5	-4,0766	0,0051	
SLC1A2	5,3950	0,0014	F13A1	-4,1313	0,0147	
TRAF1	5,3738	0,0013	AQP7P1	-4,2525	0,0059	
CCR7	5,3222	0,0089	WDR86	-4,4012	0,0184	
NEU4	5,2990	0,0260	ELANE	-4,6321	0,0052	
B	Símbolo	Log ₂ FC	p-valor ajustado	Símbolo	Log ₂ FC	p-valor ajustado
Genes "upregulados" de Mo+M	SPINK1	8,3725	0,0232	TROAP	-1,3137	0,0489
	VGF	7,6693	0,0238	KIF20A	-1,4715	0,0366
	IL24	7,3538	0,0211	PLK1	-1,5333	0,0399
	RRAD	6,5155	0,0489	C9orf140	-1,6176	0,0370
	INHBA	6,4291	0,0211	GUCY1A3	-1,8418	0,0485
	LCE1C	6,4208	0,0232	CLMP	-1,8434	0,0299
	AIM1L	6,2569	0,0211	GUCY1A3	-1,8480	0,0489
	HCAR3	5,5413	0,0364	CLEC4GP1	-1,8669	0,0251
	RHCG	5,4551	0,0232	CDC20	-1,9668	0,0229
	IL8	5,2479	0,0478	HIST1H1B	-2,2028	0,0232
	IL1A	5,2014	0,0392	HIST1H1D	-2,2239	0,0370
	NEU4	5,1417	0,0494			
	PLK2	5,0879	0,0478			
	NIPAL4	4,9316	0,0344			
	HES4	4,8325	0,0211			
	GDF15	4,7209	0,0485			
	GZMB	4,5576	0,0449			
	ARC	4,4585	0,0211			
	HSD3B1	4,4125	0,0428			
	MET	4,2814	0,0217			
ULBP1	4,2661	0,0211				
CD70	4,2201	0,0478				
KRT17	4,0514	0,0229				
AREG	4,0365	0,0489				
BEX2	3,9610	0,0238				

Tabla 9. Genes modificados significativamente por MTX en monocitos tratados con MTX previo a la diferenciación con GM-CSF (Mo+GM) o M-CSF (Mo+M). Los cambios significativos representados con "fold change" (FC) mayor o igual que 1 y un p valor menor de 0.05.

Los resultados obtenidos del “microarray” se analizaron con el programa “*Ingenuity Pathway Analysis*” (IPA). Las principales vías canónicas modificadas por el tratamiento con MTX en Mo+GM fueron “Maduración de células dendríticas”, “Fibrosis hepática”, “Señalización de aterosclerosis”, “Señalización en la fase de respuesta aguda”, y “Señalización alterada de células T y B en artritis reumatoide”. La vía de “Fibrosis hepática” también se modificó en Mo+M, y en éstos fueron exclusivas las vías canónicas del “Papel de las citoquinas en la comunicación entre las células inmunitarias” y “Síntesis de Serina” entre otras (Figura 29C).

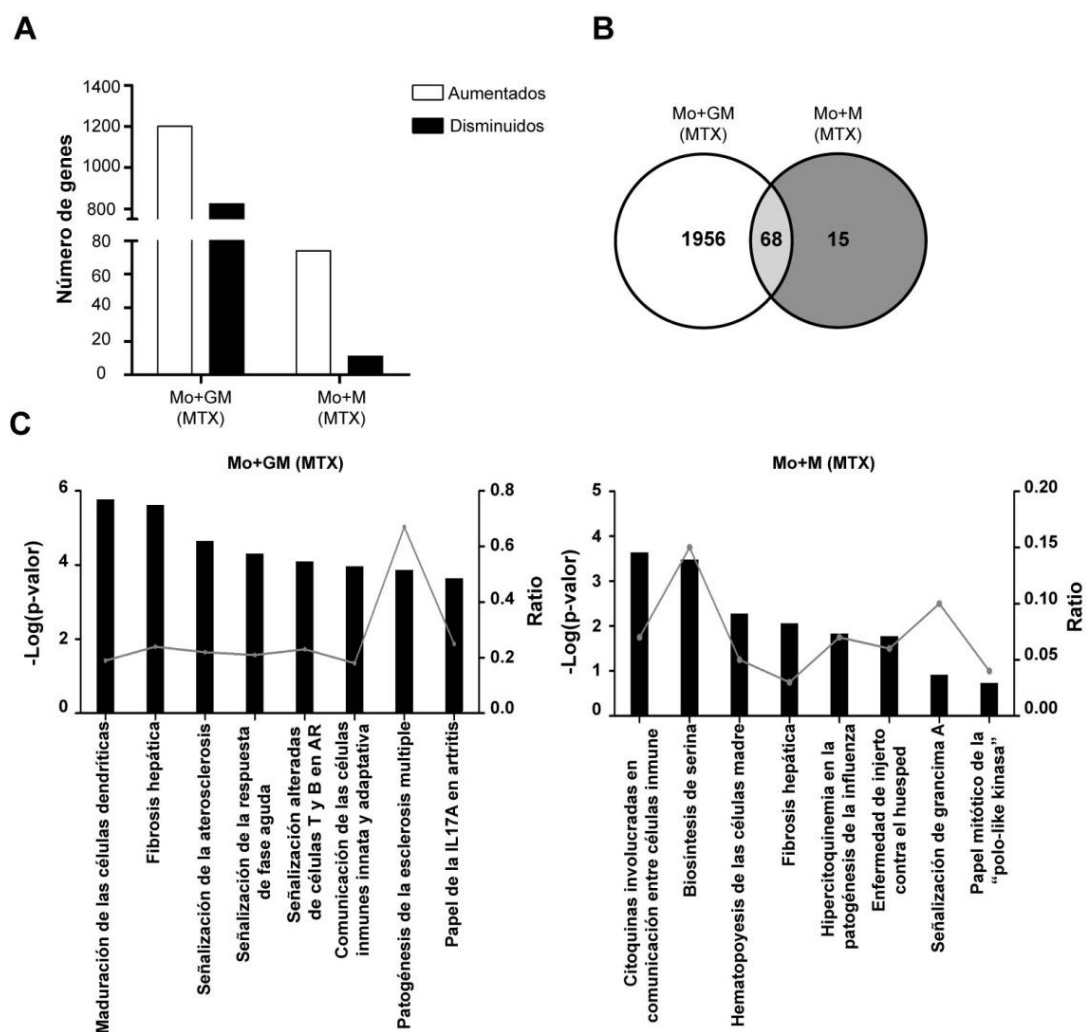


Figura 29. Determinación del perfil transcriptómico de monocitos tratados con MTX. **A.** Cuantificación y **B.** Comparación del número de genes cuya expresión cambia significativamente (p valor < 0.05 y cambio de expresión génica (FC, fold change) mayor o igual que 1) en monocitos tratados con MTX y diferenciados con GM-CSF (Mo+GM) o M-CSF (Mo+M). **C.** Análisis de las funciones moleculares enriquecidas significativamente entre el “set” de genes cuya expresión se encuentra alterada tras la exposición a MTX en Mo+GM y Mo+M.

Validación de los resultados de transcriptómica

El tratamiento con MTX resulta en la generación de macrófagos que exhiben una expresión muy aumentada de los genes *AREG*, *CCL4*, *CCL20*, *GDF15*, *IL1A*, *IL24*, *LIF* y *MET* y disminuida de *CD32* y *THBS1*. Para verificar los resultados de transcriptómica, se analizó la expresión de estos genes en 6 preparaciones independientes de monocitos expuestos a MTX y diferenciados a MØ-GM o MØ-M. El tratamiento con MTX a largo plazo resultó en el aumento de *AREG* (8.8 veces en Mo+GM y 2.4 veces en Mo+M), *CCL4* (15.32 veces Mo+GM), *CCL20* (20 veces en Mo+GM), *GDF15* (18 veces en Mo+GM y 7 veces en Mo+M), *IL1A* (6.36 veces en Mo+GM y 10.77 veces en Mo+M), *IL24* (318.89 veces Mo+GM y 682.23 veces en Mo+M), *LIF* (20 veces en Mo+GM y 4 veces en Mo+M) y *MET* (16 veces en Mo+GM y 14 veces en Mo+M) y en la disminución de *CD32* (2.2 veces en Mo+GM) y *THBS1* (50 veces en Mo+GM). En general, los cambios (veces de inducción) en la expresión génica en Mo+GM por MTX fueron mayores en comparación con los cambios en Mo+M (Figura 30). Estos resultados indican que el efecto del MTX está condicionado por el contexto de citoquinas (GM-CSF vs M-CSF). En los siguientes experimentos el estudio se centró en el *CCL20* [152], gen más altamente modificado por MTX en Mo+GM en “microarrays” y *LIF* [153,154], citoquina inmunomoduladora que pertenece a la familia del IL-6 y gen modulado por MTX en ambos tipos de macrófagos.

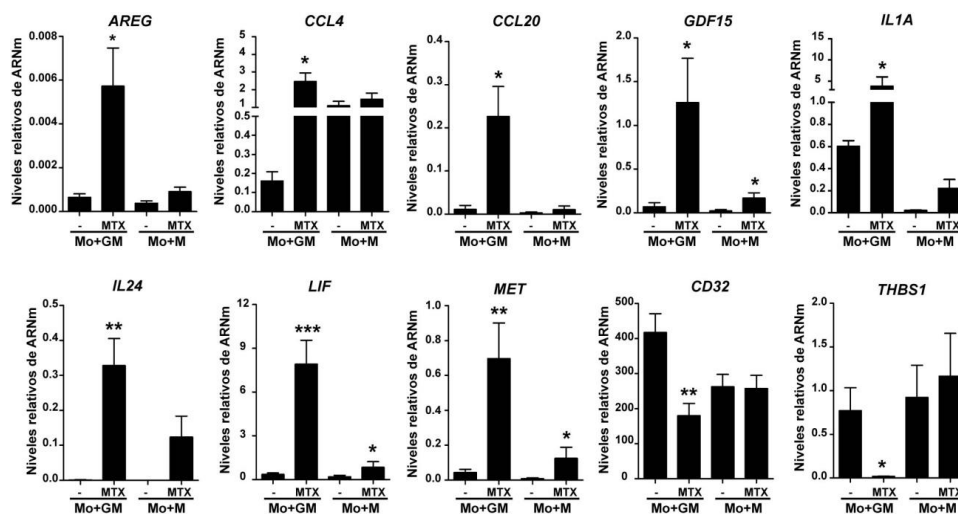


Figura 30. Validación de los cambios en la expresión génica. Detección de ARNm de *AREG*, *CCL4*, *CCL20*, *GDF15*, *IL1A*, *IL24*, *LIF*, *MET*, *CD32* y *THBS1* por qRT-PCR en monocitos diferenciados con GM-CSF (Mo+GM) o M-CSF (Mo+M) en ausencia o presencia de MTX. Se indica la media y S.E.M. de 6 donantes independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Dosis-respuesta y cinética de inducción génica durante la diferenciación de los macrófagos en respuesta a MTX

La concentración de MTX empleada en los “microarrays” fue de 5 μM , una concentración alta utilizada en pacientes con cáncer. Los estudios farmacocinéticos de MTX descritos para pacientes con AR muestran que la administración de 25 - 40 mg de MTX presenta un pico máximo de concentración de 1 - 2 μM en plasma dos horas después de la administración, y los niveles descienden a 10 - 50 nM a las 24 - 48 horas [92,155]. Se realizaron experimentos de dosis respuesta con dosis clínicamente relevantes en pacientes con AR. Se observó que la concentración de 50 nM de MTX aumenta significativamente los genes estudiados (*CCL20* y *LIF*) en Mo+GM. Por el contrario, la concentración de 5 nM de MTX no modificó la expresión de estos genes, lo que indica que el efecto del MTX en la diferenciación CSF-dependiente de monocitos empieza a 50 nM (Figura 31A). A partir de este resultado y en el resto de experimentos se utilizó la dosis de 50 nM de MTX para contextualizar con una situación de tratamiento con MTX en enfermedades auto-inmunes (AR). *CCL20* y *LIF* se detectaron en los sobrenadantes de Mo+GM expuestos a MTX, mientras que no se detectaron en Mo+M expuestos a MTX (Figura 31B).

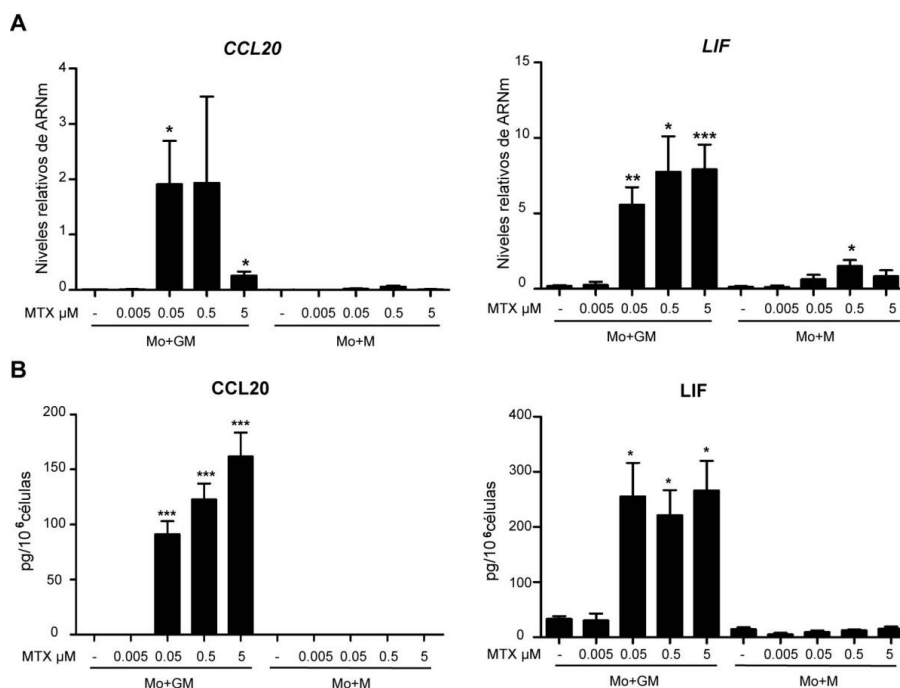


Figura 31. Dosis respuesta a MTX. Detección de *CCL20* y *LIF* por qRT-PCR y ELISA en monocitos diferenciados en presencia de la dosis indicada de MTX. MTX se añadió una única vez a monocitos y el ARNm (A) o la proteína (B) se midió a día 7 de la diferenciación por GM-CSF (Mo+GM) o M-CSF (Mo+M). Se indica la media y S.E.M. de 5 donantes independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

La suplementación con ácido fólico revertió el aumento de expresión génica y de proteína de CCL20 y LIF por MTX, indicando así la especificidad por el metabolismo del folato (Figura 32).

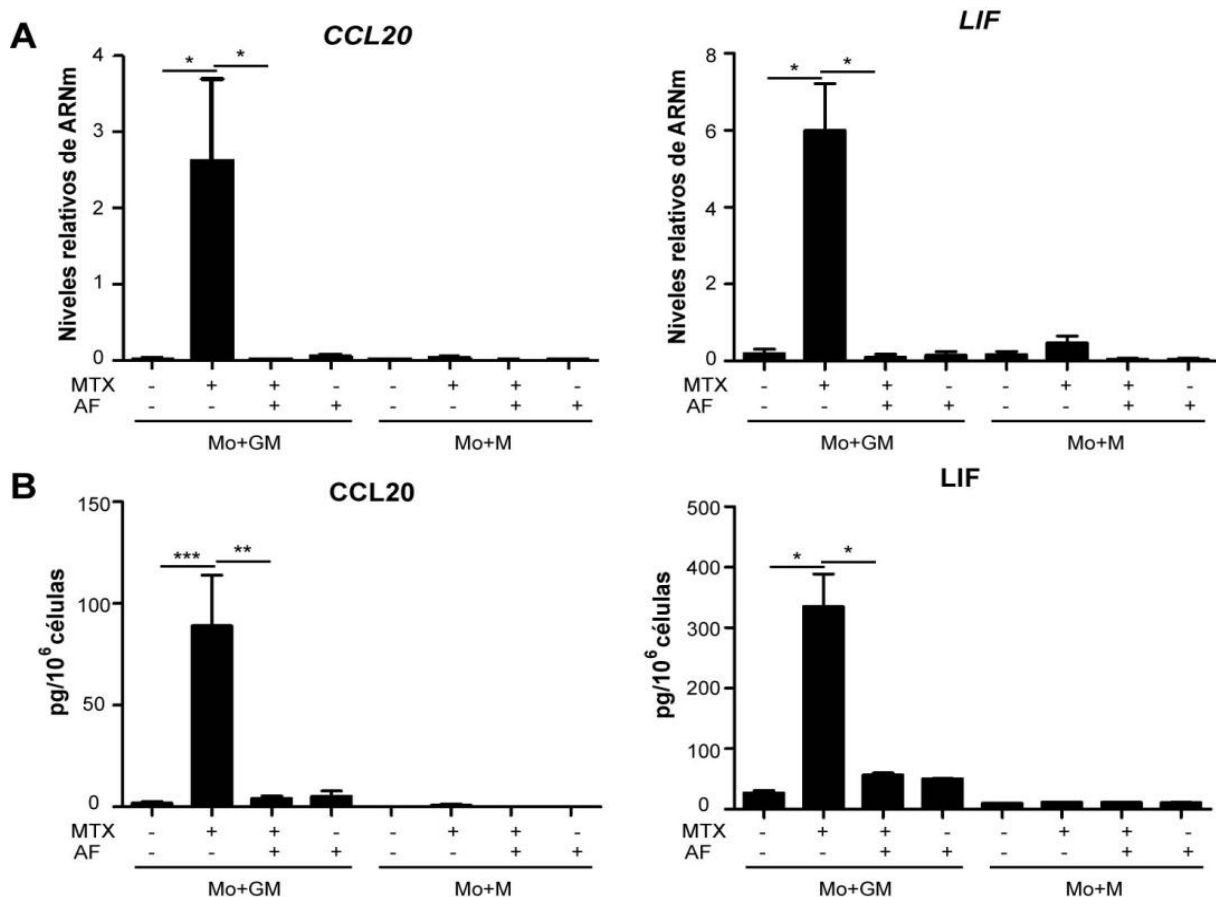


Figura 32. Competición de la respuesta a MTX con ácido fólico. Detección de CCL20 (izquierda) y LIF (derecha) por qRT-PCR (A) o ELISA (B) en monocitos diferenciados en presencia de MTX (50 nM) y ácido fólico (AF, 100 μ M). El MTX y AF se añadió una vez a monocitos y el ARNm (A) y proteína (B) se midió a día 7 de la diferenciación con GM-CSF (Mo+GM) o M-CSF (Mo+M). En A, se indica la expresión de ARNm en los MØ tratados con MTX respecto a MØ sin tratar. En B, se indican la expresión de cada proteína en MØ tratados con MTX respecto a MØ sin tratar. Se indica la media y S.E.M. de 3 donantes independientes (* p <0.05, ** p <0.01).

Los experimentos de cinética revelaron que el aumento en CCL20 y LIF ARNm y proteína tuvo lugar a día 4 - 5 tras el tratamiento con MTX y alcanzó el nivel máximo a día 7 durante la diferenciación inducida por GM-CSF (Figura 33). En su conjunto, estos resultados validan los datos obtenidos del análisis global de expresión génica e indican que CCL20 y LIF constituyen nuevos biomarcadores de respuesta a MTX en Mo+GM.

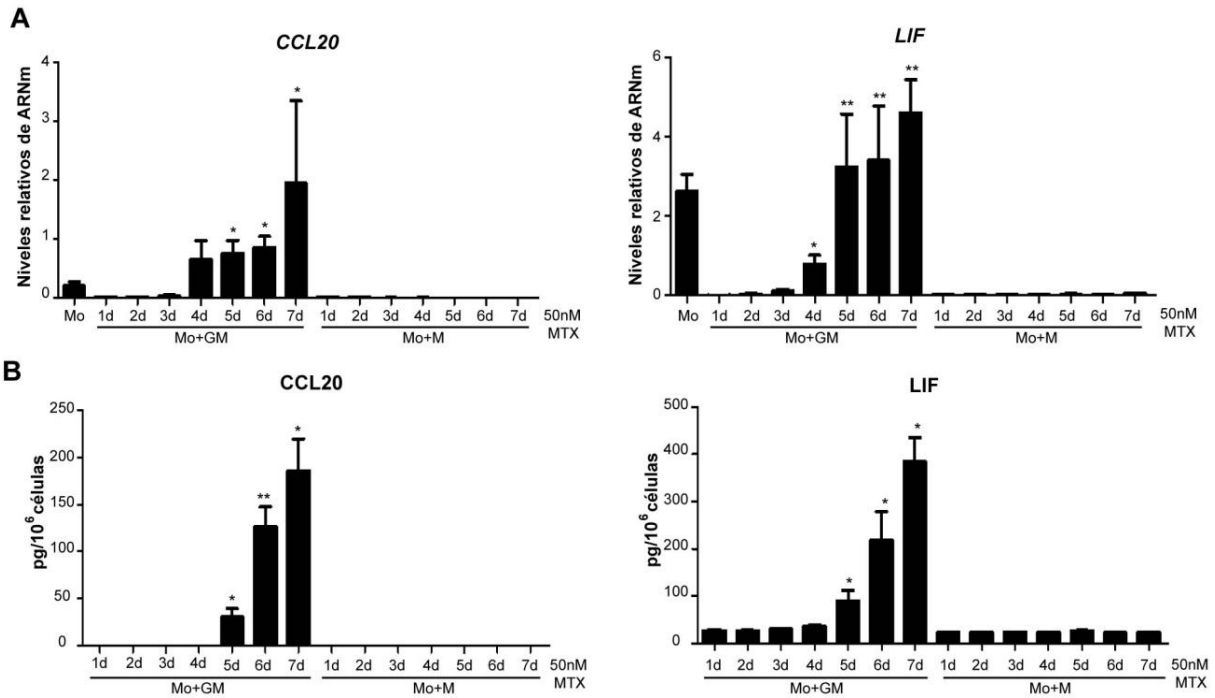


Figura 33. El MTX induce la expresión de CCL20 y LIF a día 5 de diferenciación con GM-CSF. Detección de CCL20 (izquierda) y LIF (derecha) por qRT-PCR (A) o ELISA (B) en monocitos diferenciados con GM-CSF (Mo+GM) o M-CSF (Mo+M) en ausencia o presencia de MTX (50 nM). El MTX se añadió una única vez a monocitos, y los niveles de ARNm (A) o proteína (B) se midieron en los tiempos indicados (d, días). En A, los resultados indican la expresión de ARNm en MØ tratados con MTX en relación a MØ sin tratar en cada tiempo. En B, los resultados indican la expresión de cada proteína en MØ tratados con MTX en relación a MØ sin tratar en cada tiempo. Se indica la media y S.E.M. de 4 donantes independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Efecto de MTX a corto plazo en monocitos y macrófagos. Base molecular de la respuesta diferencial a MTX en los MØ-GM y MØ-M

Para explorar la base molecular de la respuesta diferencial a MTX, se realizaron experimentos de respuesta a MTX a tiempos cortos en monocitos y macrófagos completamente diferenciados MØ-GM y MØ-M, y en células de otro linaje como fibroblastos y epitelio. Los monocitos, MØ-GM, MØ-M, fibroblastos y HEK 293T se expusieron a un tratamiento corto de MTX (24 - 48 horas) y se analizó la expresión génica de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* por qRT-PCR. El MTX incrementó significativamente los niveles de expresión de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* después de una exposición de 24 horas, y el efecto se vio aumentado a las 48 horas en MØ-GM. Por el contrario, el MTX no modificó la expresión de los genes ni en monocitos, MØ-M (Figura 34A), fibroblastos o células HEK 293T (Figura 34B). Estos resultados indican que existe una respuesta diferente a MTX en monocitos y macrófagos, y evidencian de un efecto contexto y diferenciación-dependiente de MTX en células mieloides.

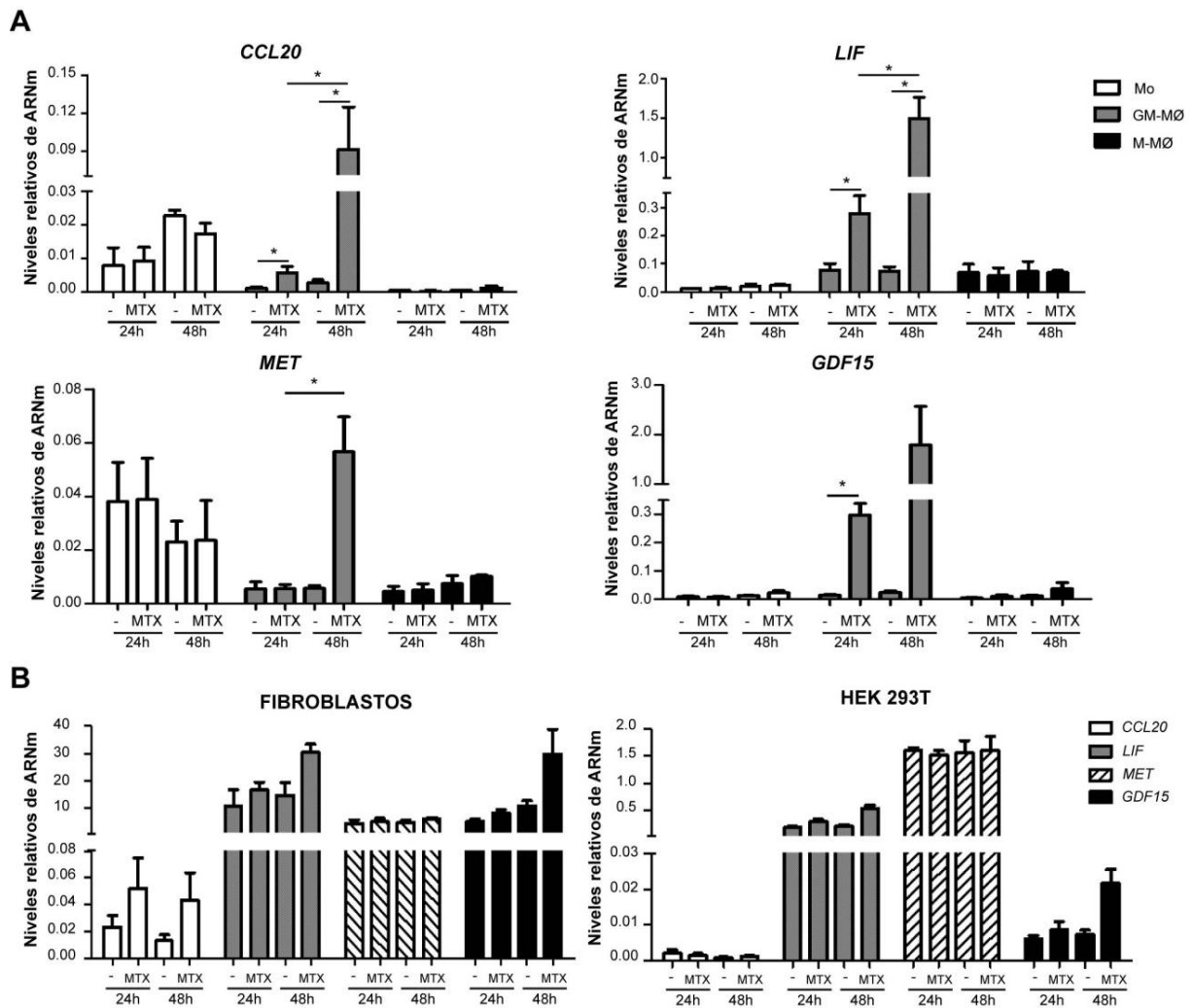


Figura 34. Respuesta a MTX en monocitos, MØ, fibroblastos y células HEK 293T durante 24 y 48 horas. A. Detección de ARNm de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* por qRT-PCR en monocitos, MØ-GM y MØ-M en ausencia (-) o presencia del MTX (MTX, 50 nM) durante 24 ó 48 horas. Se indica la media y S.E.M. de 6 donantes independientes (* $p < 0.05$). **B.** Detección de ARNm de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* por qRT-PCR en fibroblastos y células HEK 293T en ausencia (-) o presencia (+) de MTX durante 24 ó 48 horas. Se indica la media y S.E.M. de 6 donantes independientes (* $p < 0.05$).

Como ya se describió anteriormente la internalización del MTX es similar en los MØ-GM y MØ-M (Figura 19). La concentración intracelular de MTX resultó ser similar también en los MØ-GM y MØ-M (Figura 35), indicando que la respuesta diferencial a MTX en los macrófagos no es debido a la expresión diferencial de los transportadores de folato/MTX.

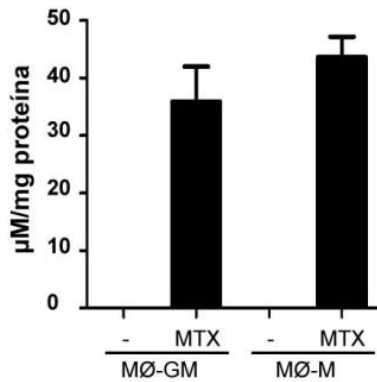


Figura 35. Detección de la concentración intracelular de MTX por HPLC en los MØ-GM y MØ-M tratados con MTX (50 nM) durante 48 horas.

El MTX y, en particular, el MTX poliglutamado (MTX-Pgl) inhibe varias enzimas implicadas en el metabolismo del folato (DHFR, TS (codificada por el gen *TYMS*) GART y ATIC) [96,156]. Se analizó la expresión de las enzimas implicadas en el metabolismo del folato/MTX (Figura 36A) en los monocitos, MØ-GM y MØ-M para determinar si había diferencias en su expresión que explicasen la respuesta diferencial a MTX en los monocitos, MØ-GM y MØ-M. La expresión de las enzimas *FPGS* y *MTHFR* fue significativamente mayor en monocitos que en macrófagos mientras que *ATIC* ARNm se expresó de manera diferente en los MØ-GM y MØ-M, y los niveles de *DHFR* ARNm se mantuvieron constantes. Timidilato sintasa (*TYMS*) fue la única enzima cuya expresión fue significativamente diferente entre las tres poblaciones mieloides (Figura 36B) y cuya expresión fue mayor en los MØ-GM que en los MØ-M y los monocitos, a nivel de ARNm y proteína (Figura 36D). Este resultado sugiere que la respuesta diferencial a MTX en los MØ-GM y MØ-M podría derivar de la diferencia en expresión de TS, una hipótesis que se estudia a continuación.

La expresión de timidilato sintasa (TS) condiciona la respuesta a MTX en los macrófagos

Para desarrollar esta hipótesis se estudió el papel de TS en respuesta a MTX en los macrófagos alterando su función o expresión. En primer lugar, se usaron otros antifolatos como pemetrexed (PMX) [88] y raltitrexed (ZD1694), potentes inhibidores de TS [157]. PMX y ZD1694 incrementaron significativamente la expresión de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* en los MØ-GM, indicando que la inhibición de la actividad enzimática de TS contribuye a la respuesta a antifolatos (MTX, PMX y ZD1694) en los MØ-GM (Figura 37A). En segundo lugar, se determinaron los cambios en la expresión génica inducida por MTX o PMX en presencia de timidina en los MØ-GM. La suplementación con timidina disminuyó significativamente el aumento en la expresión de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* dependiente de MTX o PMX (Figura 37B). Finalmente, y para confirmar que los cambios en expresión génica inducidos por MTX dependen de la inhibición de TS, se determinó el efecto del silenciamiento de la expresión de TS en MØ-GM utilizando dos siARN diferentes para *TYMS*. El “knock down” de TS aumentó significativamente los niveles de expresión de *CCL20*, *LIF*, *GDF15* y *MET*, mientras que la expresión de *SLC19A1* (gen control que no se modifica por MTX) se mantuvo constante (Figura 37C). Además, la inducción génica por MTX y PMX disminuyó significativamente (70 – 80%) en MØ-GM silenciados para TS, confirmando esta hipótesis (Figura 37D, E).

Por último, se encontró una correlación entre la expresión de TS durante la diferenciación de macrófagos y la respuesta a MTX. Los experimentos de cinética mostraron que el ARNm y la proteína de *TYMS* se detecta a día 3 de diferenciación con GM-CSF (Figura 37F), mientras que la respuesta a MTX (inducción de *CCL20* y *LIF*) comienza a día 4 observando así una correlación entre la expresión de la TS en macrófagos y la respuesta a MTX.

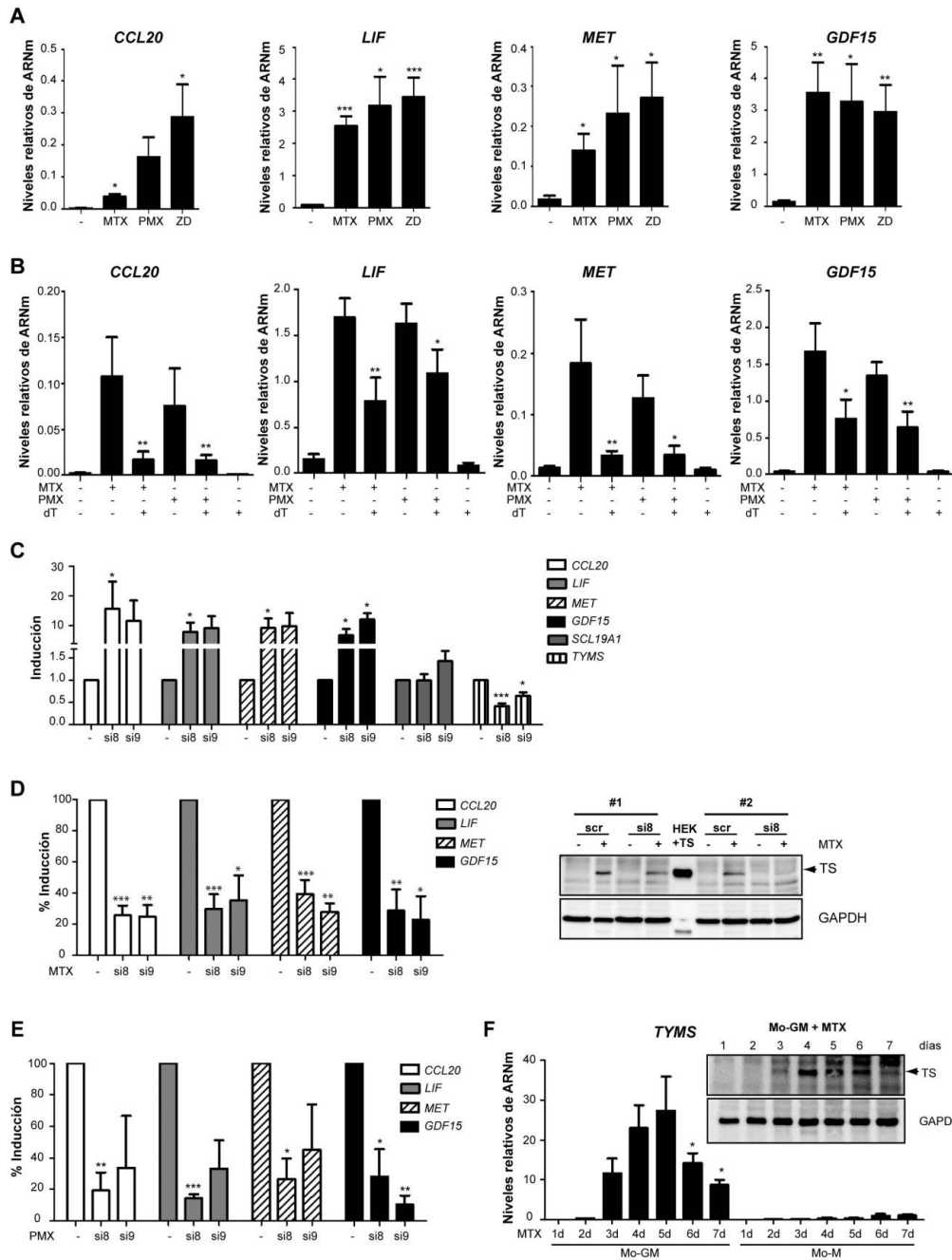


Figura 37. La expresión de timidilato sintasa (TS) condiciona la respuesta a MTX en los macrófagos. A. Detección de ARNm de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* por qRT-PCR en MØ-GM en ausencia (-) o presencia de MTX (50 nM), PMX (50 nM) y ZD1694 (ZD, 50 nM) durante 48 horas. Se indica la media y S.E.M. de 7 donantes independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **B.** Detección de ARNm de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* por qRT-PCR en MØ-GM en ausencia (-) o presencia de MTX (50 nM), PMX (50 nM) y timidina (dT, 10 μ M) durante 48 horas. Se indica la media y S.E.M. de 8 donantes independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **C.** Detección de de ARNm de *CCL20*, *LIF*, *MET*, *GDF15*, *SCL19A1* y *TYMS* por qRT-PCR en MØ-GM transfectados con el siARN control (-) o dos siARN distintos para *TYMS* (si8, si9). Los valores en presencia de siARN control se normalizaron a 1 (n=8, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). **D y E.** A la izquierda, detección de ARNm del *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* por qRT-PCR en MØ-GM transfectados con el siARN control (-) y dos siARN distintos para *TYMS* (si8, si9) y tratados con MTX (**D**, 50 nM) o PMX (**E**, 50 nM). Los valores en presencia de siARN control se normalizaron a 100 (n=8 (si8), n=5 (si9), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). A la derecha, detección de TS por "Western blot" en MØ-GM transfectados con el siARN control (scr) y dos siARN distintos para la *TYMS* (si8, si9) en ausencia (-) o presencia de MTX (+, 50 nM). Los niveles de GAPDH se muestran como control de carga. **F.** Detección de ARNm de *TYMS* por qRT-PCR en monocitos y durante la diferenciación a MØ-GM o MØ-M en los tiempos indicados (d, días) y en presencia de MTX (50 nM). El MTX se añadió a monocitos previo a la diferenciación. Se indica la media y S.E.M. de 4 donantes independientes (* $p < 0.05$). En la parte superior de la gráfica, detección de TS por "Western blot" en MØ-GM en los tiempos indicados (días) en presencia de MTX (50 nM). Los niveles de GAPDH se muestran como control de carga.

La expresión de otras enzimas implicadas en el metabolismo del folato/MTX (*DHFR*, *MTHFR*, *GART*, *ATIC*, *FPGS* y *GGH*) se mantuvo constante durante la diferenciación (Figura 38). En su conjunto, estos resultados confirman que la respuesta a MTX en macrófagos depende de los niveles de expresión de TS.

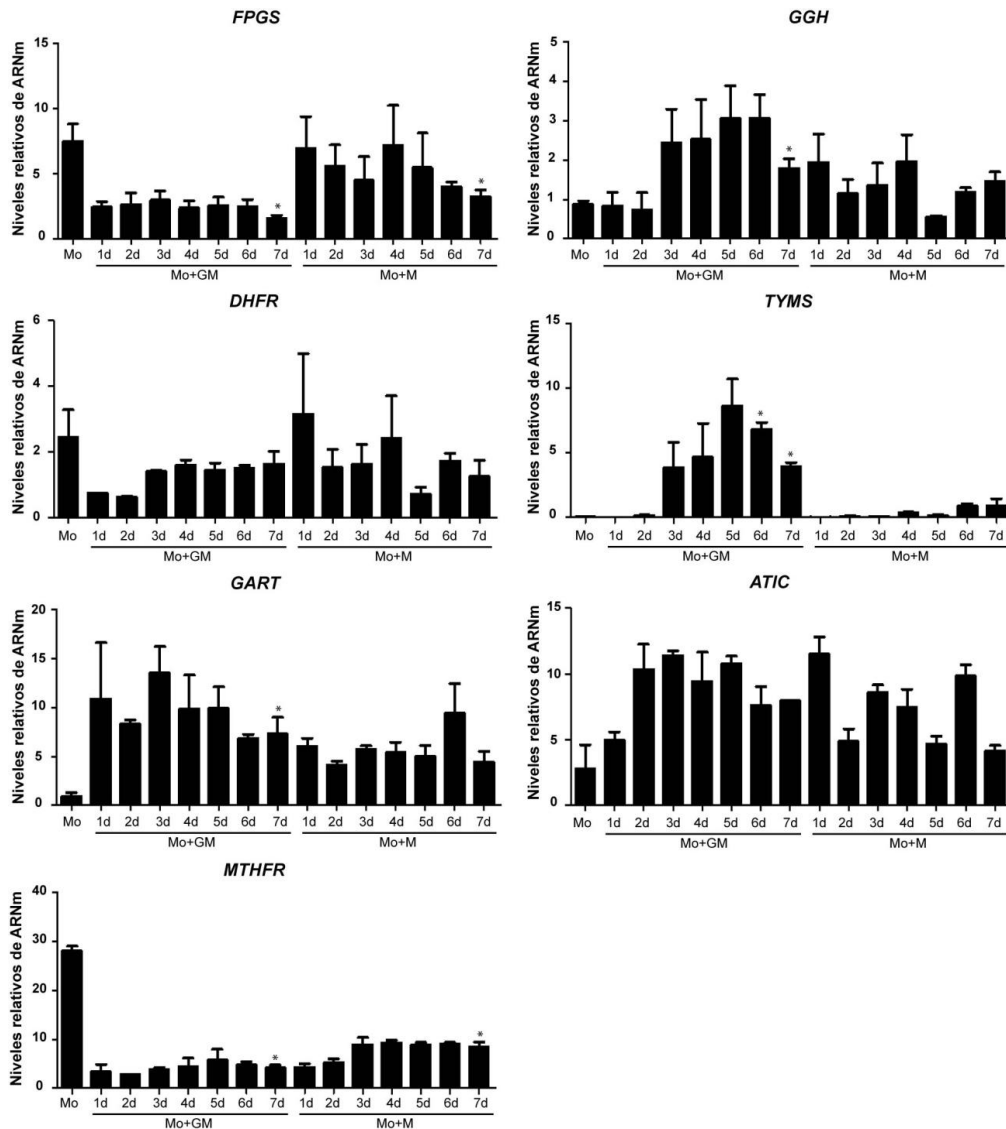


Figura 38. Expresión de las enzimas del metabolismo del folato/MTX durante la diferenciación de monocito a MØ-GM y MØ-M. Detección de ARNm de *FPGS*, *GGH*, *DHFR*, *TYMS*, *GART*, *ATIC* y *MTHFR* por qRT-PCR en monocitos y durante la diferenciación a MØ-GM y MØ-M en los tiempos indicados (d, días). Se indica la media y S.E.M. de 4 donantes independientes (* $p < 0.05$).

Expresión de timidilato sintasa (TS) en los macrófagos de tejido sinovial de AR

Como se muestra más adelante (Figura 45), los macrófagos de las articulaciones de AR exhiben un perfil de polarización GM-CSF-dependiente a nivel transcriptómico y

fenotípico. Los macrófagos de las articulaciones de AR representan una diana celular de MTX y por ello se determinó la expresión de TS en los macrófagos de membrana sinovial de articulaciones de pacientes con AR y articulaciones control. La TS se detectó en macrófagos CD163⁺/TNF- α ⁺ localizados en el “sublining” de la membrana sinovial de pacientes con AR. Por el contrario, los macrófagos CD163⁺ de tejido sinovial control no expresaron TS ni TNF- α (Figura 39A, B). En concordancia con estos resultados, los macrófagos generados *in vitro* tratados con TNF- α mantuvieron la expresión de *TYMS* y la respuesta a MTX (inducción de *CCL20* y *LIF*). Este efecto no se observó con otros estímulos pro-inflamatorios (IFN- γ) o anti-inflamatorios (IL-4) (Figura 39D). Estos resultados indican que los macrófagos del tejido sinovial de la AR representan una diana celular para el MTX.

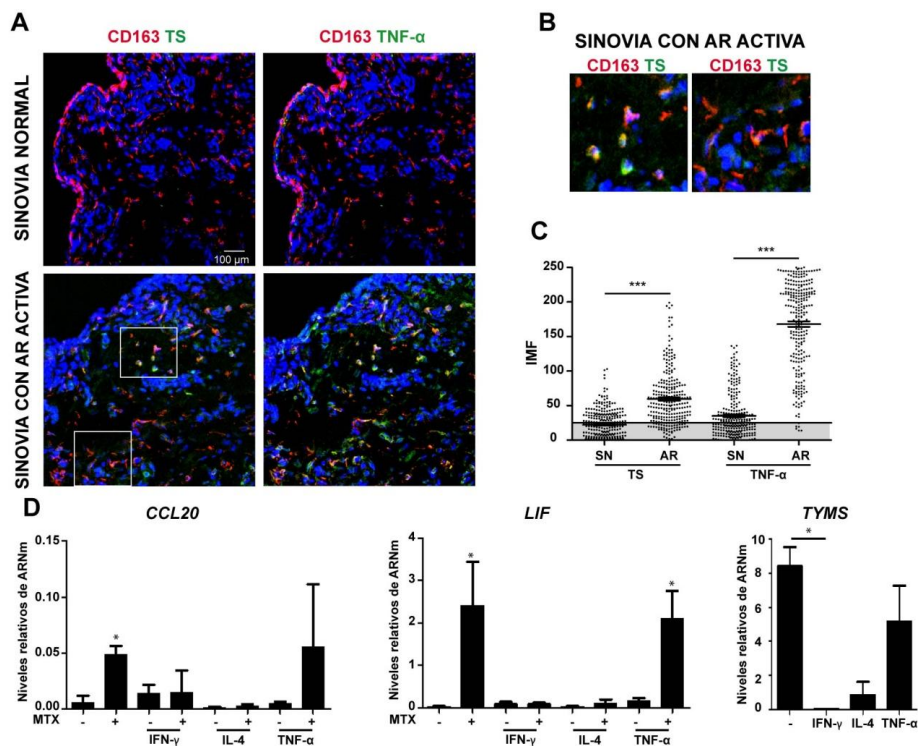


Figura 39. Expresión de TS en los macrófagos de membrana sinovial control y de pacientes con AR. A. Detección de CD163 (rojo), TS (verde, izquierda) y TNF- α (verde, derecha) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en membrana sinovial control (arriba) y de pacientes con AR activa (abajo). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Los experimentos se realizaron en 6 donantes independientes, y se muestra un experimento representativo. Escala, 100 μ m. **B.** Aumento (20x) de las áreas recuadradas en las membranas sinoviales con AR (A). **C.** Se calculó la media de intensidad de fluorescencia (u.a.) de TS y el TNF- α en las regiones de interés (ROIs) dibujadas alrededor de cada macrófago CD163⁺ (descartando el fondo) en la membrana sinovial control (SN) y de pacientes con AR activa (AR). Se cuantificaron entre 150 y 300 células en cada muestra de tejido. Se representa la media \pm S.E.M de 6 donantes independientes (>3 campos/muestra elegidos al azar), y se considera células positivas aquellas que presentaron valores superiores a 25 u.a. (***) $p < 0.001$. **D.** Detección de ARNm de *CCL20*, *LIF* y *TYMS* por qRT-PCR en MØ-GM diferenciadas con IFN- γ , IL-4 o TNF- α durante 48 horas y en ausencia (-) o presencia (+) de MTX (+, 50 nM, 48h). Se indica la media y S.E.M. de 4 donantes independientes (* $p < 0.05$).

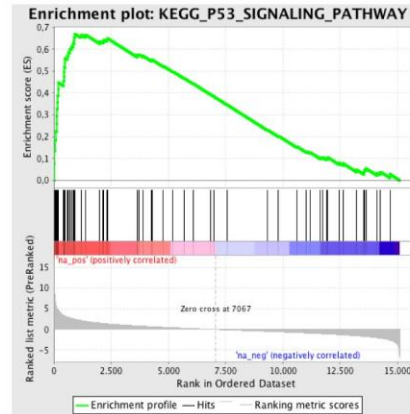
La inhibición de TS modula la expresión génica dependiente de p53 en los MØ-GM

Las vías moleculares implicadas en el transcriptoma dependiente de MTX se estudiaron mediante el programa Ingenuity Pathway (IPA). TP53 aparece como el principal regulador “upstream” de los genes modulados por MTX a largo plazo (diferenciación con GM-CSF y M-CSF) y a corto plazo (48 horas en MØ-GM) y con un estado predictivo de activación (Figura 40A). El “gene set enrichment analysis” (GSEA) de macrófagos tratados con MTX durante 48 horas (Figura 40B) mostró un enriquecimiento en la firma génica de p53. Los análisis bioinformáticos (IPA, GSEA) y el hecho de que la inhibición de TS aumente la expresión génica de *LIF*, *CCL20*, *MET* y *GDF15*, genes diana del p53 [158,159], nos condujo a explorar la conexión que existía entre la inhibición de TS (MTX, PMX) y la activación de p53 en los MØ-GM. Los resultados de la Figura 40C muestran que el bloqueo de p53 con pifitrina- α (PFT, inhibidor reversible de p53) disminuyó significativamente la respuesta a MTX (*CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15*) en MØ-GM. Por otro lado, la activación de p53 con nutlina-3 (antagonista de mdm2 y activador de p53) aumentó la expresión de dichos genes tanto en los MØ-GM como en los MØ-M (Figura 40D) [159], lo que indica que la relación entre la activación de p53 y la expresión génica mediada por el MTX depende de la expresión de TS. Para analizar la relación entre TS y p53 más en detalle, se silenció la expresión de TS con siARN en presencia de PFT (Figura 40E). Se observó que el aumento en la expresión de los genes *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* por el silenciamiento de TS disminuyó significativamente con p53 bloqueada por PFT. La expresión de otros genes como *SLC19A1* se mantuvo constante durante todos los tratamientos. Estos resultados indican que la inhibición de TS en MØ-GM modula p53 y sus genes diana en respuesta al MTX.

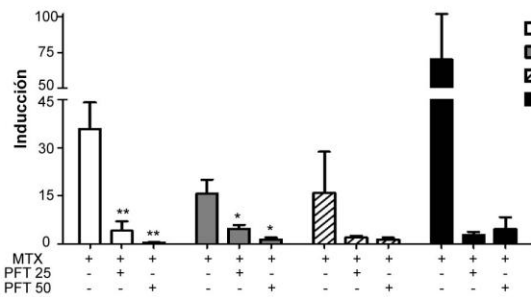
A

Regulador "Upstream"	p valor	Estado predictivo de activación	Condiciones
TP53	1,02 e-18	Activada	Mo+GM
STAT3	1,73 e-13	-	Mo+GM
PPARG	1,39 e-11	-	Mo+GM
7 d MTX			
TP53	6,73 e-10	Activada	Mo+M
MUC1	4,51 e-06	-	Mo+M
NR3C1	8,72 e-06	Inhibida	Mo+M
48h MTX			
TP53	1,48 e-12	Activada	MØ-GM
NR3C1	3,37 e-11	Inhibida	MØ-GM
TP63	6,83 e-11	Activada	MØ-GM

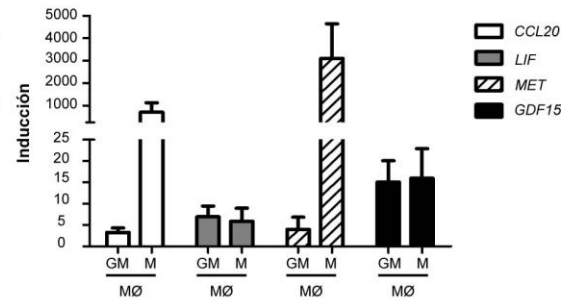
B



C



D



E

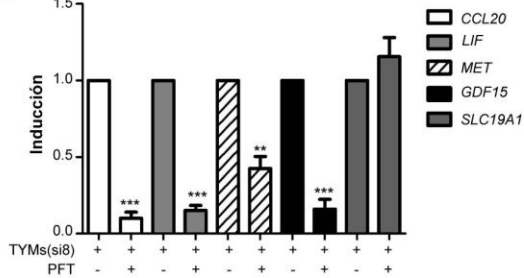


Figura 40. Bases moleculares de la respuesta a MTX en los MØ-GM: TP53. **A.** Tabla con los "top upstream regulators" en monocitos expuestos a MTX y diferenciados con GM-CSF o M-CSF durante 7 días y MØ-GM expuestos a MTX (50 nM) durante 48 horas. **B.** El "Gene set enrichment analysis" (GSEA) indica un enriquecimiento en la vía de señalización de p53 en MØ-GM tratados con MTX durante 48 horas. **C.** Detección de ARNm de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* por qRT-PCR en MØ-GM tratados con MTX (MTX, 50 nM) y pifitrina- α (PFT, 25 μ M ó 50 μ M) durante 48 horas. Se indica la media y S.E.M. de 6 donantes independientes (* p <0.05, ** p <0.01). **D.** Detección de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15* por qRT-PCR en MØ-GM y MØ-M tratados con nutlina-3 (10 μ M) durante 48 horas. Se indica la media y S.E.M. de 6 donantes independientes. **E.** Detección de ARNm de *CCL20*, *LIF*, *MET*, *GDF15* y *SLC19A1* por qRT-PCR en MØ-GM transfectados con el siARN control (-) o siARN para *TYMS* en ausencia o presencia de PFT (50 μ M). La inducción representa la expresión de cada gen en células transfectadas con siARN *TYMS* respecto a siARN control y sin tratar o tratadas con PFT. Media y S.E.M. de 6 donantes independientes (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

En el contexto de la AR, p53 se detectó en macrófagos CD163⁺ de las articulaciones de AR y no de articulaciones control (Figura 41). En su conjunto, estos resultados indican que la respuesta a MTX en los macrófagos es polarización dependiente y está determinada por el eje TS-p53.

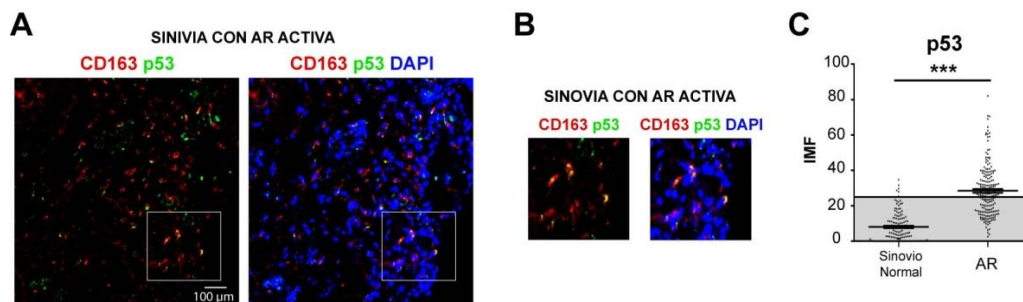


Figura 41. Expresión de p53 en macrófagos de membrana sinovial control y de pacientes con AR. A. Detección de CD163 (rojo) y p53 (verde) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en membrana sinovial de pacientes con AR activa. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Los experimentos se realizaron en 3 donantes independientes, y se muestra un experimento representativo. Escala, 100 μ m. **B.** Aumento (20x) de las áreas recuadradas en las membranas sinoviales con AR (E). **C.** Se calculó la media de intensidad de fluorescencia (u.a.) del p53 en las regiones de interés (ROIs) dibujadas alrededor de cada macrófago CD163⁺ (descartando el fondo) en la membrana sinovial control (Sinovia normal) y de pacientes con AR activa (AR). Se cuantificaron entre 150 y 300 células en cada muestra de tejido. Se representaron la media \pm S.E.M. de 3 donantes independientes (>3 campos/muestra elegidos al azar), considerando células positivas aquellas que presentan valores superiores a 25 u.a. (***) $p < 0.001$.

Se ha demostrado que los macrófagos de articulaciones de AR y no de articulaciones sanas expresan TS y son diana del MTX. A continuación caracterizamos en profundidad el estado de polarización de los macrófagos en AR.

Caracterización fenotípica de las células CD14⁺ de líquido sinovial de artritis reumatoide (AR)

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica cuya patogenia y severidad se correlaciona con la presencia de citoquinas pro-inflamatorias derivadas de macrófagos en el tejido sinovial inflamado [115,124]. Las citoquinas generadas por macrófagos aceleran el proceso patológico de la AR y son diana terapéutica [160]. Como paso preliminar para determinar el estado de polarización de macrófagos en AR (M \emptyset -AR), se aislaron células CD14⁺ del líquido sinovial (LS) de 9 pacientes con AR activa. Se analizó la expresión de los marcadores de polarización en superficie celular (descritos en la Figura 11) por citometría de flujo. La expresión de marcadores característicos de M \emptyset -M, CD163 y FR- β , fue baja en M \emptyset -AR. Por el contrario, los M \emptyset -AR mostraron alta expresión de CD50 (ICAM3), expresado más en los M \emptyset -GM que en los M \emptyset -M [161], de CD36 y no expresaron CD209 (DC-SIGN) [141] (Figura 42B, C) marcador cuya expresión caracteriza macrófagos polarizados con IL-4 [38,162] o M \emptyset -M [141]. Este perfil de citometría indica que los M \emptyset -AR aislados del LS presentan bajos niveles de los marcadores de membrana que caracterizan a los M \emptyset -M o anti-inflamatorios.

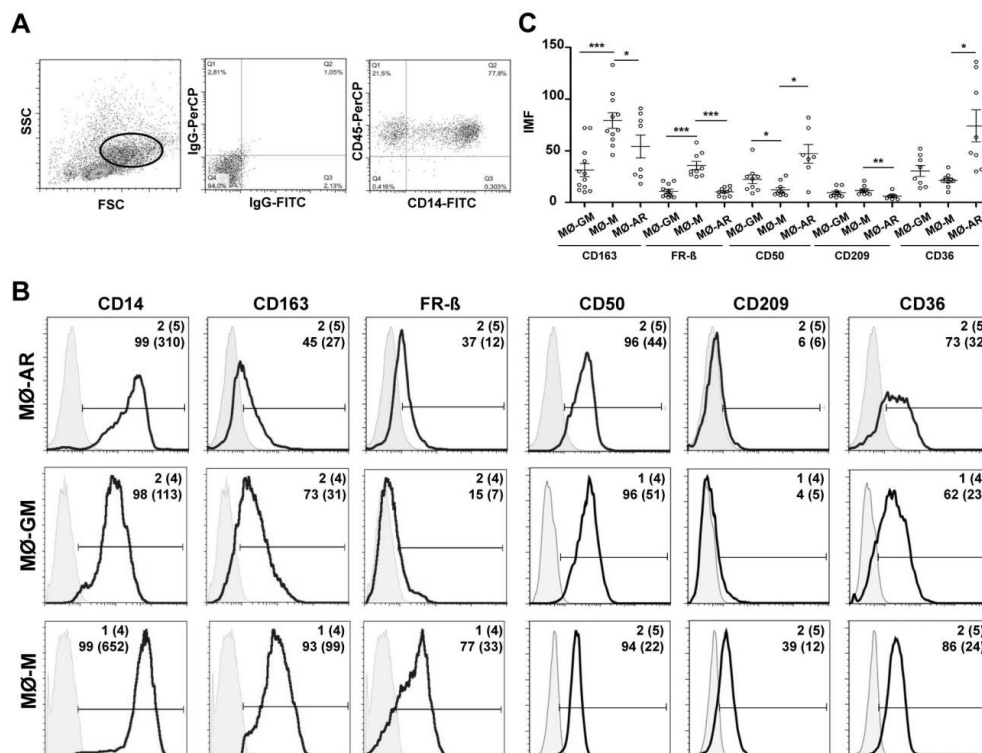


Figura 42. Caracterización fenotípica de las células CD14⁺ aisladas del líquido sinovial (LS) de pacientes con AR. A. Análisis por citometría de flujo de células mononucleares aisladas del LS de un paciente con AR indicando el FSC/SSC y en la región seleccionada la expresión de CD14⁺/CD45⁺ y su control de isotipo. **B.** Detección de CD14, CD163, FR-β, CD50, CD209 y CD36 por citometría de flujo en células CD14⁺ aisladas del líquido sinovial de pacientes con AR activa, comparándolo con MØ-GM y MØ-M generados *in vitro*. Se indica el porcentaje de células positivas y la media de intensidad de fluorescencia (entre paréntesis). Los histogramas con fondo gris marcan la fluorescencia de las células en presencia de anticuerpos control. Los experimentos se realizaron en 9 donantes independientes de pacientes de AR, y se muestra un representativo. **C.** Representación de la media de intensidad de fluorescencia de CD163, FR-β, CD50, CD209 y CD36 en células CD14⁺ aisladas del líquido sinovial de pacientes con AR activa (MØ-AR; n=9), macrófagos MØ-GM (n=8) y MØ-M (n=9) generados *in vitro*. Se indica la media y la SD (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Caracterización transcriptómica de los macrófagos de líquido sinovial de AR

Previamente se han identificado genes cuya expresión es capaz de diferenciar macrófagos polarizados por las citoquinas GM-CSF (MØ-GM, pro-inflamatorios) de M-CSF (MØ-M, anti-inflamatorios) [48,50,163]. Dado que ambas citoquinas contribuyen a la patogénesis de la AR [133,163], se determinó el estado de polarización de MØ-AR analizando la expresión de dichos genes en 9 muestras de células CD14⁺ aisladas de líquido sinovial de AR y comparándolas con la expresión en 4 muestras de células CD14⁺, aisladas *ex vivo* de ascitis tumoral (TAM) y diferentes muestras de MØ-GM y MØ-M obtenidas *in vitro*. Como se ilustra en la

Figura 43, la agrupación jerárquica no supervisada de los genes de los MØ-AR mostró mayor proximidad con los genes de los MØ-GM que con los de los MØ-M.

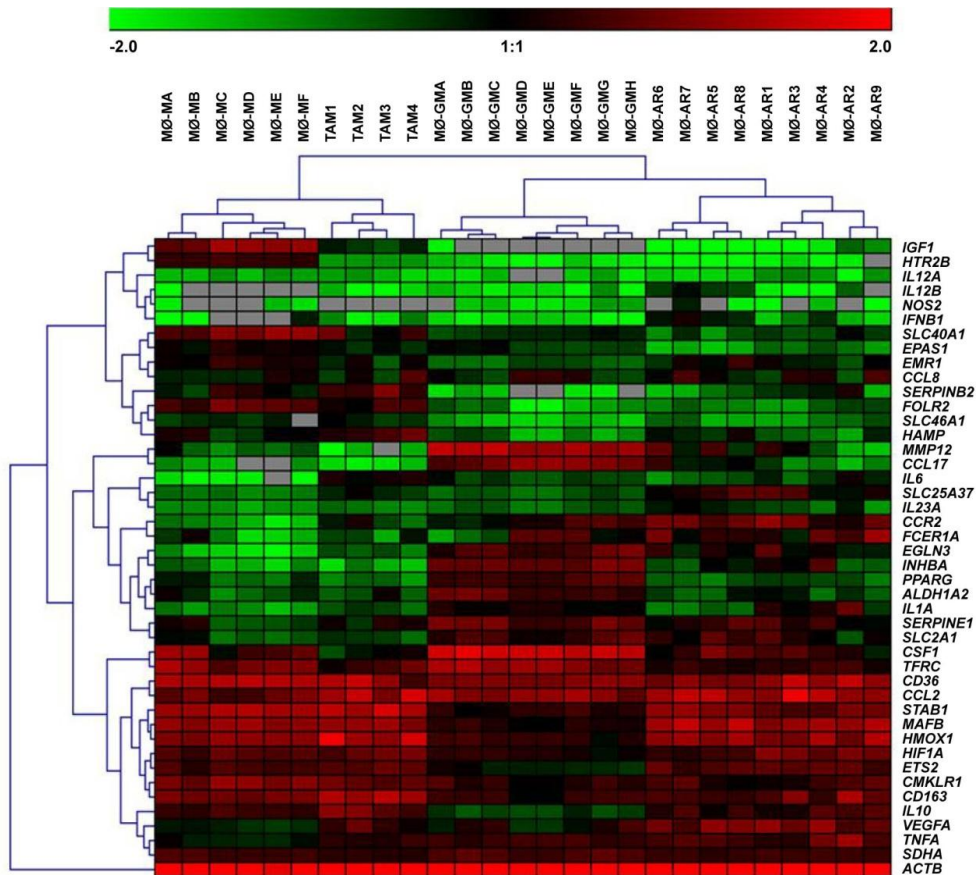


Figura 43. Perfil de expresión génica de MØ-AR. Agrupación jerárquica no supervisada (*Genesis software*: http://genome.tugraz.at/genesisclient/genesisclient_description.shtml) que muestra el nivel de expresión génica de los genes indicados en MØ-GM (MØ-GM, A-H), MØ-M (MØ-M, A-F) generados *in vitro*, células CD14⁺ aisladas *ex vivo* de ascitis tumoral de 4 pacientes (TAM, macrófagos asociados a tumor 1-4), y células CD14⁺ aisladas *ex vivo* de líquido sinovial de 9 pacientes con AR (MØ-AR, 1-9).

Los MØ-AR de LS exhibieron una expresión moderada/alta de los marcadores característicos de los MØ-GM (*TNFA* e *IL23A*), pero carecieron de la mayoría de marcadores anti-inflamatorios de MØ-M (*IGF1* y *HTR2B* (receptor de serotonina 2B)) (Figura 44). Los niveles de expresión de los genes asociados a MØ-GM, *MMP12*, *EGLN3* (PHD3), *INHBA* (inhibina A), *CCR2*, *FCER1A* y *SLC2A1* fueron significativamente mayores en los MØ-AR de LS que en los MØ-M generados *in vitro* (Figura 44A). Al contrario, los MØ-AR presentaron bajos niveles de expresión de *FOLR2* y *CD36* (Figura 44A), lo que concuerda con los datos previos de expresión por citometría de flujo (Figura 42B), *STAB1*, *SLC40A1* (ferroportina 1) y *CMKLR1* que los MØ-M generados *in vitro* (Figura 44). Estos resultados indican que los MØ-AR de LS muestran un perfil génico similar a los MØ-GM pro-inflamatorios, hallazgo

que concuerda con la correlación existente entre el número de macrófagos en el tejido sinovial y la gravedad de la enfermedad [129].

Está descrito que los macrófagos asociados a tumor (TAM) muestran un perfil de polarización similar a los macrófagos anti-inflamatorios durante la progresión tumoral [38,47,164]. A diferencia de los MØ-AR, el perfil génico de los TAMs aislados *ex vivo* fue más próximo a los MØ-M que a MØ-GM (Figura 44). La comparación entre los perfiles de expresión de los MØ-AR y los TAM permitió la identificación de los genes más diferencialmente expresados entre ambos tipos de macrófagos aislados *ex vivo* (Figura 43). La expresión de *EGLN3*, *CCR2*, *MMP12*, *IL-12B*, *INHBA*, *FCER1A*, *SLC2A1* e *IL23A*, característicos de MØ-GM, fue significativamente mayor en los MØ-AR que en los TAM. Por el contrario, la expresión de los genes característicos de MØ-M (*FOLR2*, *SERPINB2*, *IGF1*, *HTR2B* y *HMOX*) fue menor en los MØ-AR que en los TAM (Figura 44A). En conjunto, los resultados anteriores demuestran que el perfil de expresión génica de los MØ-AR de LS muestra un perfil de polarización pro-inflamatorio similar al perfil génico de los MØ-GM.

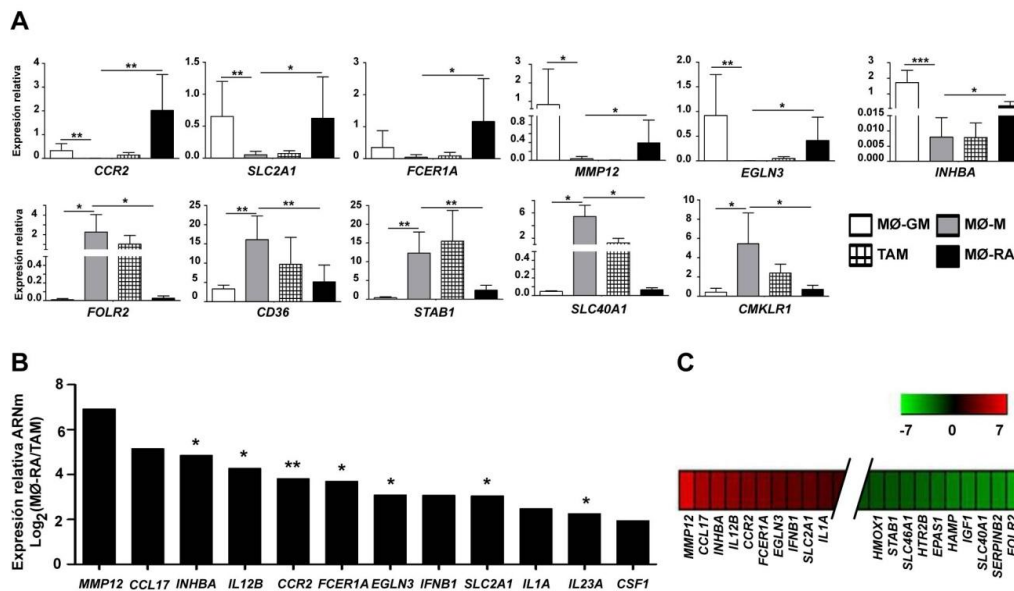


Figura 44. Caracterización transcriptómica de MØ-AR de líquido sinovial. **A.** Expresión relativa de ARNm de los genes indicados en MØ-GM (n=8), MØ-M (n=6), células CD14⁺ de ascitis tumoral (TAM, n=4), y células CD14⁺ de líquido sinovial de AR (MØ-AR, n=9). Los resultados se muestran como expresión relativa, que indica la detección de cada ARNm en cada muestra en relación a la media de los niveles de expresión *HPRT1*, *TBP* y *RPLP0*; se representa la media y la SD (**p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001). **B.** Expresión de ARNm de los genes indicados en células CD14⁺ del líquido sinovial de AR (MØ-AR, n=9) respecto a las células CD14⁺ de ascitis tumoral (TAM; n=4). Los resultados se expresan en log₂ (**p*<0.05, ***p*<0.01). **C.** Representación de la agrupación jerárquica mediante el programa MEV de los datos que se muestran en (B), indicando los genes con mayor y menor expresión comparando MØ-AR respecto a TAMs.

Expresión de marcadores de polarización en los macrófagos de líquido sinovial y membrana sinovial de AR

Para fortalecer aún más los resultados sobre la polarización pro-inflamatoria de los MØ-AR, se evaluó la expresión de las proteínas PHD3, CCR2 y MMP12 (asociadas a la polarización de MØ-GM) en los MØ-AR de LS y en los macrófagos CD163⁺ de membrana sinovial control y de pacientes con AR activa. El PHD3 (proteína codificada por el gen *EGLN3*) se detectó expresada por macrófagos CD163⁺TNF- α ⁺ aislados del líquido sinovial (Figura 45A). Los macrófagos CD163⁺ localizados en el “sublining” de la membrana sinovial de AR expresaron PHD3 (Figura 45B, C). Por el contrario, los macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial control carecieron de expresión de PHD3 (Figura 45B). En la misma línea que PHD3, los MØ-AR de LS expresaron CCR2, y bajos niveles del marcador de los MØ-M, FR- β (Figura 45A). Los macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de AR expresaron CCR2, ausente en membrana sinovial control (Figura 45B, C). Del mismo modo, la expresión de MMP12, implicada en la remodelación del tejido y en procesos inflamatorios como la AR, solo se detectó en los macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de pacientes con AR (Figura 45B, C). Como describimos en la Figura 3, los macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de AR son TNF- α ⁺CD209⁻ (Figura 45D). Por otra parte y tal y como está descrito [110], se observó un aumento del número de los macrófagos CD163⁺ en la membrana sinovial de pacientes con AR activa en comparación con membrana sinovial de pacientes control (Figura 45F). La cuantificación de los marcadores descritos en macrófagos CD163⁺ de sinovial normal (control) y de AR reveló que los macrófagos CD163⁺ de membrana sinovial de AR expresan niveles significativamente mayores de PHD3, CCR2, MMP12 y TNF- α (Figura 35E) que los macrófagos CD163⁺ de sinovial sana, lo que apoya su perfil de polarización pro-inflamatorio.

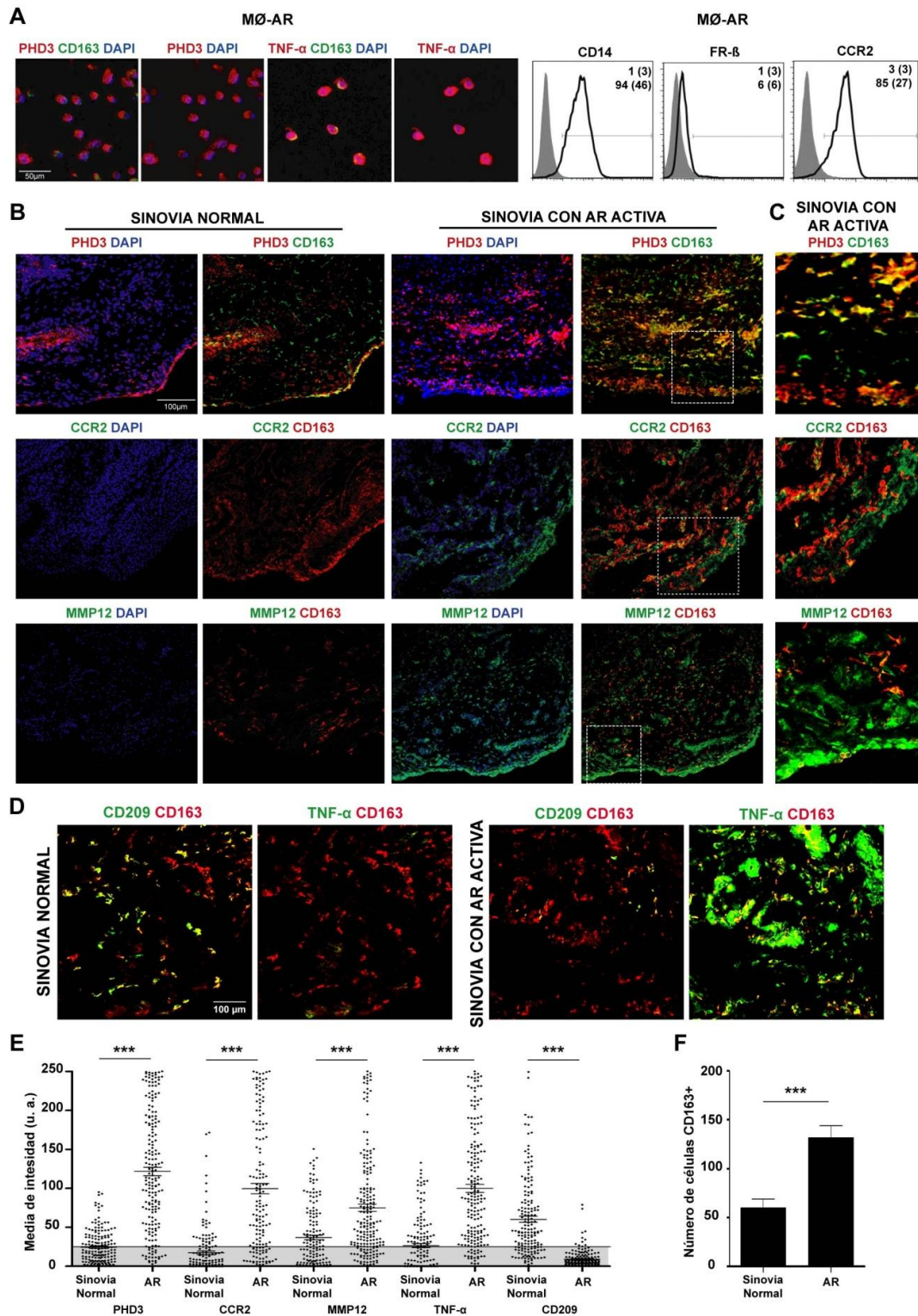


Figura 45. Expresión de los marcadores asociados a MØ-GM en los macrófagos de articulaciones de AR. **A.** Detección de PHD3 y TNF- α por inmunofluorescencia y microscopía confocal en MØ-AR de líquido sinovial de pacientes con AR activa. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Los experimentos se realizaron en 8 muestras de pacientes independientes, y se muestra uno representativo. Escala, 50 μ m. Detección de FR- β y CCR2 por citometría de flujo en MØ-AR de líquido sinovial de pacientes con AR activa. Se muestra el porcentaje de células positivas y la media de intensidad de fluorescencia (entre paréntesis). Los histogramas con fondo gris marcan la fluorescencia de las células en presencia de anticuerpos control. Los experimentos se realizaron en 3 muestras de donantes independientes, y se muestra uno representativo. **B.** Detección de CD163, PHD3, CCR2 y MMP12 por inmunofluorescencia y microscopía confocal en membrana sinovial control (SINOVIA NORMAL, izquierda) y membrana sinovial de pacientes con AR activa (SINOVIA CON AR, derecha). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Los experimentos se realizaron en 6 muestras de donantes independientes, y se muestra uno representativo.

Escala, 100 μm . **C.** Aumento (20x) de las áreas recuadradas en las membranas sinoviales con AR (B). **D.** Detección de CD163 (rojo), CD209 (verde, izquierda) y TNF- α (verde, derecha) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en membrana sinovial control (SINOVIA NORMAL, izquierda) y membrana sinovial de pacientes con AR activa (SINOVIA CON AR, derecha). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Los experimentos se realizaron en 6 muestras de donantes independientes, y se muestra uno representativo. Escala, 100 μm . **E.** Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, u.a.) de PHD3, CCR2, MMP12, TNF- α y CD209 en macrófago CD163⁺. Se cuantificaron entre 150 y 350 macrófagos, y se muestra la media \pm S.E.M. de 3 donantes independientes (>9 campos/donante). Se consideran células positivas aquellas que presentaron valores superiores a 25 u.a. (***) p <0.001). **F.** Cuantificación del número de células CD163⁺ en membrana sinovial sana y con AR activa.

El líquido sinovial de AR promueve la polarización pro-inflamatoria de los monocitos y los macrófagos

La polarización de los macrófagos viene determinada por los estímulos presentes en el medio extracelular [9]. Para determinar si el líquido sinovial tiene capacidad de polarización, los monocitos y los M \emptyset -M de donantes sanos se expusieron al líquido sinovial de distintos pacientes de AR durante 72 horas y se analizó la expresión de marcadores de polarización. La exposición a líquido sinovial durante 72 horas promovió un aumento significativo de la producción de activina A (Figura 46A), MMP12 (Figura 46C) y de la expresión de PHD3 (Figura 46B) en los monocitos. De manera similar a los monocitos, los M \emptyset -M aumentaron significativamente la producción de activina A (Figura 47D) y de la expresión de PHD3 (Figura 46E) tras la exposición a líquido sinovial. Activina A y TGF- β señalizan fosforilando Smad2 [48]. Se determinó el grado de activación de Smad2 en los monocitos y los M \emptyset -M expuestos a LS. Los resultados de la Figura 46 muestran un aumento de la fosforilación de Smad2 en los monocitos y los M \emptyset -M expuestos a líquido sinovial de AR (Figura 46B, E). En presencia de un anticuerpo neutralizante contra anti-activina A o anti-TGF- β se redujo significativamente el grado de fosforilación de Smad2 (Figura 46F). Estos resultados nos permiten concluir que el líquido sinovial presenta capacidad de polarización pro-inflamatoria, debido a que promueve la expresión de activina A, PHD3 y MMP12 tanto en los monocitos como en los M \emptyset -M.

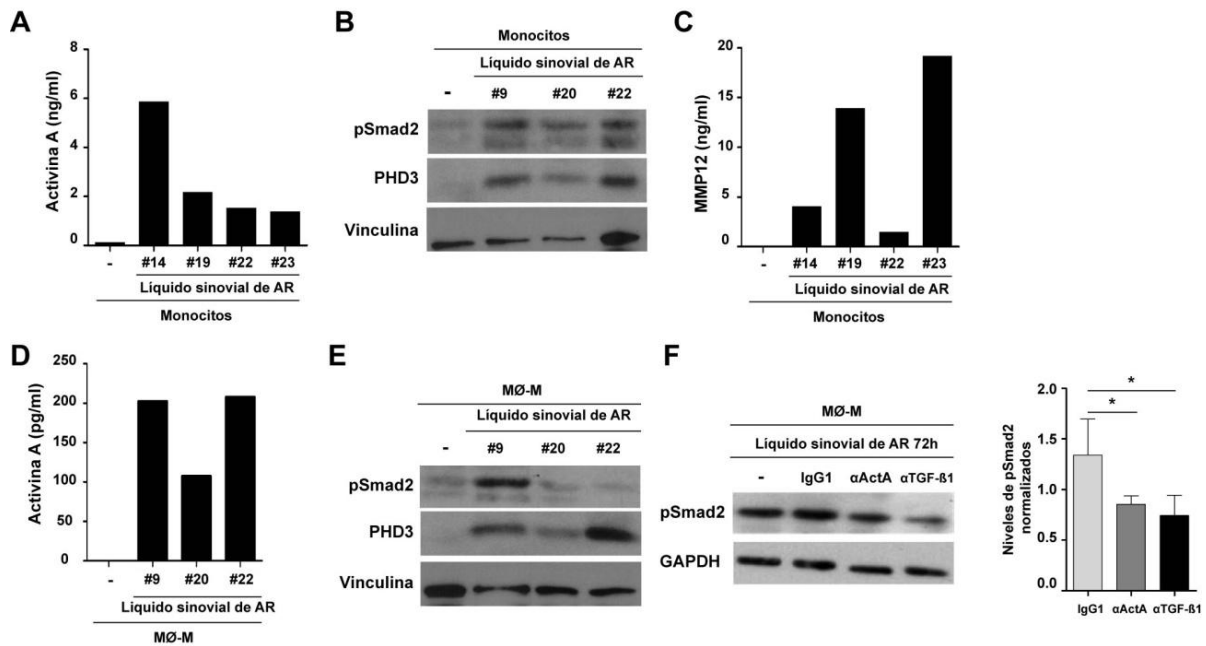


Figura 46. El líquido sinovial de AR contribuye a la adquisición de marcadores asociados a MØ-GM. A. Detección de activina A por ELISA en monocitos sin tratar (-) o expuestos a líquido sinovial de pacientes con AR durante 96 horas. Las células se lavaron y mantuvieron en medio de cultivo fresco durante las últimas 24 horas. **B.** Detección de Smad2 y PHD3 por “Western blot” en monocitos sin tratar (-) o expuestos a líquido sinovial de pacientes con AR durante 72 horas. Los niveles de proteína vinculina se determinaron como control de carga. **C.** Detección de MMP12 por ELISA en monocitos sin tratar (-) o expuestos a líquido sinovial de pacientes con AR durante 96 horas. Las células se lavaron y mantuvieron en medio de cultivo fresco durante las últimas 24 horas. **D.** Detección de activina A por ELISA en MØ-M sin tratar (-) o expuestos a líquidos sinoviales de pacientes con AR durante 96 horas. Las células se lavaron y mantuvieron en medio de cultivo fresco durante las últimas 24 horas. **E.** Detección de Smad2 y PHD3 por “Western blot” en MØ-M sin tratar o expuestos a líquido sinovial de pacientes con AR durante 72 horas. Los niveles de proteína vinculina se determinaron como control de carga. **F.** Detección de Smad2 por “Western blot” en MØ-M expuestos a líquido sinovial de pacientes con AR en presencia de anticuerpo neutralizante anti-activina A (α ActA), anticuerpo neutralizante anti-TGF- β 1 (α TGF- β 1) o un anticuerpo isotipo específico (IgG1). Los niveles de proteína GAPDH se determinaron como control de carga. El experimento se realizó en 3 donantes independientes y se muestra uno representativo. Los niveles relativos de Smad2 fosforilado se determinaron mediante un análisis de densitometría y se normalizó respecto a los niveles de GAPDH (derecha). Se indica la media y la SD de 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$).

La activina A de líquido sinovial de AR media la capacidad de polarización de los monocitos y macrófagos

Como se ha descrito previamente (ver página 64), la activina A pertenece a la superfamilia del TGF- β , se produce tras la activación de los macrófagos y juega un papel importante en las primeras fases de los procesos inflamatorios [49]. La activina A promueve la adquisición de marcadores de polarización de los MØ-GM (*CCR2*, *EGLN3*, *CCL17*) y previene de la adquisición de marcadores característicos de los MØ-M (*FOLR2*, *IL10*, *IGF1*, *SERPINB2*) *in vitro* [48]. Considerando estos datos, se hipotetizó que la activina A del líquido sinovial podría contribuir al estado de polarización de los MØ-AR [155]. Para demostrar esta hipótesis, se analizó la

concentración de activina A en 44 líquidos sinoviales de AR independientes. Todos ellos presentaron altos niveles de activina A (rango entre 3 y 35 ng/ml), mientras que los niveles de TGF- β 1 se encontraron en un rango entre 0 (indetectable) y 3 ng/ml (Figura 47A). De acuerdo con la presencia de activina A y TGF- β 1 en líquido sinovial, los M \emptyset -AR aislados del líquido sinovial mostraron altos niveles de Smad2 fosforilado (Figura 47B). También se determinó la presencia de otras citoquinas que contribuyen a la patogenia de la AR (IL-6, GM-CSF, M-CSF, TNF- α) en el líquido sinovial de AR. Los niveles de GM-CSF, M-CSF y IL-6 detectados fueron altamente variables y en algunas muestras no superaron el límite detectable del ELISA (Figura 47A). Las citoquinas pro-inflamatorias IL-23 y TNF- α no se detectaron en ninguno de los líquidos sinoviales de AR analizados. Una vez determinado el rango de expresión de activina A en el líquido sinovial de AR, se analizó su contribución a la capacidad de polarización de monocitos y macrófagos. Los monocitos y M \emptyset -M de donantes sanos se expusieron al líquido sinovial de AR en presencia de un anticuerpo neutralizante anti-activina A. El bloqueo de activina A del LS redujo significativamente el aumento de expresión de marcadores de polarización pro-inflamatorios (*MMP12*, *CCR2*, *CCL17*) e incrementó la expresión de marcadores anti-inflamatorios (*FOLR2*, *IGF1*, *SERPINB2*, *SLC40A1*) en los monocitos y macrófagos (Figura 47C, D). Estos resultados indican que la activina A del líquido sinovial contribuye a la capacidad de polarización de los M \emptyset -AR.

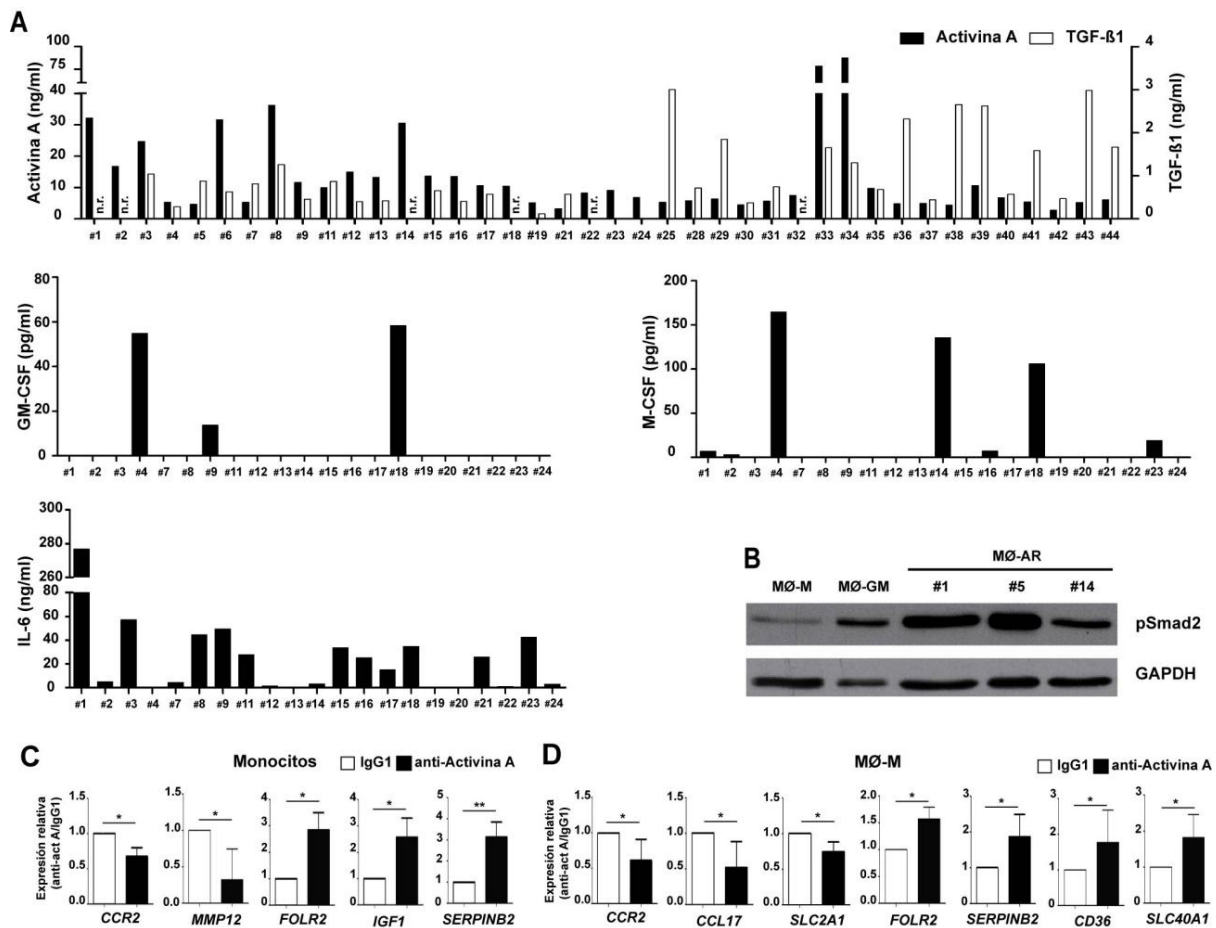


Figura 47. La activina A contribuye al estado de polarización de MØ-AR. **A.** Detección de activina A, TGF-β1, IL-6, GM-CSF y M-CSF por ELISA en líquido sinovial de pacientes con AR (n=44 para activina A y TGF-β1 y n=22 para IL-6, GM-CSF y M-CSF; n.r., no realizado). **B.** Detección de Smad2 por “Western blot” en células CD14⁺ aisladas del líquido sinovial de pacientes con AR. Los niveles de proteína GAPDH se determinaron como control de carga. **C y D.** Detección de los marcadores asociados a MØ-GM y MØ-M en monocitos (**C**) y MØ-M (**D**) expuestos a líquido sinovial de pacientes con AR en presencia de anticuerpo neutralizante de activina A (anti-Activa A) o un anticuerpo control de isotipo (IgG1), determinado por qRT-PCR. Cada determinación se realizó por triplicado. Se muestra la media y SD de cuatro (**C**) o nueve (**D**) experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Los valores en presencia de IgG1 se asignaron el valor arbitrario de 1.

Al disponer de la información clínica de los pacientes de AR, se analizó si existía una correlación entre el nivel de activina A del LS y el estado de la enfermedad (actividad, medida por DAS28 y duración de la enfermedad) y se comparó el nivel de activina A del LS del paciente con el tratamiento (DMARD, terapias biológicas, sólo MTX). Los niveles de activina A no correlacionaron con el DAS28 o con la duración de la enfermedad (Figura 48A), tal y como estaba descrito [155]. Respecto a la comparación con el tratamiento, la concentración de activina A fue significativamente mayor en pacientes tratados con anti-CD20 que en pacientes tratados con MTX sólo, DMARD (MTX, leflunomida, sales de oro) o anti-TNF-α.

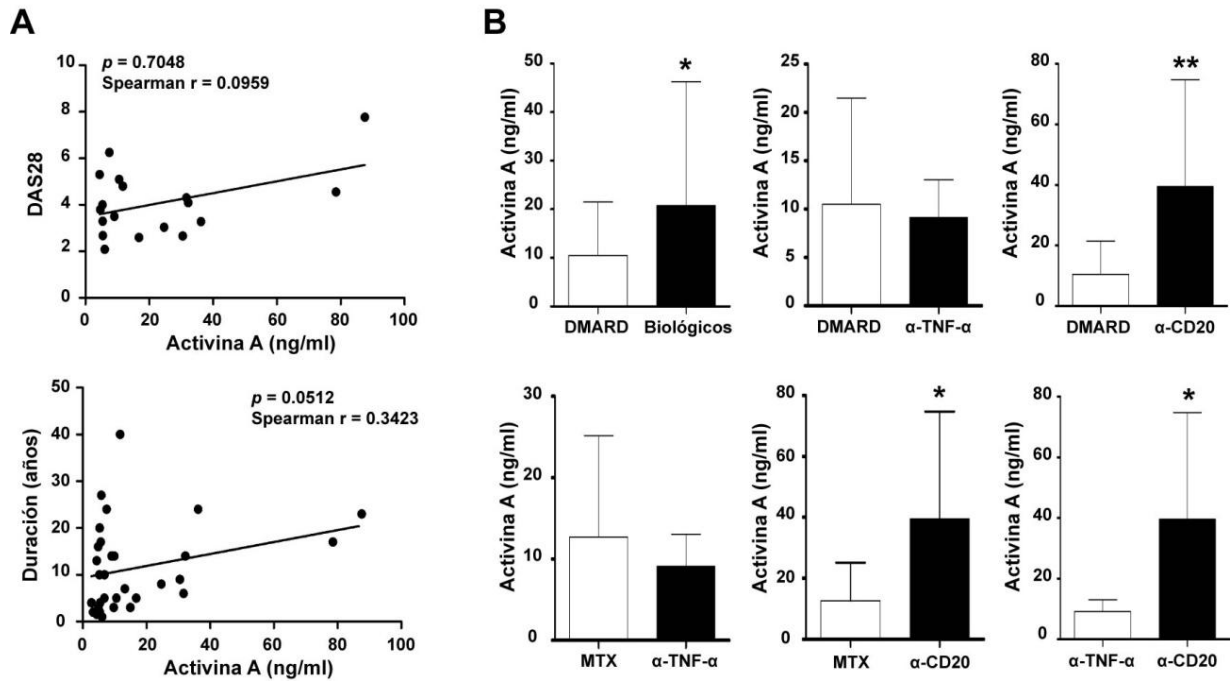


Figura 48. Correlación entre la actividad de la enfermedad y nivel de activina A del líquido sinovial. A. Correlación entre los niveles de activina A y la actividad de la enfermedad (DAS28, n=18) o la duración de la enfermedad de AR (duración, n=33) determinado mediante el test Spearman's. **B.** Comparación de los niveles de activina A detectado en los líquidos sinoviales en pacientes tratados con DMARDs (metotrexato, leflunomida, sales de oro, n=17), biológicos (anti-TNF- α o anti-CD20), solo con metotrexato (MTX, n=9), anti-TNF- α (n=9) o anti-CD20 (n=6). Los datos se analizaron usando el test de Mann Whitney. Se indica la media y SD de cada grupo (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Fuente celular de la activina A en la membrana sinovial de AR

Por último, se determinó la fuente celular de la activina A en las articulaciones con AR. El análisis de inmunofluorescencia detectó la expresión de activina A en los macrófagos (co-expresión con CD163⁺), en las células endoteliales (co-expresión con CD31⁺) y en los fibroblastos posicionados en el "lining" (co-expresión con FAP⁺) y en el "sublining" (co-expresión con CD90⁺/FAP⁺) de la membrana sinovial de paciente con AR activa. Por el contrario, no se detectó expresión de activina A en membrana sinovial control (Figura 49A, B).

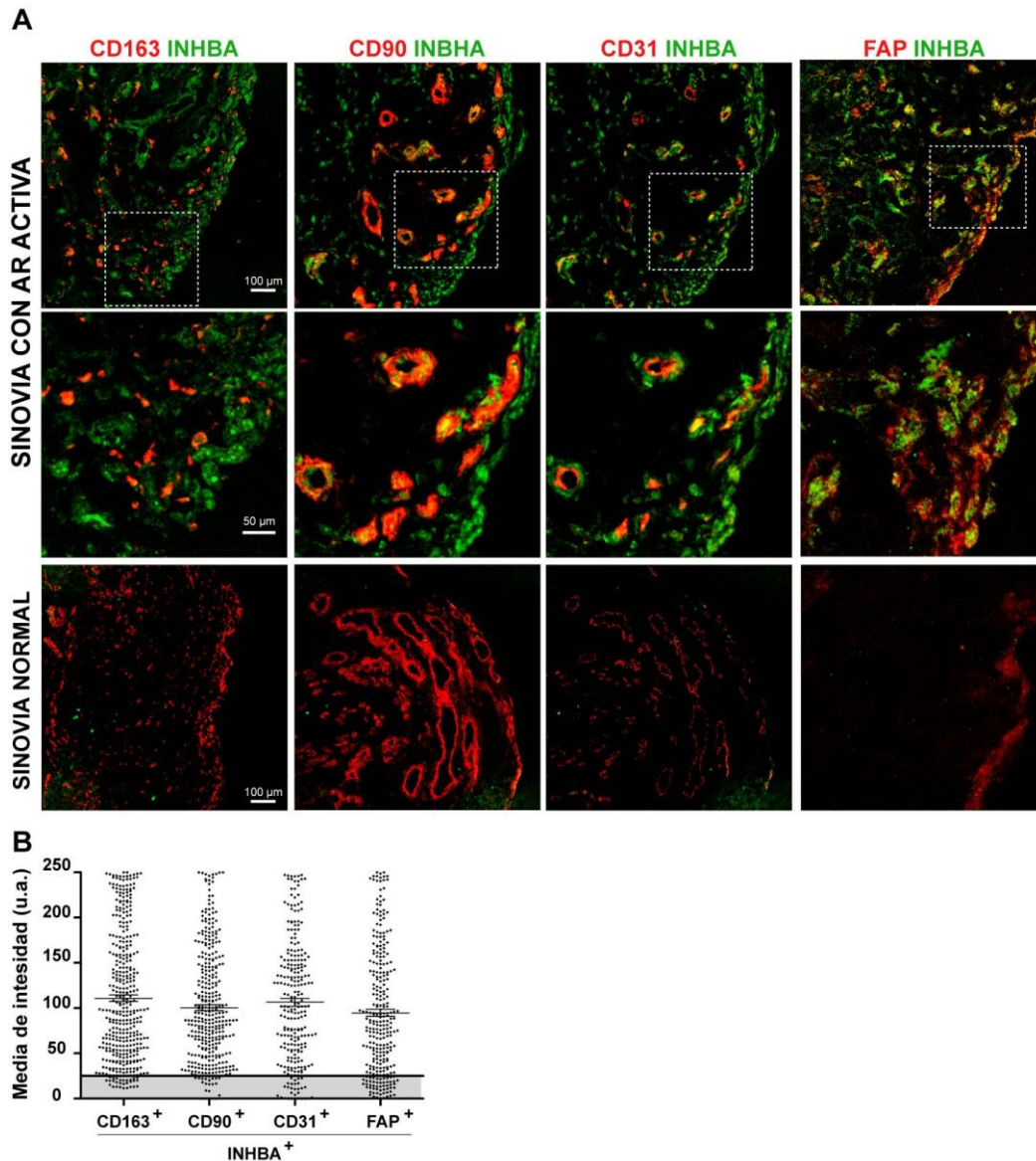


Figura 50. Expresión de activina A en la membrana sinovial de articulaciones con AR y articulaciones control. **A.** Detección de INHBA (verde), CD163 (rojo, izquierda), CD90 (rojo, centro izquierda), CD31 (rojo, centro derecha) y FAP (rojo, derecha) por inmunofluorescencia y microscopía confocal en membrana sinovial de pacientes con AR activa (arriba) y normal (abajo). En el panel central, se muestra una ampliación 20x de las zonas recuadradas en el panel superior. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Escala, 100 μ m. **B.** Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia (unidades arbitrarias, u.a.) de INHBA⁺ en macrófagos CD163⁺, fibroblastos CD90⁺, células endoteliales CD31⁺ y fibroblastos activados FAP⁺ de membrana sinovial de AR activa. Se cuantificaron entre 150 y 300 macrófagos y se muestra la media \pm S.E.M. (3 donantes independientes, >9 campos/donante elegidos al azar). Se consideran células positivas aquellas que presentaron valores superiores a 25 u.a. (***) $p < 0.001$.

En su conjunto, estos resultados muestran que la activina A presente en el líquido sinovial de articulaciones de AR aumenta la expresión de marcadores característicos de la polarización GM-CSF dependientes, inhibe la expresión los marcadores M-CSF dependientes en los monocitos y los macrófagos, lo que apoya su implicación en el estado de polarización pro-inflamatorio de los macrófagos de AR.



Discusión

Transportadores de folato en la polarización de los macrófagos

El metabolismo intrínseco es uno de los parámetros que determinan la polarización de los macrófagos y la adquisición de funciones efectoras [38]. El 5-MTHF, forma reducida y biológicamente activa del ácido fólico (vitamina B9), funciona como un cofactor en numerosas reacciones metabólicas, incluyendo la biosíntesis de nucleótidos, la remetilación de la homocisteína y procesos de metilación [52]. En la primera parte de resultados de la tesis demostramos que el 5-MTHF puede internalizarse a través de tres transportadores de folato en los macrófagos (RFC, FR- β y PCFT) que difieren en afinidad y dependencia de pH: RFC se expresa principalmente en los macrófagos pro-inflamatorios humanos *in vivo* e *in vitro*; FR- β y PCFT se co-expresan en los macrófagos polarizados a fenotipo M2 o M \emptyset -M y macrófagos residentes en tejidos implicados en la absorción y el tránsito de folatos (placenta, colon, hígado) (Figura 51). También demostramos que la activina A es un factor crítico que determina la expresión de los transportadores de folato RFC y FR- β en los macrófagos [48]. La expresión diferencial de transportadores de folato en los macrófagos en distintos estados de polarización es especialmente relevante ya que determinará la mayor o menor capacidad de internalizar THF. Pero, además, es importante por el posible uso de conjugados de folato (FR- β -específico) y de fármacos anti-folato (metotrexato, pemetrexed, RFC-específico) como diana selectiva y terapéutica de los macrófagos humanos en patologías como el cáncer o la AR [165,166].

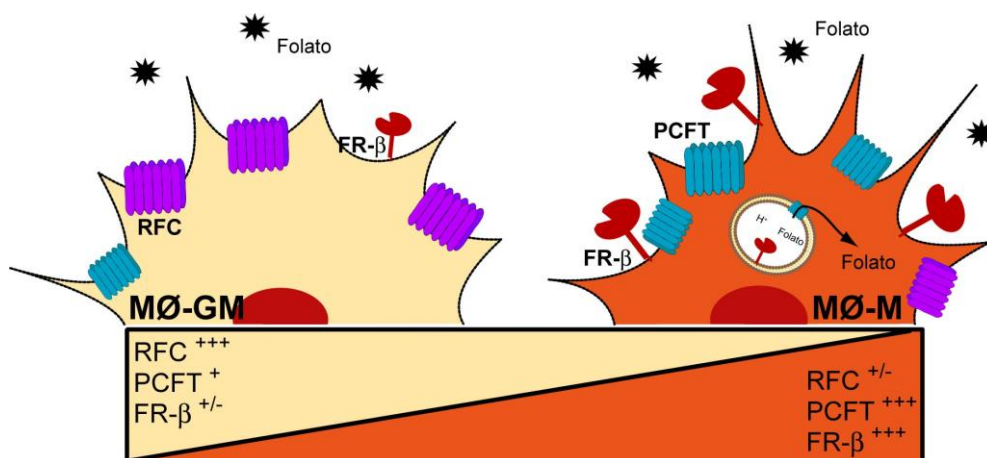


Figura 51. Expresión de transportadores de folato en polarización de los macrófagos.

Hemos demostrado que la expresión de transportadores de folato es polarización dependiente, lo que sugiere que los macrófagos juegan un papel importante en la disponibilidad de folatos en condiciones fisiológicas y patológicas. Esta actividad se asemeja a la contribución que tienen los macrófagos en el reciclaje del hierro. Los macrófagos son células con alta capacidad “scavenging” y una de sus funciones principales es contribuir a la homeostasis del hierro mediante la ingesta y degradación de eritrocitos senescentes o dañados y el reciclaje del hierro de la hemoglobina y de las enzimas que contienen hierro [41]. Desde este punto de vista, el manejo del folato se asemeja al manejo del hierro ya que tanto el folato como el hierro son nutrientes esenciales, son altamente demandados durante el embarazo y su deficiencia causa anemia [167]. De hecho, el transportador de folato PCFT también funciona como transportador de hemina [41,168] y de ahí deriva su otro nombre HCP-1 (haem carrier protein 1). Sin embargo, mientras que los macrófagos MØ-M retienen poco y exportan mucho hierro (posiblemente para facilitar la proliferación de otras células), los MØ-M retienen más folato. Y esta afirmación la hemos demostrado con los siguientes experimentos: 1) los macrófagos del colon y la placenta (FR-β⁺/PCFT⁺) acumulan THF (Figura 15) y 2) no detectamos marcaje de THF en los macrófagos pro-inflamatorios como los que se encuentran en colitis ulcerosa (Figura 15). Además, los macrófagos pro-inflamatorios MØ-GM tienen menor capacidad de internalizar THF y expresan significativamente mayor nivel de los transportadores que exportan folatos ABCC3, ABCG2 y RFC [60], que también median la salida de folatos de la célula [53], lo que sugiere que los macrófagos pro-inflamatorios MØ-GM mantienen una mayor concentración extracelular de folatos que podría contribuir a la proliferación de linfocitos durante la respuesta inmune.

Previamente se ha descrito la expresión de FR-β en los macrófagos diferenciados *in vitro* con M-CSF, los macrófagos asociados a tumor (TAM) [47] y su regulación por citoquinas de tipo M2 como M-CSF, IL-10 e IL-6 [47]. En los resultados de esta tesis, demostramos que FR-β se expresa también en los macrófagos CD163⁺ residentes en tejidos sanos y está ausente en los macrófagos aislados del líquido sinovial de pacientes con AR activa, que presentan un perfil FR-β⁻PCFT⁺RFC⁺⁺⁺ compatible con un perfil de polarización de los macrófagos M1. Sin embargo, hemos detectado la expresión de FR-β en los macrófagos CD163⁺ en tejidos en condiciones

inflamatorias, como la colitis ulcerosa y la membrana sinovial de pacientes con AR activa. Una posible explicación de esta aparente discrepancia sería el hecho de que la expresión de FR- β es muy dependiente de M-CSF y los niveles de M-CSF son constitutivos en homeostasis pero también aumentan durante la inflamación y la respuesta a infecciones [47,107,110]. Según esta explicación, FR- β detectaría los macrófagos reclutados a los focos inflamatorios e identificaría los macrófagos en medios inflamatorios ricos en M-CSF.

FR- β y PCFT unen folatos con alta afinidad pero con distinto pH [53]. Previamente se ha explorado el papel de PCFT durante la internalización de folato en células HeLa (que expresan FR- α [75]). En estos estudios se ha demostrado que PCFT se co-expresa con FR- α en endosomas y que la función de PCFT es exportar folatos de endosomas acidificados al citoplasma [75]. Este mecanismo podría operar también en los macrófagos anti-inflamatorios M ϕ -M, ya que observamos colocalización de PCFT y FR- β en un compartimento perinuclear (Figura 17) similar al observado en células HeLa y en células Müller de la retina (FR- α^+ / PCFT $^+$) [169]. Estos resultados sugieren también que las funciones de los macrófagos podrían verse alteradas en pacientes con malabsorción hereditaria de folato (HFM) [68], que tienen mutaciones de pérdida de función en el gen *SLC46A1* (PCFT). Por otro lado, el papel fisiológico del FR- β todavía es desconocido, ya que el ratón FR- $\beta^{-/-}$ tiene un fenotipo aparentemente normal, y la única anomalía detectada es el incremento de la susceptibilidad de manifestar defectos en el desarrollo del tubo neural inducidos por arsénico [62,170].

Los macrófagos están involucrados en el inicio y la progresión de numerosas enfermedades con componente inflamatorio, incluyendo el cáncer, la obesidad y la AR [131]. Los tumores están infiltrados por los TAM que promueven la progresión tumoral estimulando angiogénesis y la migración de células tumorales. En AR, el número de macrófagos en el “sublining” de la membrana sinovial es un biomarcador de enfermedad y de respuesta terapéutica [108]. Por esta razón, el desarrollo de terapias anti-macrófago es un área de investigación muy activa (por ejemplo, anticuerpos contra CCL2, M-CSF o GM-CSF). En este sentido, los macrófagos de AR y los TAMs expresan FR- β funcional [47,166], y nuestros resultados sugieren que los conjugados de folato (con especificidad exclusiva por FR- β) podrían

utilizarse en terapia como diana de los TAMs o los macrófagos en AR. Sin embargo, la expresión de FR- β no es exclusiva de macrófagos en estos estados patológicos (cáncer, AR) y el uso de conjugados de folato podría afectar a los macrófagos residentes de tejido con alta expresión de FR- β (por ejemplo las células de Kupffer).

Selectividad de MTX por los macrófagos pro-inflamatorios humanos

En la segunda parte de resultados de la tesis, hemos identificado el perfil de expresión génica controlado por MTX en los macrófagos humanos pro-inflamatorios y anti-inflamatorios mediante “microarrays”, lo que ha permitido identificar genes/proteínas regulados por MTX en los macrófagos *in vitro* (CCL20, LIF, que denominaremos genes de respuesta a MTX). Además, hemos demostrado que las células mieloides humanas exhiben una respuesta a MTX célula- y diferenciación-dependiente que se correlaciona con los niveles de expresión de la enzima timidilato sintasa (TS). Concretamente, los macrófagos pro-inflamatorios M ϕ -GM TS⁺ son susceptibles a MTX, mientras que los monocitos (TS⁻) y los macrófagos anti-inflamatorios M ϕ -M (TS^{bajo}) son refractarios a MTX (Figura 52A). También demostramos que la respuesta a MTX en los macrófagos humanos polarizados por GM-CSF se puede modificar alterando la expresión o función de TS por 1) timidina exógena, que sobrepasa el bloqueo metabólico de TS por MTX; 2) los antifolatos pemetrexed (PMX) y raltitrexed (ZD1694), cuya diana específica es la enzima TS y 3) el silenciamiento de la TS mediante siARN. Todos estos resultados demuestran que la expresión de TS determina la respuesta a MTX en los macrófagos. Finalmente, demostramos que la actividad de p53 contribuye a la respuesta TS-dependiente de MTX en los macrófagos. En su conjunto, nuestros resultados sugieren la implicación de un eje TS-p53 en la respuesta a MTX en los macrófagos pro-inflamatorios y en la respuesta diferencial a MTX por parte de los monocitos y los macrófagos (Figura 52B).

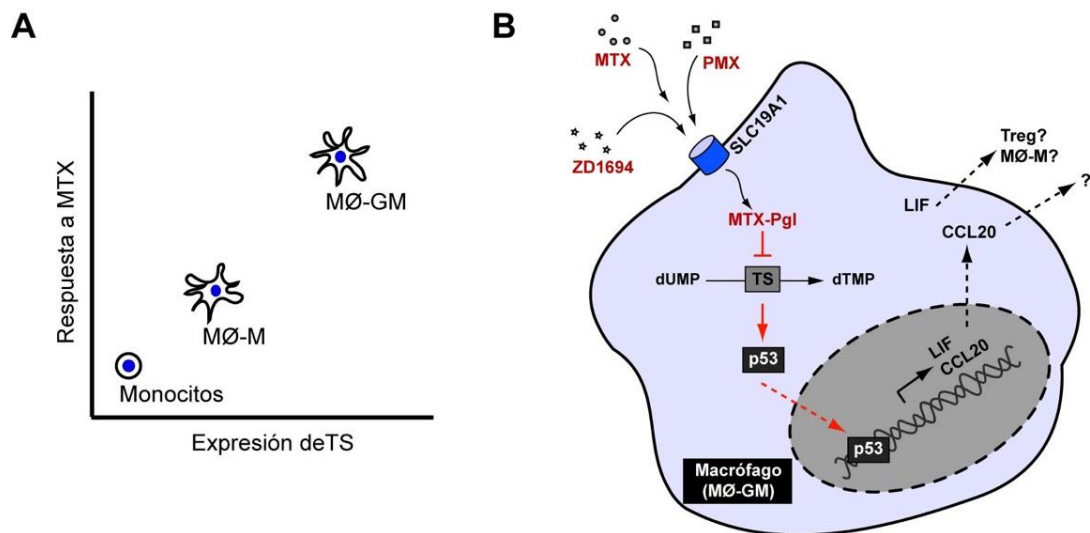


Figura 52. Representación gráfica de la base molecular de la respuesta a MTX en los MØ-GM. A. Correlación entre la respuesta a MTX y la expresión de la TS en monocitos, macrófagos pro-inflamatorios (MØ-GM) y anti-inflamatorios (MØ-M). **B.** Modelo propuesto de la respuesta inducida por MTX en MØ-GM. El MTX (y otros antifolatos, PMX o ZD1694) entra en MØ-GM a través del SLC19A1, se poliglutamila (MTX-Pgl) e inhibe la enzima TS. La inhibición de la TS disminuye el “pool” de dTMP, lo que conduce a la activación del p53 y de los genes de respuesta a p53, *CCL20* y *LIF*. Se muestra el posible papel de LIF en la inducción de Treg y la polarización de MØ-M.

Previamente se ha estudiado el efecto de las drogas con carácter anti-proliferativo que se utilizan en quimioterapia en las células mielomonocíticas [171,172,173,174]. Un ejemplo reciente es la trabectedina, droga anticancerígena usada en el tratamiento de segunda línea en los pacientes con sarcoma de partes blandas y con carcinoma de ovario [172]. La trabectedina bloquea la proliferación de las células tumorales porque interacciona con el ADN. La trabectedina también induce específicamente la muerte celular en los monocitos y los macrófagos asociados a tumor (TAM) [172]. Del mismo modo que la trabectedina, el MTX es una droga anti-proliferativa que inhibe la proliferación de las células con alta tasa proliferativa como las células tumorales (DHFR⁺) y, como indican nuestros resultados, tiene selectividad por los macrófagos pro-inflamatorios con un perfil GM-CSF dependiente que expresan TS [156]. En este contexto tal y como demostramos en esta tesis, el GM-CSF contribuye a la adquisición del perfil de la expresión génica y de polarización de los macrófagos en artritis reumatoide [16,133], patología en la que el uso del MTX ha mostrado un profundo beneficio clínico [151]. Nuestro trabajo demuestra que el MTX tiene una especificidad selectiva por los macrófagos de la membrana sinovial de AR, que tienen un perfil de polarización GM-CSF dependiente y no por los macrófagos de la membrana sinovial sana, con un perfil de los macrófagos M2.

En línea con nuestros resultados, muchos grupos de investigación han explorado los polimorfismos genéticos que afectan al gen de la timidilato sintasa (*TYMS*) en pacientes con AR activa en tratamiento con MTX [175,176]. En el gen *TYMS* se han identificado diferentes polimorfismos que afectan a su expresión y su función. La región 5'UTR del gen *TYMS* contiene una repetición variable en tándem con repeticiones dobles (2R) o triples (3R) de 28 pares de bases (pb) (Figura 53). Estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que la presencia de la secuencia 3R versus 2R aumenta la transcripción y la expresión de *TYMS* (2.6 veces más en 3R que 2R [177]), lo que conduce a una disminución en la eficacia del MTX [178,179]. Los pacientes con el alelo 3R requieren mayores dosis de MTX que los de 2R, que tienen una mejor respuesta [178,180]. En la región 3'UTR del gen se ha descrito otro polimorfismo que consiste en una delección de 6 pb (TTAAAG) en la posición 1496 (Figura 53) y que se asocia a una disminución en la estabilidad y la expresión del ARNm, lo que conduce a mayor eficacia del MTX en pacientes con este polimorfismo [178,181,182,183]. Sin embargo, los estudios de Ghodke y sus colaboradores no mostraron una asociación estadísticamente significativa por cualquier alelo en relación a la eficacia o la toxicidad a MTX [184]. Otros autores describen que la delección en el 3'UTR de 6 pb también origina menor respuesta al tratamiento con MTX en pacientes con artritis reumatoide y psoriasis [176]. La discrepancia de estos datos encontrados en la literatura indica que la relación entre los polimorfismos de *TYMS* y la respuesta clínica a MTX necesita clarificarse [175,176,178].

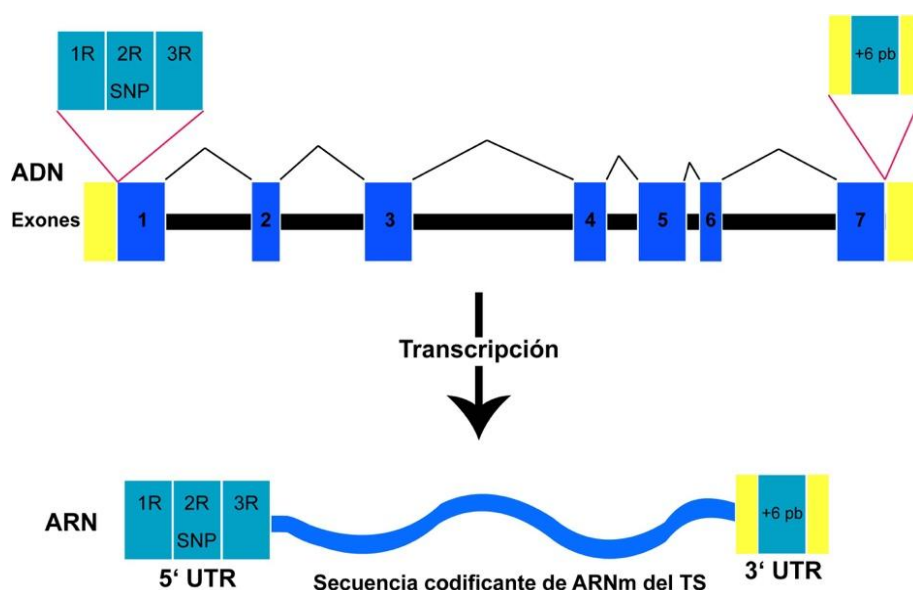


Figura 53. Regulación de la transcripción del gen timidilato sintasa por polimorfismos en la zona 5'UTR y 3'UTR. Se muestra la disposición de los exones y regiones UTR, detallando la transcripción del gen a ARN de los polimorfismos descritos de la región 5'UTR (repetición de 28 pb) y 3'UTR (inserción o delección de 6 pb). Modificado de [181].

La enzima TS cataliza la metilación reductiva de deoxiuridina monofosfato (dUMP) a deoxitimidina monofosfato (dTMP) utilizando 5,10-metilen-THF como donador del grupo metilo (Figura 54). El dTMP se fosforila a deoxitimidina trifosfato (dTTP), nucleótido precursor para la replicación y la reparación del ADN. La TS representa la única fuente intracelular de dTMP *de novo*, por lo que la inhibición de esta enzima disminuye la producción de dTMP, genera deficiencia de timidilato y una pérdida del balance en el “pool” de nucleótidos, lo que inhibe la replicación y la reparación celular y disminuye el crecimiento celular [185].

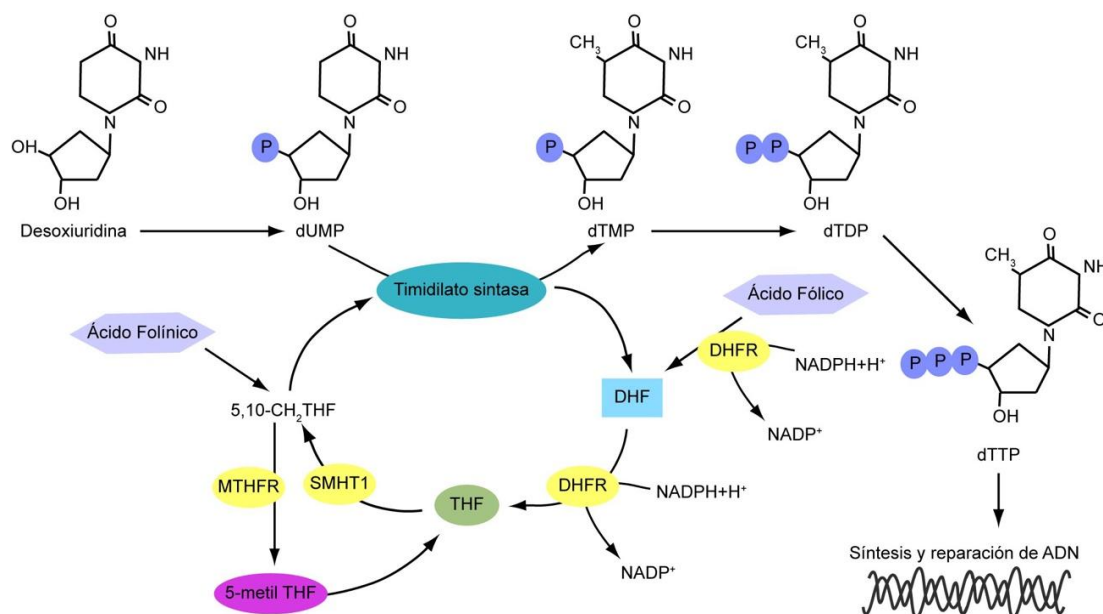


Figura 54. Biosíntesis de timidilato *de novo*. La Timidilato Sintasa (TS) cataliza la conversión de dUMP a dTMP, usando 5,10-CH₂ THF como donador de un grupo metilo. dTMP se fosforila a dTTP vía dTDP. La TS tiene sitio de unión para el nucleótido (dUMP) y el folato (5,10-CH₂-THF), lo que confiere la oportunidad de inhibir la TS a través de dos clases distintas de drogas: análogos de pirimidina (fluoropirimidinas) y análogos del folato (antifolatos) que inhiben la síntesis de dTTP y la síntesis y reparación del ADN (requerida por células tumorales para la proliferación celular y la supervivencia). Abreviaturas: 5,10-CH₂THF, 5,10-metilentetrahidrofolato; 5-metil THF, 5-metiltetrahidrofolato; DHF, dihidrofolato; DHFR, dihidrofolato reductasa; dTDP, deoxitimidina difosfato; dTMP, deoxitimidina monofosfato; dTTP, deoxitimidina fosfato; dUMP, deoxiuridina monofosfato; MTHFR, metilnotetrahidrofolato reductasa; SHMT1, serina hidroximetil transferasa; THF, tetrahidrofolato. Modificado de [185].

En este contexto es bien conocido el papel crucial que juega la TS en la proliferación y la supervivencia de las células tumorales, ya que se encuentra sobreexpresada en numerosos tumores y se ha demostrado que exhibe una actividad oncogénica cuando se sobreexpresa en las células de mamífero [177,185]. Por todo ello, la TS representa una diana en quimioterapia contra el cáncer (especialmente en cáncer colorectal) con agentes como el 5-fluorouracilo (5-FU) y con antifolatos como el pemetrexed. Además de su papel enzimático, la TS funciona como una proteína que une un ARN (“RNA binding protein”) e inhibe su propia síntesis bloqueando la

traducción del ARNm de la TS [186,187], en un mecanismo de autoregulación negativa. Este mismo mecanismo de regulación traduccional se ha descrito en otros ARNm. La TS regula la traducción de myc y p53 [185]. La unión de TS al ARNm de p53 disminuye su traducción. Por otro lado, p53 inhibe la transcripción de TS de ratón [186]. En los macrófagos pro-inflamatorios también observamos una relación entre TS y p53. La respuesta a MTX en los macrófagos pro-inflamatorios humanos está parcialmente mediada por p53, porque el inhibidor de p53 (pifitrina α) limitan el aumento de la expresión de los genes en respuesta a MTX como *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15*, genes diana de p53 [158]. Basándonos en estos resultados, especulamos que las mutaciones del gen p53 pueden generar resistencia a MTX en pacientes con AR, un fenómeno ya establecido en tumores [150]. El p53 juega un papel esencial en la preservación de la integridad del genoma y del mantenimiento de la regulación del ciclo celular y en la respuesta celular al daño en el ADN (por ejemplo con radiación UV) [187]. En el contexto de la AR, se han descrito mutaciones somáticas en p53, localizadas en la zona del “lining” pero no en la zona del “sublining”, características de daño en el ADN y de estrés oxidativo [188]. Algunas de estas mutaciones actúan como dominante negativo y pueden inhibir la función de p53 “wild-type” [188]. Actualmente, se desconocen las razones por la falta de respuesta clínica a MTX en algunos pacientes con AR [150]. En base a nuestros resultados, podemos especular que la determinación de la actividad/expresión de p53 o los genes de respuesta a MTX (*CCL20*, *LIF*, *MET*, *GDF15*) podrían servir como marcadores predictivos de la respuesta clínica a MTX en pacientes con AR, una herramienta que actualmente no existe a pesar de que el MTX es el fármaco de primera elección en el manejo de la AR [85,151,189,190,191,192,193]. En este sentido, la comparación de los perfiles de expresión génica de PBMCs de pacientes con AR sin tratar y tratados con MTX (GSE35455) y nuestros resultados (GSE64531) muestran coincidencias en algunos genes. En el perfil GSE35455, los pacientes con AR activa tratados con MTX (8 mg/semana durante 24 semanas) muestran un aumento de *LIF*, *CCL4*, *MMP10*, *MET*, *MMP1* y *OSM* respecto a pacientes con AR sin tratar, genes cuya expresión también aumenta en los MØ-GM tratados con MTX. En la actualidad, se está evaluando la expresión de LIF en líquido sinovial y suero de pacientes tratados con MTX para estudiar su valor predictivo de la respuesta a MTX en pacientes con AR. La comparación con otros perfiles de expresión génica de pacientes de artritis juvenil idiopática tratados con MTX

(GSE41831 y GSE23687) no muestran cambios de los genes de respuesta a MTX que hemos descrito en los MØ-GM [194].

En la tesis, también demostramos que el LIF y CCL20 son nuevos marcadores de respuesta a MTX en los macrófagos pro-inflamatorios humanos. La citoquina LIF pertenece a la familia IL-6 y tiene funciones pleiotrópicas: actúa como estímulo para la formación de plaquetas y hueso, es esencial para la implantación del blastocisto, promueve la generación de células T reguladoras (en oposición a IL-6) (Figura 55) [154,195,196] e inhibe la diferenciación de células Th17 (Figura 55) [197]. LIF se encuentra constitutivamente expresado en el epitelio del útero y de la vía aérea [196], tejidos donde los macrófagos son inmunosupresores y contribuyen al mantenimiento de tolerancia local [25,198]. Recientemente, Duluc y sus colaboradores han demostrado el carácter anti-inflamatorio de LIF en los monocitos y los macrófagos en el contexto del cáncer de ovario. LIF e IL-6 derivado de ascitis tumorales promueven la polarización de los macrófagos M2 en los monocitos de manera M-CSF dependiente [199]. En línea con el carácter anti-inflamatorio de LIF, el sobrenadante de los MØ-GM expuestos a MTX (LIF⁺) promueve la expresión de los marcadores MØ-M en monocitos de sangre periférica (Figura 55) (datos no mostrados). El MTX es una droga con una potencia excepcional para el tratamiento de las articulaciones inflamadas, sin embargo el mecanismo exacto por el que ejerce su acción anti-inflamatoria se desconoce. En relación con el papel inmunoregulador de LIF, se podría hipotetizar que el LIF generado en respuesta a MTX podría promover polarización a MØ-M en los monocitos sinoviales, un fenotipo que se correlaciona con el que se encuentra en la membrana sinovial sana.

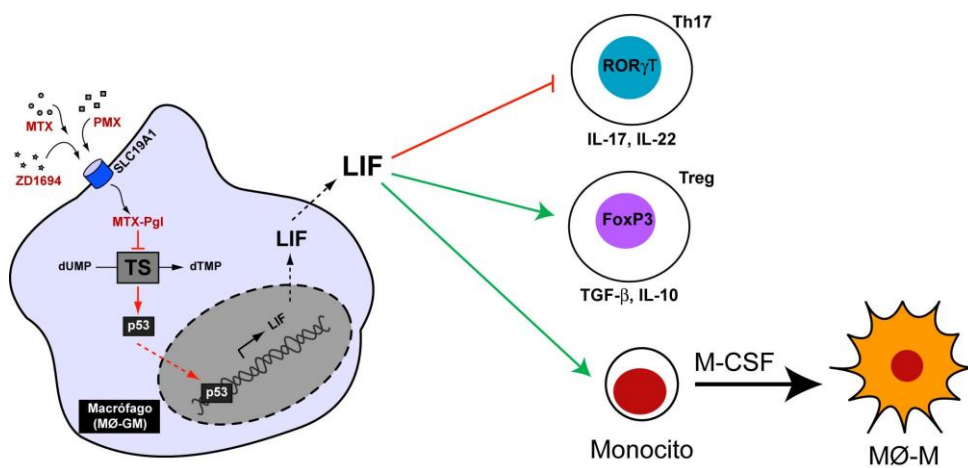


Figura 55. Papel de LIF secretado por los macrófagos MØ-GM en respuesta a MTX y otros antifolatos. LIF inhibe la diferenciación de células Th17, promueve la diferenciación de células T reguladoras (Treg) y de monocitos a macrófagos M2 (MØ-M).

La mayoría de los efectos adversos de las dosis comúnmente utilizadas de MTX en enfermedades reumáticas (afectaciones gastrointestinales, mucocutáneas ó neurológicas) no tienen carácter grave. Los efectos adversos más relevantes del tratamiento con MTX son la toxicidad pulmonar, hepática y hematológica. Aunque algunos de estos efectos son dosis-dependiente y pueden prevenirse mediante tratamiento con folatos, éstos no previenen la toxicidad pulmonar y hepática [200]. Respecto a la toxicidad en el hígado, el MTX induce fibrosis hepática, si bien la progresión de fibrosis a cirrosis es rara incluso después de dosis acumuladas del MTX superiores a 5 gramos [201,202]. La hepatotoxicidad de MTX se reduce al utilizar dosis bajas y pautas de administración semanal del fármaco. De forma global, se puede concluir, por tanto, que los mecanismos que subyacen a la fibrosis hepática inducida por MTX se desconocen. El hecho de que la “firma génica” de los macrófagos tratados con MTX obtenida en los “microarrays” indique un incremento significativo en la expresión de los genes implicados en la fibrosis hepática y en la activación de las células estrelladas (Figura 29), y de que el MTX tenga como diana selectiva los macrófagos polarizados con GM-CSF como los que se encuentran en pulmón [203,204], nos permite hipotetizar que la hepatotoxicidad y/o toxicidad pulmonar promovida por el MTX es macrófago-dependiente, hipótesis que se está estudiando actualmente.

Polarización de los macrófagos en artritis reumatoide

En la última parte de los resultados examinamos el estado de polarización de los macrófagos en AR. La determinación del estado de polarización de los macrófagos en condiciones fisiológicas y patológicas está proporcionando información relevante para el desarrollo potencial de terapias anti-inflamatorias [2,205]. En el caso de la AR, el estado de polarización exacto de los macrófagos de AR no había sido resuelto [135,144]. La predominancia de los macrófagos pro-inflamatorios en las articulaciones de AR podría venir inferida por los estudios que muestran el alto nivel de citoquinas pro-inflamatorias en la capa íntima o “lining” en las articulaciones de pacientes con AR comparando con espondiloartritis [144,147]. Nosotros profundizamos este estudio y demostramos que los macrófagos CD14⁺ del líquido sinovial y de la membrana sinovial de pacientes con AR muestran un perfil

transcriptómico y proteico compatible con la polarización de los macrófagos GM-CSF-dependiente. Además, demostramos que el líquido sinovial de AR contiene activina A, que contribuye significativamente a la polarización de los macrófagos en articulaciones de AR.

Hemos comparado el perfil transcripcional de las células CD14⁺ aisladas del líquido sinovial de AR y del líquido ascítico derivado de tumor (TAM). En línea con resultados previos, la firma génica de las células CD14⁺ de tumores ascíticos revela un perfil de polarización similar a los macrófagos polarizados por M-CSF [164]. Por el contrario, las células CD14⁺ aisladas del líquido sinovial de AR muestran mayor proximidad con los genes implicados en la polarización de los macrófagos MØ-GM en el análisis de la agrupación jerárquica no supervisada y una alta expresión de marcadores que caracterizan polarización GM-CSF dependiente, incluyendo *CCR2*, *MMP12*, *EGLN3* e *INHBA* [48,49]. Las células dendríticas también se localizan en el líquido y en la membrana sinovial de AR y contribuyen a la patogénesis de la enfermedad. Una de las dudas que planteada en la caracterización de los macrófagos CD14⁺ del líquido sinovial era si estas células podrían ser células dendríticas. El trabajo de Segura y sus colaboradores muestra que las células CD14⁺ del líquido sinovial de AR son principalmente los macrófagos con una menor contribución de las células dendríticas inflamatorias (15%), que poseen la capacidad exclusiva de producir IL-23 tras la estimulación [206]. En nuestros experimentos no detectamos IL-23 en el líquido sinovial de AR, lo que apoya el hecho de que las células CD14⁺ aislados *ex vivo* del líquido sinovial de AR sean los macrófagos, y sugiere que la modulación de la polarización de los macrófagos representa una estrategia terapéutica en AR.

El perfil transcripcional de los macrófagos CD14⁺ de líquido sinovial de AR se valida a nivel de proteína en los macrófagos de articulaciones de pacientes con AR activa, incluyendo la activina A (codificada por *INHBA*), la prolil hidroxilasa PHD3 (codificada por *EGLN3*), la quimioquina *CCR2* y la metaloproteasa *MMP12*. Otros autores han descrito la expresión de *MMP12* y *CCR2* en los macrófagos sinoviales de AR. Los niveles de *MMP12* se han asociado con un incremento de los macrófagos y con la severidad de las lesiones, y se han correlacionado con la patogénesis y con la progresión de la enfermedad [207]. Respecto a la regulación de

la expresión, GM-CSF y MCP-1 son activadores [208,209], mientras que PPAR γ inhibe MMP12 [210,211]. El MMP12 contribuye a la hiperplasia sinovial, la formación del “pannus” y la degeneración del cartílago articular en la artritis inflamatoria en conejos, por lo que la inhibición de MMP12 podría ser potencialmente terapéutica para el tratamiento de la AR [207]. El CCR2 se expresa en los macrófagos en las articulaciones de pacientes con AR y en modelos animales de AR [212,213]. La expresión del PHD3 en los macrófagos de AR es novedosa y se correlaciona con su reciente identificación como marcador de M ϕ -GM en tejidos bajo respuesta inflamatoria (colitis ulcerosa) [49]. El PHD3 es diana del factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) [49,214], por lo que su expresión en los macrófagos de articulaciones de AR es compatible con el ambiente hipóxico y la actividad neo-angiogénica, normalmente encontrada en las articulaciones con AR activa (Figura 56) [215].

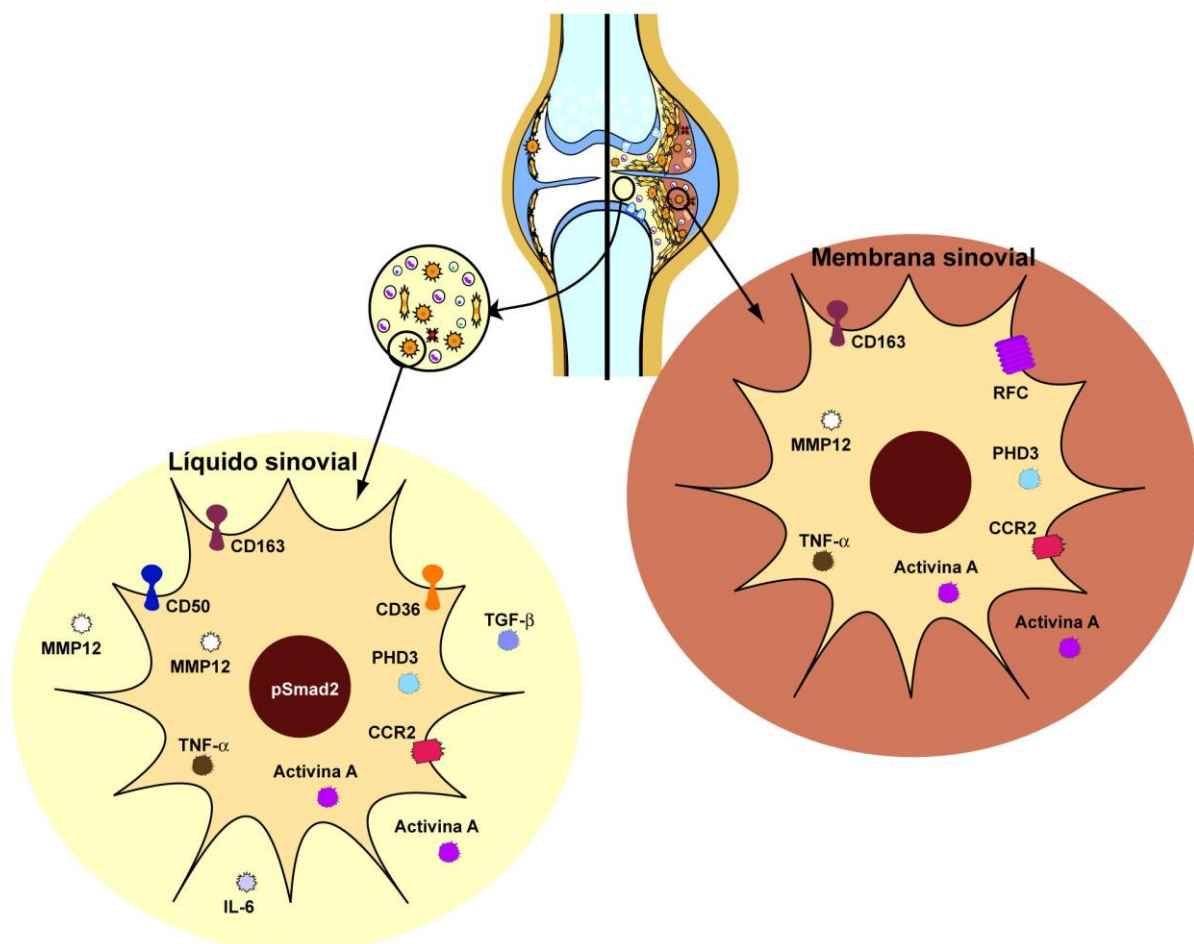


Figura 56. Representación de los marcadores de los macrófagos descritos en esta tesis en el líquido sinovial (izquierda) y la membrana sinovial (derecha) de pacientes con AR determinado por qRT-PCR, ELISA, citometría de flujo, inmunofluorescencia y “Western blot”.

Nuestros resultados también indican que la activina A, miembro de la familia del TGF- β que señaliza por la vía canónica a través de Smad2/3 y que está codificada por el gen *INHBA*, media en parte la capacidad de polarización de los macrófagos del líquido sinovial de AR [48,216,217]. Los resultados relacionan la AR con otras enfermedades inflamatorias en las que la activina A aparece elevada en los estadios tempranos de la enfermedad [155], como en pacientes con septicemia [218] o en modelos animales de inflamación inducida por LPS [219]. Además, nuestros hallazgos constatan la importancia de los macrófagos en la etiopatogenia de la AR porque los macrófagos del líquido sinovial expresan altos niveles de ARNm de *INHBA* y porque los niveles de activina A son mayores en la membrana sinovial de pacientes con AR activa que en pacientes control [220,221]. Por ello, la activina A no debería ser considerada solo como un marcador de polarización de los macrófagos en AR sino también debería considerarse una diana terapéutica. Esta sugerencia se ha establecido para otras enfermedades inflamatorias (enfermedades pulmonares, como el síndrome de distrés respiratorio, la obstrucción pulmonar crónica, fibrosis quística y el asma; inflamación y fibrosis hepática, riñón y páncreas; la cicatrización; enfermedades inflamatorias crónicas como la enfermedad inflamatoria intestinal (como el Crohn) y la pre-eclamsia) [216] e incluso para AR [155]. A pesar de que los niveles de activina A no correlacionan con el DAS28 o con la duración de la enfermedad, la utilidad de la activina A como biomarcador en AR podría venir apoyada por el hecho de que los niveles de activina A son diferentes en pacientes con AR bajo distintas terapias. La concentración de activina A en el líquido sinovial es significativamente mayor en pacientes tratados con anti-CD20 que en pacientes tratados con DMARD sintéticos (MTX, leflunomida o sales de oro) o anti-TNF- α . En cualquier caso, el establecimiento de una correlación entre los niveles de activina A en la sinovia y la progresión de la AR puede estar comprometido por su efecto dual en la inflamación. Como otros miembros de la familia del TGF- β , la activina A muestra funciones pro-inflamatorias (estimula la secreción *in vitro* de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6, así como la expresión de iNOS y la producción de NO) o anti-inflamatorias (bloquea la producción y función de citoquinas inflamatorias como IL-1 β e IL-6) dependiendo de su concentración y del contexto celular [222]. En el caso particular de la AR, los niveles de activina A se asemejan a condiciones pro-inflamatorias [155], lo que refuerza su contribución a la polarización de macrófagos en la sinovia inflamada.



Conclusiones

1. La internalización y acumulación de THF caracteriza a MØ-M tanto *in vitro* como *in vivo*. Los MØ-M internalizan más 5-MTHF a pH 7.4, de manera dependiente de FR- β , y pH 5.5, de manera dependiente de PCFT, que los MØ-GM.
2. Los macrófagos inflamatorios *in vivo* expresan predominantemente RFC, mientras que PCFT y FR- β se expresan preferencialmente en macrófagos en condiciones homeostáticas, lo que implica que el perfil de expresión de transportadores de folato refleja el estado inflamatorio del tejido y discrimina polarización de macrófagos.
3. La activina A modula la expresión de RFC y FR- β y la internalización de 5-MTHF en macrófagos.
4. El metotrexato (MTX) tiene un efecto contexto y diferenciación-dependiente en células mieloides que viene determinado por los niveles de expresión de timidilato sintasa (TS).
5. La respuesta a MTX en macrófagos es polarización dependiente y está determinada por el eje TS-p53.
6. LIF y CCL20 constituyen marcadores de respuesta a MTX en macrófagos pro-inflamatorios.
7. Los macrófagos de líquido sinovial (LS) de AR muestran un perfil génico similar a los MØ-GM pro-inflamatorios generados *in vitro*.
8. Los macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de pacientes con AR activa presentan un fenotipo pro-inflamatorio característico de MØ-GM y expresan MMP12, PHD3, CCR2 y TNF- α .
9. La activina A del líquido sinovial de AR contribuye a la polarización pro-inflamatoria de macrófagos en AR.



Bibliografía

1. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013) Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496: 445-455.
2. Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122: 787-795.
3. Ganz T (2012) Macrophages and systemic iron homeostasis. *J Innate Immun* 4: 446-453.
4. Liu G, Yang H (2013) Modulation of macrophage activation and programming in immunity. *J Cell Physiol* 228: 502-512.
5. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW (2013) Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* 496: 445-455.
6. Gordon S (2007) The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* 37 Suppl 1: S9-17.
7. van Furth R, Cohn ZA (1968) The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 128: 415-435.
8. Hoeffel G, Chen J, Lavin Y, Low D, Almeida FF, et al. (2015) C-myb(+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* 42: 665-678.
9. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
10. Italiani P, Boraschi D (2014) From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol* 5: 514.
11. Biswas SK, Mantovani A (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11: 889-896.
12. Mantovani A, Sica A, Locati M (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23: 344-346.
13. Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604.
14. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23: 549-555.
15. Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton JA (2009) GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol* 86: 411-421.
16. Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD (2007) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation. *J Immunol* 178: 5245-5252.
17. Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8: 958-969.
18. Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW (2011) Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One* 6: e26317.
19. Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G (2007) IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology* 45: 475-485.
20. Ruitter DJ, van der Meulen J, Brouwer A, Hummel MJ, Mauw BJ, et al. (1981) Uptake by liver cells of endotoxin following its intravenous injection. *Lab Invest* 45: 38-45.

21. Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE (2005) Intestinal macrophages: unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* 206: 149-159.
22. Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Pulendran B (2007) Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 8: 1086-1094.
23. Smythies LE, Sellers M, Clements RH, Mosteller-Barnum M, Meng G, et al. (2005) Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *J Clin Invest* 115: 66-75.
24. Weinberg JB, Haney AF, Xu FJ, Ramakrishnan S (1991) Peritoneal fluid and plasma levels of human macrophage colony-stimulating factor in relation to peritoneal fluid macrophage content. *Blood* 78: 513-516.
25. Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, et al. (2009) Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest* 119: 3723-3738.
26. Horsnell WG, Brombacher F (2010) Genes associated with alternatively activated macrophages discretely regulate helminth infection and pathogenesis in experimental mouse models. *Immunobiology* 215: 704-708.
27. Nemeth E, Baird AW, O'Farrelly C (2009) Microanatomy of the liver immune system. *Semin Immunopathol* 31: 333-343.
28. Yamamoto T, Kaizu C, Kawasaki T, Hasegawa G, Umezumi H, et al. (2008) Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for repopulation and differentiation of Kupffer cells but not for splenic red pulp macrophages in osteopetrotic (op/op) mice after macrophage depletion. *Cell Tissue Res* 332: 245-256.
29. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, et al. (2008) Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol* 86: 398-408.
30. Weis N, Weigert A, von Knethen A, Brune B (2009) Heme oxygenase-1 contributes to an alternative macrophage activation profile induced by apoptotic cell supernatants. *Mol Biol Cell* 20: 1280-1288.
31. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175-184.
32. Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, et al. (2007) Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447: 1116-1120.
33. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, et al. (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116: 115-124.
34. Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, et al. (2013) JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. *Science* 339: 218-222.
35. Lacey DC, Achuthan A, Fleetwood AJ, Dinh H, Roiniotis J, et al. (2012) Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J Immunol* 188: 5752-5765.
36. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
37. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M (2013) Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 229: 176-185.
38. Biswas SK, Mantovani A (2012) Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab* 15: 432-437.

39. Odegaard JI, Chawla A (2011) Alternative macrophage activation and metabolism. *Annu Rev Pathol* 6: 275-297.
40. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A (2006) Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177: 7303-7311.
41. Schaer CA, Vallelian F, Imhof A, Schoedon G, Schaer DJ (2008) Heme carrier protein (HCP-1) spatially interacts with the CD163 hemoglobin uptake pathway and is a target of inflammatory macrophage activation. *J Leukoc Biol* 83: 325-333.
42. Sierra-Filardi E, Vega MA, Sanchez-Mateos P, Corbi AL, Puig-Kroger A (2010) Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology* 215: 788-795.
43. Cairo G, Recalcati S, Mantovani A, Locati M (2011) Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol* 32: 241-247.
44. Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, et al. (2013) Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* 496: 238-242.
45. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2008) The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 222: 155-161.
46. Bories G, Colin S, Vanhoutte J, Derudas B, Copin C, et al. (2013) Liver X receptor activation stimulates iron export in human alternative macrophages. *Circ Res* 113: 1196-1205.
47. Puig-Kroger A, Sierra-Filardi E, Dominguez-Soto A, Samaniego R, Corcuera MT, et al. (2009) Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res* 69: 9395-9403.
48. Sierra-Filardi E, Puig-Kroger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, et al. (2011) Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* 117: 5092-5101.
49. Escribese MM, Sierra-Filardi E, Nieto C, Samaniego R, Sanchez-Torres C, et al. (2012) The prolyl hydroxylase PHD3 identifies proinflammatory macrophages and its expression is regulated by activin A. *J Immunol* 189: 1946-1954.
50. Sierra-Filardi E, Nieto C, Dominguez-Soto A, Barroso R, Sanchez-Mateos P, et al. (2014) CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *J Immunol* 192: 3858-3867.
51. Fox JT, Stover PJ (2008) Folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm* 79: 1-44.
52. Stover PJ (2004) Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev* 62: S3-12; discussion S13.
53. Zhao R, Matherly LH, Goldman ID (2009) Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med* 11: e4.
54. Smith AD, Kim YI, Refsum H (2008) Is folic acid good for everyone? *Am J Clin Nutr* 87: 517-533.
55. Bailey LB, Gregory JF, 3rd (1999) Folate metabolism and requirements. *J Nutr* 129: 779-782.
56. Ifergan I, Assaraf YG (2008) Molecular mechanisms of adaptation to folate deficiency. *Vitam Horm* 79: 99-143.

57. Nijhout HF, Reed MC, Ulrich CM (2008) Mathematical models of folate-mediated one-carbon metabolism. *Vitam Horm* 79: 45-82.
58. Steinfeld R, Grapp M, Kraetzner R, Dreha-Kulaczewski S, Helms G, et al. (2009) Folate receptor alpha defect causes cerebral folate transport deficiency: a treatable neurodegenerative disorder associated with disturbed myelin metabolism. *Am J Hum Genet* 85: 354-363.
59. Grapp M, Just IA, Linnankivi T, Wolf P, Lucke T, et al. (2012) Molecular characterization of folate receptor 1 mutations delineates cerebral folate transport deficiency. *Brain* 135: 2022-2031.
60. Matherly LH, Goldman DI (2003) Membrane transport of folates. *Vitam Horm* 66: 403-456.
61. Hou Z, Matherly LH (2014) Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Curr Top Membr* 73: 175-204.
62. Zhao R, Diop-Bove N, Visentin M, Goldman ID (2011) Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu Rev Nutr* 31: 177-201.
63. Patterson D, Graham C, Cherian C, Matherly LH (2008) A humanized mouse model for the reduced folate carrier. *Mol Genet Metab* 93: 95-103.
64. Zhao R, Goldman ID (2013) Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors. *Mol Aspects Med* 34: 373-385.
65. Zhao R, Qiu A, Tsai E, Jansen M, Akabas MH, et al. (2008) The proton-coupled folate transporter: impact on pemetrexed transport and on antifolates activities compared with the reduced folate carrier. *Mol Pharmacol* 74: 854-862.
66. Whetstone JR, Flatley RM, Matherly LH (2002) The human reduced folate carrier gene is ubiquitously and differentially expressed in normal human tissues: identification of seven non-coding exons and characterization of a novel promoter. *Biochem J* 367: 629-640.
67. Inoue K, Nakai Y, Ueda S, Kamigaso S, Ohta KY, et al. (2008) Functional characterization of PCFT/HCP1 as the molecular entity of the carrier-mediated intestinal folate transport system in the rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294: G660-668.
68. Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, et al. (2006) Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* 127: 917-928.
69. Salojin KV, Cabrera RM, Sun W, Chang WC, Lin C, et al. (2011) A mouse model of hereditary folate malabsorption: deletion of the PCFT gene leads to systemic folate deficiency. *Blood* 117: 4895-4904.
70. Grapp M, Wrede A, Schweizer M, Huwel S, Galla HJ, et al. (2013) Choroid plexus transcytosis and exosome shuttling deliver folate into brain parenchyma. *Nat Commun* 4: 2123.
71. Shen J, Hilgenbrink AR, Xia W, Feng Y, Dimitrov DS, et al. (2014) Folate receptor-beta constitutes a marker for human proinflammatory monocytes. *J Leukoc Biol* 96: 563-570.
72. Elnakat H, Ratnam M (2004) Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 1067-1084.
73. Solanky N, Requena Jimenez A, D'Souza SW, Sibley CP, Glazier JD (2010) Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta* 31: 134-143.
74. Low PS, Henne WA, Doorneweerd DD (2008) Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Acc Chem Res* 41: 120-129.

75. Zhao R, Min SH, Wang Y, Campanella E, Low PS, et al. (2009) A role for the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) in folate receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 284: 4267-4274.
76. Bianchi E, Doe B, Goulding D, Wright GJ (2014) Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* 508: 483-487.
77. Farber S, Diamond LK (1948) Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. *N Engl J Med* 238: 787-793.
78. Lopez-Olivo MA, Siddhanamatha HR, Shea B, Tugwell P, Wells GA, et al. (2014) Methotrexate for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev* 6: CD000957.
79. Cronstein BN (2005) Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev* 57: 163-172.
80. Williams HJ, Willkens RF, Samuelson CO, Jr., Alarcon GS, Guttadauria M, et al. (1985) Comparison of low-dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. A controlled clinical trial. *Arthritis Rheum* 28: 721-730.
81. Swierkot J, Szechinski J (2006) Methotrexate in rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rep* 58: 473-492.
82. Frei E, 3rd, Blum RH, Pitman SW, Kirkwood JM, Henderson IC, et al. (1980) High dose methotrexate with leucovorin rescue. Rationale and spectrum of antitumor activity. *Am J Med* 68: 370-376.
83. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA (1983) The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 309: 1094-1104.
84. Chara L, Sanchez-Atrio A, Perez A, Cuende E, Albarran F, et al. (2012) Monocyte populations as markers of response to adalimumab plus MTX in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 14: R175.
85. Hernandez-Baldizon S (2012) [How to effectively use methotrexate in rheumatoid arthritis?]. *Reumatol Clin* 8: 42-45.
86. Lennard L (2001) Therapeutic drug monitoring of cytotoxic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 52: 75S-87S.
87. Chladek J, Grim J, Martinkova J, Simkova M, Vaniekova J, et al. (2002) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of low-dose methotrexate in the treatment of psoriasis. *Br J Clin Pharmacol* 54: 147-156.
88. Walling J (2006) From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates. *Invest New Drugs* 24: 37-77.
89. Chan ES, Cronstein BN (2010) Methotrexate--how does it really work? *Nat Rev Rheumatol* 6: 175-178.
90. Dervieux T, Orentas Lein D, Marcelletti J, Pischel K, Smith K, et al. (2003) HPLC determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates after low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 49: 1632-1641.
91. Hoekstra M, Haagsma C, Neef C, Proost J, Knuif A, et al. (2004) Bioavailability of higher dose methotrexate comparing oral and subcutaneous administration in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 31: 645-648.
92. Godfrey C, Sweeney K, Miller K, Hamilton R, Kremer J (1998) The population pharmacokinetics of long-term methotrexate in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol* 46: 369-376.
93. Holmboe L, Andersen AM, Mørkrid L, Slørdal L, Hall KS (2012) High dose methotrexate chemotherapy: pharmacokinetics, folate and toxicity in osteosarcoma patients. *Br J Clin Pharmacol* 73: 106-114.

94. Garcia-Bennett A, Nees M, Fadeel B (2011) In search of the Holy Grail: Folate-targeted nanoparticles for cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 81: 976-984.
95. Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP (2000) Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* 47: 247-257.
96. Blits M, Jansen G, Assaraf YG, van de Wiel MA, Lems WF, et al. (2013) Methotrexate normalizes up-regulated folate pathway genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 65: 2791-2802.
97. S.E.R. (2008) Manual de las enfermedades reumáticas. Ed Médica Panamericana 5ª ed.
98. Rheumatism) ETELA (2009) 10 things you should know about rheumatic diseases. (Internet) Disponible en: <http://www.eular.org/myUploadData/files/10things> on RDPdf.
99. Shahrara S, Amin MA, Woods JM, Haines GK, Koch AE (2003) Chemokine receptor expression and in vivo signaling pathways in the joints of rats with adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 3568-3583.
100. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, et al. (2010) 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 69: 1580-1588.
101. Firestein GS, Zvaifler NJ (1987) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. A critical assessment of the role of autologous stimulation in the perpetuation of rheumatoid synovitis. *Rheum Dis Clin North Am* 13: 447-461.
102. Thomson W, Harrison B, Ollier B, Wiles N, Payton T, et al. (1999) Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis: results from a large, population-based study. *Arthritis Rheum* 42: 757-762.
103. Firestein GS (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423: 356-361.
104. Karlson EW, Deane K (2012) Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 38: 405-426.
105. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW (2009) Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 21: 279-283.
106. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW (2010) Rheumatoid arthritis. *Lancet* 376: 1094-1108.
107. Kinne RW, Stuhlmüller B, Burmester GR (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther* 9: 224.
108. Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, Smeets TJ, Kraan MC, et al. (2005) Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64: 834-838.
109. Bartok B, Firestein GS (2010) Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233: 233-255.
110. Choy EH, Panayi GS (2001) Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344: 907-916.
111. McInnes IB, Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365: 2205-2219.
112. Qu Z, Garcia CH, O'Rourke LM, Planck SR, Kohli M, et al. (1994) Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum* 37: 212-220.
113. Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, et al. (2008) Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum* 58: 2968-2980.

114. Miranda-Carus ME, Balsa A, Benito-Miguel M, Perez de Ayala C, Martin-Mola E (2004) IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate. *J Immunol* 173: 1463-1476.
115. Brennan FM, McInnes IB (2008) Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 118: 3537-3545.
116. Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, et al. (2002) Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J Clin Invest* 110: 1419-1427.
117. Gravallesse EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, et al. (2000) Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum* 43: 250-258.
118. Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravallesse EM (2006) RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45: 1068-1076.
119. Vincenti MP, Brinckerhoff CE (2002) Transcriptional regulation of collagenase (MMP-1, MMP-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Res* 4: 157-164.
120. Hou WS, Li W, Keyszer G, Weber E, Levy R, et al. (2002) Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* 46: 663-674.
121. Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, Maki RA, Tortorella MD, et al. (2002) Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. *J Immunol* 168: 1405-1412.
122. Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR (2000) Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2: 189-202.
123. McCoy JM, Wicks JR, Audoly LP (2002) The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 110: 651-658.
124. Danks L, Sabokbar A, Gundle R, Athanasou N (2002) Synovial macrophage-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis* 61: 916-921.
125. Fattahi MJ, Mirshafiey A (2012) Prostaglandins and rheumatoid arthritis. *Arthritis* 2012: 239310.
126. Ducreux J, Durez P, Galant C, Nzeusseu Toukap A, Van den Eynde B, et al. (2014) Global molecular effects of tocilizumab therapy in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheumatol* 66: 15-23.
127. Robak T, Gladalska A, Stepien H (1998) The tumour necrosis factor family of receptors/ligands in the serum of patients with rheumatoid arthritis. *Eur Cytokine Netw* 9: 145-154.
128. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B (1996) Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 39: 115-124.
129. Hamilton JA, Tak PP (2009) The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 60: 1210-1221.
130. Wijbrandts CA, Vergunst CE, Haringman JJ, Gerlag DM, Smeets TJ, et al. (2007) Absence of changes in the number of synovial sublining macrophages after ineffective treatment for rheumatoid arthritis: Implications for use of synovial sublining macrophages as a biomarker. *Arthritis Rheum* 56: 3869-3871.
131. Pollard JW (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 9: 259-270.
132. Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Dunn AR, Grail D, et al. (1998) Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J Immunol* 161: 3639-3644.

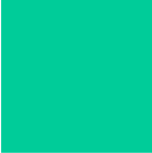
133. Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Hamilton JA (2000) The colony-stimulating factors and collagen-induced arthritis: exacerbation of disease by M-CSF and G-CSF and requirement for endogenous M-CSF. *J Leukoc Biol* 68: 144-150.
134. Cook AD, Braine EL, Campbell IK, Rich MJ, Hamilton JA (2001) Blockade of collagen-induced arthritis post-onset by antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): requirement for GM-CSF in the effector phase of disease. *Arthritis Res* 3: 293-298.
135. Li J, Hsu HC, Mountz JD (2012) Managing macrophages in rheumatoid arthritis by reform or removal. *Curr Rheumatol Rep* 14: 445-454.
136. Benjamini YaH, Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc* 57: 289-300.
137. Stout RD, Suttles J (2004) Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 76: 509-513.
138. Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seed B (1989) Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73: 284-289.
139. Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Garo E, Ifrah N, et al. (2013) IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PLoS One* 8: e56045.
140. Murray PJ, Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11: 723-737.
141. Dominguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Puig-Kroger A, Perez-Maceda B, Gomez-Aguado F, et al. (2011) Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *J Immunol* 186: 2192-2200.
142. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, et al. (2004) 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.
143. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH (2006) Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol* 79: 285-293.
144. Ambarus CA, Noordenbos T, de Hair MJ, Tak PP, Baeten DL (2012) Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res Ther* 14: R74.
145. Gong M, Cowan KH, Gudas J, Moscow JA (1999) Isolation and characterization of genomic sequences involved in the regulation of the human reduced folate carrier gene (RFC1). *Gene* 233: 21-31.
146. Sabharanjak S, Mayor S (2004) Folate receptor endocytosis and trafficking. *Adv Drug Deliv Rev* 56: 1099-1109.
147. Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, Krausz S, Cantaert T, et al. (2009) Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 60: 966-975.
148. Becker ML, van Haandel L, Gaedigk R, Lasky A, Hoeltzel M, et al. (2010) Analysis of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with juvenile idiopathic arthritis: effect of route of administration on variability in intracellular methotrexate polyglutamate concentrations. *Arthritis Rheum* 62: 1803-1812.

149. Stamp L, Roberts R, Kennedy M, Barclay M, O'Donnell J, et al. (2006) The use of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis - are we entering a new era of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics? *Biomed Pharmacother* 60: 678-687.
150. Goker E, Waltham M, Kheradpour A, Trippett T, Mazumdar M, et al. (1995) Amplification of the dihydrofolate reductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gene mutations. *Blood* 86: 677-684.
151. Braun J, Rau R (2009) An update on methotrexate. *Curr Opin Rheumatol* 21: 216-223.
152. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J (2003) The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 409-426.
153. Chung SJ, Kwon YJ, Park MC, Park YB, Lee SK (2011) The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Yonsei Med J* 52: 113-120.
154. Graf U, Casanova EA, Cinelli P (2011) The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) - Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells. *Genes (Basel)* 2: 280-297.
155. Dong F, He X (2014) Activin A: a potential therapeutic target for characterizing and stopping joint pain early in rheumatoid arthritis patients. *Inflammation* 37: 170-176.
156. Gonen N, Assaraf YG (2012) Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist Updat* 15: 183-210.
157. Chattopadhyay S, Moran RG, Goldman ID (2007) Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications. *Mol Cancer Ther* 6: 404-417.
158. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 402-412.
159. Lowe JM, Menendez D, Bushel PR, Shatz M, Kirk EL, et al. (2014) p53 and NF-kappaB coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Cancer Res* 74: 2182-2192.
160. Agarwal SK (2011) Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. *J Manag Care Pharm* 17: S14-18.
161. Estecha A, Aguilera-Montilla N, Sanchez-Mateos P, Puig-Kroger A (2012) RUNX3 regulates intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) expression during macrophage differentiation and monocyte extravasation. *PLoS One* 7: e33313.
162. Puig-Kroger A, Serrano-Gomez D, Caparros E, Dominguez-Soto A, Relloso M, et al. (2004) Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. *J Biol Chem* 279: 25680-25688.
163. de las Casas-Engel M, Dominguez-Soto A, Sierra-Filardi E, Bragado R, Nieto C, et al. (2013) Serotonin skews human macrophage polarization through HTR2B and HTR7. *J Immunol* 190: 2301-2310.
164. Biswas SK, Allavena P, Mantovani A (2013) Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Semin Immunopathol* 35: 585-600.
165. Nagai T, Tanaka M, Tsuneyoshi Y, Xu B, Michie SA, et al. (2009) Targeting tumor-associated macrophages in an experimental glioma model with a recombinant immunotoxin to folate receptor beta. *Cancer Immunol Immunother* 58: 1577-1586.
166. van der Heijden JW, Oerlemans R, Dijkmans BA, Qi H, van der Laken CJ, et al. (2009) Folate receptor beta as a potential delivery route for novel folate antagonists to macrophages in the synovial tissue of rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum* 60: 12-21.

167. Northrop-Clewes CA, Thurnham DI (2013) Biomarkers for the differentiation of anemia and their clinical usefulness. *J Blood Med* 4: 11-22.
168. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, et al. (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122: 789-801.
169. Bozard BR, Ganapathy PS, Duplantier J, Mysona B, Ha Y, et al. (2010) Molecular and biochemical characterization of folate transport proteins in retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 3226-3235.
170. Wlodarczyk B, Spiegelstein O, Gelineau-van Waes J, Vorce RL, Lu X, et al. (2001) Arsenic-induced congenital malformations in genetically susceptible folate binding protein-2 knockout mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 177: 238-246.
171. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G (2012) The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 11: 215-233.
172. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, et al. (2013) Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* 23: 249-262.
173. Kaneno R, Shurin GV, Tourkova IL, Shurin MR (2009) Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *J Transl Med* 7: 58.
174. King TJ, Georgiou KR, Cool JC, Scherer MA, Ang ES, et al. (2012) Methotrexate Chemotherapy Promotes Osteoclast Formation in the Long Bone of Rats via Increased Pro-Inflammatory Cytokines and Enhanced NF-kappaB Activation. *Am J Pathol* 181: 121-129.
175. Jekic B, Lukovic L, Bunjevacki V, Milic V, Novakovic I, et al. (2013) Association of the TYMS 3G/3G genotype with poor response and GGH 354GG genotype with the bone marrow toxicity of the methotrexate in RA patients. *Eur J Clin Pharmacol* 69: 377-383.
176. Lima A, Seabra V, Bernardes M, Azevedo R, Sousa H, et al. (2014) Role of key TYMS polymorphisms on methotrexate therapeutic outcome in portuguese rheumatoid arthritis patients. *PLoS One* 9: e108165.
177. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA (2014) Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 533: 11-20.
178. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N (2003) Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Mol Med* 11: 593-600.
179. DiPaolo A, Chu E (2004) The role of thymidylate synthase as a molecular biomarker. *Clin Cancer Res* 10: 411-412.
180. Dervieux T, Furst D, Lein DO, Capps R, Smith K, et al. (2004) Polyglutamation of methotrexate with common polymorphisms in reduced folate carrier, aminoimidazole carboxamide ribonucleotide transformylase, and thymidylate synthase are associated with methotrexate effects in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 50: 2766-2774.
181. Mandola MV, Stoecklacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, et al. (2003) A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res* 63: 2898-2904.
182. Lurje G, Manegold PC, Ning Y, Pohl A, Zhang W, et al. (2009) Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. *Mol Cancer Ther* 8: 1000-1007.
183. Ulrich CM, Bigler J, Velicer CM, Greene EA, Farin FM, et al. (2000) Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common

- polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1381-1385.
184. Ghodke Y, Chopra A, Joshi K, Patwardhan B (2008) Are Thymidylate synthase and Methylene tetrahydrofolate reductase genes linked with methotrexate response (efficacy, toxicity) in Indian (Asian) rheumatoid arthritis patients? *Clin Rheumatol* 27: 787-789.
 185. Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz HJ, Ladner RD (2014) Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 11: 282-298.
 186. Chu E, Copur SM, Ju J, Chen TM, Khleif S, et al. (1999) Thymidylate synthase protein and p53 mRNA form an in vivo ribonucleoprotein complex. *Mol Cell Biol* 19: 1582-1594.
 187. Ju J, Pedersen-Lane J, Maley F, Chu E (1999) Regulation of p53 expression by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3769-3774.
 188. Yamanishi Y, Boyle DL, Rosengren S, Green DR, Zvaifler NJ, et al. (2002) Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10025-10030.
 189. Dalrymple JM, Stamp LK, O'Donnell JL, Chapman PT, Zhang M, et al. (2008) Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58: 3299-3308.
 190. Wessels JA, van der Kooij SM, le Cessie S, Kievit W, Barerra P, et al. (2007) A clinical pharmacogenetic model to predict the efficacy of methotrexate monotherapy in recent-onset rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56: 1765-1775.
 191. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Serio B, Straub RH (2001) Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 60: 729-735.
 192. Wolf J, Stranzl T, Filipits M, Pohl G, Pirker R, et al. (2005) Expression of resistance markers to methotrexate predicts clinical improvement in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64: 564-568.
 193. Ranganathan P, McLeod HL (2006) Methotrexate pharmacogenetics: the first step toward individualized therapy in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54: 1366-1377.
 194. Moncrieffe H, Hinks A, Ursu S, Kassoumeri L, Etheridge A, et al. (2010) Generation of novel pharmacogenomic candidates in response to methotrexate in juvenile idiopathic arthritis: correlation between gene expression and genotype. *Pharmacogenet Genomics* 20: 665-676.
 195. Metcalfe SM (2011) LIF in the regulation of T-cell fate and as a potential therapeutic. *Genes Immun* 12: 157-168.
 196. Metcalf D (2003) The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem Cells* 21: 5-14.
 197. Cao W, Yang Y, Wang Z, Liu A, Fang L, et al. (2011) Leukemia inhibitory factor inhibits T helper 17 cell differentiation and confers treatment effects of neural progenitor cell therapy in autoimmune disease. *Immunity* 35: 273-284.
 198. Svensson J, Jenmalm MC, Matussek A, Geffers R, Berg G, et al. (2011) Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J Immunol* 187: 3671-3682.
 199. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, et al. (2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood* 110: 4319-4330.
 200. Goodman TA, Polisson RP (1994) Methotrexate: adverse reactions and major toxicities. *Rheum Dis Clin North Am* 20: 513-528.
 201. West SG (1997) Methotrexate hepatotoxicity. *Rheum Dis Clin North Am* 23: 883-915.

202. Anelli MG, Scioscia C, Grattagliano I, Lapadula G (2012) Old and new antirheumatic drugs and the risk of hepatotoxicity. *Ther Drug Monit* 34: 622-628.
203. Guillemins M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, et al. (2013) Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* 210: 1977-1992.
204. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, et al. (2013) Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity* 38: 792-804.
205. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP (2011) Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11: 738-749.
206. Segura E, Touzot M, Bohineust A, Cappuccio A, Chiochia G, et al. (2013) Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation. *Immunity* 38: 336-348.
207. Wang X, Liang J, Koike T, Sun H, Ichikawa T, et al. (2004) Overexpression of human matrix metalloproteinase-12 enhances the development of inflammatory arthritis in transgenic rabbits. *Am J Pathol* 165: 1375-1383.
208. Wu L, Tanimoto A, Murata Y, Fan J, Sasaguri Y, et al. (2001) Induction of human matrix metalloproteinase-12 gene transcriptional activity by GM-CSF requires the AP-1 binding site in human U937 monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 285: 300-307.
209. Schonbeck U, Mach F, Sukhova GK, Atkinson E, Levesque E, et al. (1999) Expression of stromelysin-3 in atherosclerotic lesions: regulation via CD40-CD40 ligand signaling in vitro and in vivo. *J Exp Med* 189: 843-853.
210. Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J (1998) Macrophages in human atheroma contain PPAR γ : differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) expression and reduction of MMP-9 activity through PPAR γ activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol* 153: 17-23.
211. Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, et al. (2000) Transforming growth factor- β 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem* 275: 25766-25773.
212. Quinones MP, Ahuja SK, Jimenez F, Schaefer J, Garavito E, et al. (2004) Experimental arthritis in CC chemokine receptor 2-null mice closely mimics severe human rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 113: 856-866.
213. Katschke KJ, Jr., Rottman JB, Ruth JH, Qin S, Wu L, et al. (2001) Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood, synovial fluid, and synovial tissue monocytes/macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 44: 1022-1032.
214. Ma X, Wang X, Cao J, Geng Z, Wang Z (2014) Effect of proline analogues on activity of human prolyl hydroxylase and the regulation of HIF signal transduction pathway. *PLoS One* 9: e95692.
215. Paleolog EM (2002) Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S81-90.
216. Hedger MP, de Kretser DM (2013) The activins and their binding protein, follistatin- Diagnostic and therapeutic targets in inflammatory disease and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 24: 285-295.
217. Sozzani S, Musso T (2011) The yin and yang of Activin A. *Blood* 117: 5013-5015.
218. Michel U, Ebert S, Phillips D, Nau R (2003) Serum concentrations of activin and follistatin are elevated and run in parallel in patients with septicemia. *Eur J Endocrinol* 148: 559-564.

- 
219. Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP (2009) Activin and related proteins in inflammation: not just interested bystanders. *Cytokine Growth Factor Rev* 20: 153-164.
 220. El-Gendi SS, Moniem AE, Tawfik NM, Ashmawy MM, Mohammed OA, et al. (2010) Value of serum and synovial fluid activin A and inhibin A in some rheumatic diseases. *Int J Rheum Dis* 13: 273-279.
 221. Ota F, Maeshima A, Yamashita S, Ikeuchi H, Kaneko Y, et al. (2003) Activin A induces cell proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48: 2442-2449.
 222. Massague J (2012) TGFbeta signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 616-630.



Anexo

Publicaciones derivadas de la tesis:

- Samaniego R*, **Palacios BS***, Domínguez-Soto A, Vidal C, Salas A, Matsuyama T, Sánchez-Torres C, de la Torre I, Miranda-Carús ME, Sánchez-Mateos P, Puig-Kröger A. Macrophage uptake and accumulation of folates are polarization-dependent in vitro and in vivo and are regulated by activin A. **J Leukoc Biol.** 2014 vol. **95** (5) **797-808**. doi:10.1189/jlb.0613345 (* coautores)
- **Soler Palacios B***, Estrada-Capetillo L*, Izquierdo E*, Criado G, Nieto C, Municio C, González-Álvaro I, Sánchez-Mateos P, Pablos JL, Corbí AL, Puig-Kröger A. Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile. **J Pathol.** 2015 Feb; **235** (3): **515-526**. doi:10.1002/path.4466. (* coautores)
- Cristina Municio*, **Blanca Soler Palacios***, Lizbeth Estrada-Capetillo*, Alberto Benguria, Ana Dopazo, Salvador Fernández-Arroyo, Jorge Joven, Marie Eugenia Miranda-Carús, Amaya Puig-Kröger. Methotrexate selectively targets human pro-inflammatory macrophages through a thymidylate synthase/p53 axis. **Arthritis & Rheumatology**. **Aceptado con revisión.** (* coautores)

Macrophage uptake and accumulation of folates are polarization-dependent in vitro and in vivo and are regulated by activin A

Rafael Samaniego,^{*,1} Blanca Soler Palacios,^{*,1} Angeles Domiguez-Soto,[†] Carlos Vidal,[‡] Azucena Salas,[§] Takami Matsuyama,^{||} Carmen Sánchez-Torres,[¶] Inmaculada de la Torre,[#] Maria Eugenia Miranda-Carús,^{**} Paloma Sánchez-Mateos,^{*} and Amaya Puig-Kröger^{*,2}

^{*}Laboratorio de Inmuno-Metabolismo, Unidad de Microscopía Confocal, [†]Servicio de Traumatología, and [‡]Servicio de Reumatología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain; [§]Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain; [¶]Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain; ^{||}Kagoshima University, Kagoshima, Japan; [¶]Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico Distrito Federal, Mexico; and ^{**}Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain

RECEIVED JUNE 22, 2013; REVISED NOVEMBER 11, 2013; ACCEPTED DECEMBER 23, 2013. DOI: 10.1189/jlb.0613345

ABSTRACT

Vitamin B9, commonly known as folate, is an essential cofactor for one-carbon metabolism that enters cells through three major specialized transporter molecules (RFC, FR, and PCFT), which differ in expression pattern, affinity for substrate, and ligand-binding pH dependency. We now report that the expression of the folate transporters differs between macrophage subtypes and explains the higher accumulation of 5-MTHF—the major folate form found in serum—in M2 macrophages in vitro and in vivo. M1 macrophages display a higher expression of RFC, whereas FR β and PCFT are preferentially expressed by anti-inflammatory and homeostatic M2 macrophages. These differences are also seen in macrophages from normal tissues involved in folate transit (placenta, liver, colon) and inflamed tissues (ulcerative colitis, RA), as M2-like macrophages from normal tissues express FR β and PCFT, whereas TNF- α -expressing M1 macrophages from inflamed tissues are RFC⁺. Besides, we provide evidences that activin A is a critical factor controlling the set of folate transporters in macrophages, as it down-regulates FR β , up-regulates RFC expression, and modulates 5-MTHF uptake. All of these experiments support the notion that folate handling is dependent on the stage of macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* 95: 000–000; 2014.

Abbreviations: 5-MTHF=5-methyltetrahydrofolate, ABC=ATP-binding cassette, ALK=activin receptor-like kinase, BCRP=breast cancer resistance protein, FOLR2=folate receptor 2, FPGS=folypoly- γ -glutamate synthetase, FR=folate receptor, GGH= γ -glutamyl hydrolase, HCP-1=heme carrier protein 1, MRP=multidrug resistance protein, PCFT=proton-coupled folate transporter, qRT-PCR=quantitative RT-PCR, RA=rheumatoid arthritis, RFC=reduced folate carrier, ROI=regions of interest, siRNA=small interfering RNA, SLC=solute-carrier gene, SPI1=spleen focus forming virus proviral integration oncogene, TAM=tumor-associated macrophage, TBP=TATA box-binding protein, THF=tetrahydrofolate

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

Introduction

Macrophages are phagocytic cells present in all tissues and show a remarkable plasticity in response to environmental signals [1, 2]. The development of macrophages from monocytes is regulated by the CSFs M-CSF and GM-CSF [3], with a prominent role for the transcription factor PU.1, together with C/EBP α and runt-related transcription factor 1 [4, 5]. In vitro, GM-CSF and M-CSF generate phenotypically and functionally different macrophages [6]; whereas GM-CSF-driven macrophages produce proinflammatory TNF- α , IL-23, and IL-12 in response to TLR ligands and promote type 1 immunity, M-CSF-derived macrophages produce IL-10 in response to pathogens, inhibit Th1 responses, and exhibit regulatory properties [3, 7, 8]. Therefore, GM-CSF- and M-CSF-induced macrophages are considered proinflammatory (M1 macrophages) and anti-inflammatory (M2 macrophages), respectively.

Folic acid is a member of the B-complex family of vitamins produced by most bacteria and plants by de novo biosynthesis. Mammalian cells do not have the metabolic machinery to synthesize folates, and folate requirements depend mainly on dietary sources [9]. The reduced form of the vitamin, 5-MTHF, functions as a cofactor in one-carbon transfer reactions and plays a key role in metabolic pathways involved in DNA synthesis, epigenetic processes, and proliferation [9, 10]. The regulation of total cellular folate concentrations depends on uptake, polyglutamylation, export, and catabolism [10]. Folate uptake is mediated by three distinct systems [9]: (1) the RFC (gene symbol SLC19A1), a bidirectional transporter ubiquitously expressed in normal adult tissues and the major route of folate transport to tissues at physiological pH; (2) the high-affinity

1. Both of these authors contributed equally, and the order of authors should be considered arbitrarily.
2. Correspondence: Laboratorio de Inmuno-Metabolismo, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Doctor Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain. E-mail: amaya.puig@salud.madrid.org

Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile

Blanca Soler Palacios,^{1#} Lizbeth Estrada-Capetillo,^{1#} Elena Izquierdo,^{2#} Gabriel Criado,³ Concha Nieto,² Cristina Municio,¹ Isidoro González-Alvaro,⁴ Paloma Sánchez-Mateos,^{1,5} Jose Luis Pablos,³ Angel L Corbi^{2##} and Amaya Puig-Kröger^{1###*}

¹ Laboratorio de Inmuno-Metabolismo, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

² Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain

³ Servicio de Reumatología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

⁴ Servicio de Reumatología, Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain

⁵ Departamento de Microbiología I, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Spain

*Correspondence to: A Puig-Kröger, Laboratorio de Inmuno-Metabolismo, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

E-mail: amaya.puig@salud.madrid.org

#These authors contributed equally to this study.

##These authors contributed equally to this study.

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease whose pathogenesis and severity correlates with the presence of macrophage-derived pro-inflammatory cytokines within the inflamed synovium. Macrophage-derived cytokines fuel the pathological processes in RA and are targets of clinically successful therapies. However, although macrophage polarization determines cytokine production, the polarization state of macrophages in RA joints remains poorly defined. To dissect the molecular basis for the tissue-damaging effects of macrophages in RA joints, we undertook the phenotypic and transcriptomic characterization of *ex vivo* isolated CD14⁺ RA synovial fluid (RA-SF) macrophages. Flow cytometry and gene profiling indicated that RA-SF macrophages express pro-inflammatory polarization markers (MMP12, EGLN3, CCR2), lack expression of markers associated with homeostatic and anti-inflammatory polarization (IGF1, HTR2B) and exhibit a transcriptomic profile that resembles the activin A-dependent gene signature of pro-inflammatory *in vitro*-generated macrophages. In fact, high levels of Smad-activating activin A were found in RA-SF and, accordingly, the Smad signalling pathway was activated in *ex vivo*-isolated RA-SF macrophages. *In vitro* experiments on monocytes and macrophages indicated that RA-SF promoted the acquisition of pro-inflammatory markers (INHBA, MMP12, EGLN3, CCR2) but led to a significant reduction in the expression of genes associated with homeostasis and inflammation resolution (FOLR2, SERPINB2, IGF1, CD36), thus confirming the pro-inflammatory polarization ability of RA-SF. Importantly, the macrophage-polarizing ability of RA-SF was inhibited by an anti-activin A-neutralizing antibody, thus demonstrating that activin A mediates the pro-inflammatory macrophage-polarizing ability of RA-SF. Moreover, and in line with these findings, multicolour immunofluorescence evidenced that macrophages within RA synovial membranes (RA-SM) also express pro-inflammatory polarization markers whose expression is activin A-dependent. Altogether, our results demonstrate that macrophages from RA synovial fluids and membranes exhibit an MMP12⁺ EGLN3⁺ CCR2⁺ pro-inflammatory polarization state whose acquisition is partly dependent on activin A from the synovial fluid.

Copyright © 2014 Pathological Society of Great Britain and Ireland. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: activin A; macrophages; rheumatoid arthritis; synovial fluid

Received 30 May 2014; Revised 20 September 2014; Accepted 13 October 2014

No conflicts of interest were declared.

Introduction

RA is a systemic autoimmune disease characterized by chronic joint inflammation, cartilage destruction and bone erosions [1]. Macrophages in the inflamed synovium are key effector cells in RA, and are the major source of cytokines that contribute to pathology, such as TNF α [2]. Numerous experimental data indicate

that macrophages play a pathogenic role in RA, since increased numbers of macrophages in the synovial tissue correlate with the degree of joint erosion and contribute to hyperplasia of the intimal lining layer [3,4]. Moreover, CD68⁺ sublining macrophage numbers differ between effective and ineffective treatments [5,6], indicating that sublining macrophages constitute a biomarker of response to treatment in RA patients.



Methotrexate selectively targets human pro-inflammatory macrophages through a thymidylate synthase/p53 axis

Journal:	<i>Arthritis & Rheumatology</i>
Manuscript ID:	ar-15-0246
Wiley - Manuscript type:	Full Length
Date Submitted by the Author:	10-Feb-2015
Complete List of Authors:	Municio, Cristina; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Immuno-Metabolism Soler Palacios, Blanca; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Immuno-Metabolism Estrada-Capetillo, Lizbeth; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Immuno-Metabolism Benguria, Alberto; Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Genomics Unit Dopazo, Ana; Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Genomics Unit Fernández, Salvador; Hospital Universitari de Sant Joan, Unitat de Recerca Biomèdica Joven, Jorge; Hospital Universitari de Sant Joan, Unitat de Recerca Biomèdica Miranda-Carús, María-Eugenia; Hospital La Paz - IdiPaz, Rheumatology Puig-Kröger, Amaya; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Immuno-Metabolism
Keywords:	Monocytes/macrophages, Rheumatoid Arthritis, Methotrexate, Gene Expression

SCHOLARONE™
Manuscripts

Methotrexate selectively targets human pro-inflammatory macrophages through a thymidylate synthase/p53 axis

Authors: **Cristina Municio**^{1,*}, **Blanca Soler Palacios**^{1,*}, **Lizbeth Estrada-Capetillo**¹, **Alberto Benguria**², **Ana Dopazo**², **Salvador Fernández-Arroyo**³, **Jorge Joven**³, **Maria Eugenia Miranda-Carús**⁴ and **Amaya Puig-Kröger**¹

¹Laboratorio de Inmuno-Metabolismo, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

²Genomics Unit. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain.

³Unitat de Recerca Biomèdica, Hospital Universitari de Sant Joan, IISPV, Reus, Spain.

⁴Departamento de Reumatología, Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, Madrid, Spain.

*Equal contribution

Corresponding author: **Amaya Puig-Kröger**

Laboratorio de Inmuno-Metabolismo, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Madrid, Spain.

Phone: +34-915868750

FAX: +34-91-5868749

e-mail: amaya.puig@salud.madrid.org

This work was supported by grant PI11/00165 and PI14/00075 from Instituto de Salud Carlos III to APK, and grants S2010/BMD2350 from Comunidad de Madrid/FEDER (RAPHYME Program) and RIER RD12/0009 to MEMC and APK. APK is supported by FIBHGM and LEC is supported by CONACYT (ref. 232377).

ABSTRACT

Objective: Methotrexate (MTX) functions as an anti-proliferative agent in cancer and an anti-inflammatory drug in rheumatoid arthritis (RA). Although macrophages critically contribute to RA pathology, their response to MTX remains unknown. As a mean to identify MTX-response markers, we have explored its transcriptional effect on macrophages polarized by GM-CSF (GM-MØ) or M-CSF (M-MØ), which resemble pro-inflammatory and anti-inflammatory macrophages found in RA and normal joints, respectively.

Methods: The transcriptomic profile of MTX-exposed macrophages in long and short term schedules were determined using gene expression microarrays, and validated through qRT-PCR and ELISA. The molecular pathway involved in macrophage MTX-responsiveness was determined through pharmacological, siRNA mediated knock down approaches, western blot and immunofluorescence on RA and normal joints.

Results: MTX exhibited a minor transcriptional effect on M-MØ but modulated the expression of 2024 genes in pro-inflammatory GM-MØ, where it induced CCL20 and LIF at the mRNA and protein level. Pharmacological and siRNA-mediated approaches indicated that the macrophage subset-specific MTX responsiveness correlates with thymidylate synthase (TS) expression, as pro-inflammatory TS⁺ GM-MØ are susceptible to MTX, whereas anti-inflammatory TS^{low/-} M-MØ and monocytes are refractory to MTX. Furthermore, p53 activity was found to mediate the TS-dependent MTX-responsiveness of pro-inflammatory TS⁺ GM-MØ. Importantly, TS and p53 were found to be expressed by CD163⁺/TNF α ⁺ GM-CSF-polarized macrophages from RA joints but not from normal synovium.

Conclusion: Macrophage response to MTX is polarization-dependent and determined by the TS-p53 axis. CCL20 and LIF constitute novel macrophage markers for MTX responsiveness.

INTRODUCTION

Methotrexate (MTX) is a drug currently used for the treatment of a number of malignant diseases including acute lymphoblastic leukemia, breast cancer and osteosarcoma (1, 2). MTX functions as a competitive inhibitor of the dihydrofolate reductase (DHFR) which results in suppression of tetrahydrofolate (THF)-dependent reactions primarily by depletion of cellular folate cofactors (3). MTX is polyglutamylated inside the cells by the enzyme folylpolyglutamate synthetase (FPGS) increasing their retention within the cells. Importantly, polyglutamates of MTX (MTX-Pgl) are long-lived active compounds and potent inhibitors of thymidylate synthase (*TYMS*, TS) and aminoimidazole-carboxamide-ribonucleoside (AICAR) transformylase, enzymes involved in the *de novo* synthetic pathway of pyrimidines and purines required for DNA replication and repair and cellular proliferation (3). This mechanism of action is responsible for the success of MTX as an anti-malignant drug. Beyond its use as an anti-proliferative agent in chemotherapeutic regimens, MTX has long been used as an anti-inflammatory agent for the treatment of autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (RA), psoriasis, systemic lupus erythematosus and Crohn's disease (4). Although the precise mechanism for the therapeutic action of MTX on these pathologies remains unclear, the release of adenosine, the inhibition of polyamines, and generation of reactive oxygen species (ROS) through JNK activation have been reported to mediate the anti-inflammatory action of MTX in RA (5-7). Recent studies indicate that MTX treatment restores the expression of altered folate metabolism genes during RA (8). Importantly, different doses of MTX are administered for the treatment of different pathologies: high-dose MTX therapy (intravenous 5000 mg/week) is used for malignant diseases whereas low-doses MTX are used weekly for autoimmune diseases (intramuscular or oral 5-25 mg/week) (5).

Macrophages play an important role in the sequence of events between chronic inflammation/tumorigenesis and tumor progression/metastasis and a positive correlation exists

MTX responsiveness in macrophages

between the presence of tumor-associated macrophages and a bad prognosis (9, 10). The contribution of macrophages to tumor development could be inferred from the impaired tumor progression seen in animals with altered macrophage differentiation (11, 12). Macrophages are also critical cellular component in RA pathogenesis since increased numbers of macrophages in the synovial tissue correlate with the degree of joint erosion and contribute to hyperplasia of the intimal lining layer (13-15). Macrophages are key cells of the innate immune response and fulfill a variety of effector functions depending on the activation of specific signaling pathways, transcription factors and their metabolic adaptation, that critically control macrophage plasticity and polarization (16-18). *In vitro*, a well-established method for generating pro-inflammatory and anti-inflammatory macrophages is the differentiation of monocytes in the presence of GM-CSF or M-CSF (19). In response to TLR ligands GM-CSF-driven macrophages produce pro-inflammatory TNF α , IL-23 and IL-12p40 and promote type 1 immunity, whereas M-CSF-derived macrophages produce IL-10, inhibit Th1 responses and exhibit regulatory properties (12, 20, 21). Therefore, GM-CSF-and M-CSF-polarized macrophages are considered as pro-inflammatory (GM-M \emptyset) and anti-inflammatory (M-M \emptyset) macrophages, respectively.

Whereas MTX has a clear anti-proliferative action on tumor cells, its effect on pro- and anti-inflammatory macrophages remains undefined. Therefore, we decided to determine the MTX-dependent gene expression profile in human macrophages. We explored the role of MTX in long-term and short-term schedules in peripheral blood monocytes, GM-M \emptyset and M-M \emptyset , and found evidences for the context-dependent effect of MTX on human myeloid cells. Moreover, we found a series of novel biomarkers for MTX responsiveness in pro-inflammatory GM-CSF polarized-macrophages.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture.- Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma) gradient according to standard procedures. Monocytes were purified from PBMC by magnetic cell sorting using CD14 microbeads (Miltenyi Biotech). Monocytes were cultured at 0.5×10^6 cells/ml for 7 days in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum, at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, and containing GM-CSF (1000U/ml, ImmunoTools GmbH) or M-CSF (10 ng/ml, ImmunoTools GmbH) to generate GM-CSF-polarized macrophages (GM-MØ) or M-CSF-polarized macrophages (M-MØ). MTX (5 nM to 5 µM), pemetrexed (PMX, 50 nM), raltitrexed (ZD1694, 50 nM), folinic acid, thymidine, pifithrin- α , nutlin-3 (100 µM, 10 µM, 25-50 µM and 10 µM respectively, Sigma-Aldrich) was added once on monocytes together with the indicated cytokine, or on monocytes and 7-day differentiated macrophages for 24 or 48h.

Gene expression profiling.-For long-term MTX treatment, RNA was isolated from three independent preparations of monocytes either unexposed or exposed to MTX (5 µM) and differentiated to GM-MØ or M-MØ for 7-days. For short-term schedule, RNA was isolated from three independent samples of fully differentiated GM-MØ either unexposed or exposed to MTX (50 nM) for 48h, by using RNeasy Mini kit (Qiagen). Labeled RNA (200 ng) was hybridized to an Agilent Human v2 4x44K array (G4845A, Agilent Technologies). Raw data files were pre-processed with GeneSpring v12 (Agilent). Raw signal values (in log base 2) were thresholded to 1 and arrays were normalized using quantiles (22). Probes with normalized signal values greater than the 20th lower percentile and flagged as Detected (Present) or Not Detected (Marginal) in 100% of the replicates in 1 out of the 4 conditions were retained (22079 probes). The Limma package from Bioconductor was used for differential gene expression analysis. Raw p-values were corrected for false discovery rate control using the Benjamini Hochsberg method. Microarray data have been

MTX responsiveness in macrophages

deposited in the Gene Expression Omnibus (GSE64531). Functional analysis was performed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (www.ingenuity.com).

Quantitative real time RT-PCR.- Total RNA was retrotranscribed and cDNA was quantified using the Universal Human Probe Roche library (Roche Diagnostics). Oligonucleotides for selected genes were designed according to the Roche software (Supplementary Table 1). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed on a LightCycler® 480 (Roche Diagnostics). Assays were made in triplicates and results normalized according to the expression levels of *TBP*. Results were obtained using the $\Delta\Delta CT$ method for quantitation.

ELISA.- Supernatants from monocytes, GM-MØ and M-MØ were tested for the presence of CCL20 (R&D Systems) and LIF (eBioscience) using ELISA.

Western-blot and TS cloning.- Cell lysates were obtained in RIPA buffer containing 2 mM Pefabloc, 2 mg/ml aprotinin/antipain/leupeptin/pepstatin, 10 mM NaF, and 1 mM Na_3VO_4 . 50 micrograms cell lysate was subjected to SDS-PAGE and transferred onto an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Protein detection was carried out using an anti-human TS polyclonal Ab (Abcam, ab108995), mAb against GAPDH (sc-32233; Santa Cruz Biotechnology) or vinculin (hVIN-1; Sigma-Aldrich). The TS-pcDNA3 construct was generated by PCR amplification with oligonucleotides 5'-CTCGAG CCGCCGCGCCATGCCTGTG-3' and 5'-CCCCAAGCTTGAAAGCACCCCTAAACAGCCATT-3', and the resulting fragment was cloned into XhoI/HindIII-digested pcDNA3.1(-) plasmid. HEK 293T cells were transiently transfected with Superfect (QIAGEN, Hilden, Germany).

Immunohistochemistry and multicolor confocal microscopy.- The following antibodies were used: FITC-labeled anti-CD163 (Ber-Mac3, MBL International Corp., MA), anti-TS (Abcam, ab108995), anti-TNF α (Abcam, ab1793), isotype matched control antibodies and fluorochrome-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch). RA synovial tissues were obtained by surgical synovectomy from 9 RA patients with progressive disease requiring knee joint replacement surgery. Normal synovial tissues were obtained from 6 patients undergoing elective knee arthroscopic examination for minor orthopedic conditions on otherwise normal joints according to MRI, arthroscopy and histology. Patients received informed consent and Hospital General Universitario Gregorio Marañón ethics committees approved the study. Tissues were snap frozen in OCT, and 4 μ m cryosections were blocked for 10 min with 1% human immunoglobulins, and incubated with primary (1-5 μ g/ml) and appropriate secondary antibodies. Imaging was performed with an inverted confocal microscope (SP2, Leica Microsystems), using the 20x PL-APO NA 0.7 and the 63x PL-APO NA 1.3 glycerol immersion objectives. For imaging of macrophages, cells were plated on Poly-L-Lysine (Sigma) coated coverslips, fixed with 4% formaldehyde and, when indicated, permeabilized with 0.1% saponin for 10 min.

RNA interference.-Two different siRNA for TYMS (silencer select s14538, s14539) and one control siRNA (silencer select Negative Control #1) (Ambion, Life Technologies) were used at 100 nM. GM-M \emptyset were transfected with HiPerFect transfection reagent (QIAGEN), treated with MTX or PFT, and 48h later tested for mRNA levels by qRT-PCR.

Statistical analysis.- Statistical analysis was performed using paired student's t-test and a p value < 0.05 was considered significant (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

RESULTS

Identification of the gene profile of monocytes exposed to long-term MTX.- Weekly administered MTX is the most important disease-modifying antirheumatic agent for the treatment of RA and other rheumatic conditions. Moreover, MTX is a standard chemotherapeutic agent for the treatment of different type of cancers (3). To determine the influence of MTX on macrophage differentiation, monocytes were exposed to a single dose of MTX immediately before the initiation of the GM-CSF or M-CSF differentiation process and gene expression changes were analyzed at the end of the 7 day culture (Figure 1A). No effect of MTX on cell viability was observed in any of the experimental protocols (data not shown). Prolonged MTX treatment resulted in the generation of a transcriptional profile with 1200 upregulated and 824 downregulated genes in GM-CSF exposed monocytes compared to untreated GM-CSF cells (Figure 1B). By contrast, the presence of MTX had a different effect on the transcriptional profile of M-CSF polarized-macrophages with only 73 upregulated and 10 downregulated genes (Figure 1B). This result suggested a stronger effect of MTX on GM-CSF-driven macrophage differentiation. The list of genes whose expression was most affected by long-term exposure to MTX showed that 1956 genes were exclusively modulated in GM-CSF macrophages whereas 15 genes were modulated in M-CSF macrophages and 68 genes were commonly modulated by MTX in GM-CSF and M-CSF macrophages (Figure 1C, Supplementary Tables 1,2). Ingenuity pathways (IPA) analysis indicate the top canonical pathways of GM-CSF monocytes treated with MTX, which includes “Dendritic cell maturation”, “Hepatic fibrosis”, “Atherosclerosis signaling”, “Acute phase response signaling” and “Altered T cell and B cell signaling in Rheumatoid Arthritis” process (Figure 1D). The “hepatic fibrosis” pathway was also enriched among the genes modulated by MTX in M-MØ (Figure 1D), whereas the “Role of cytokines in mediating communication between immune cells”, and “Serine Biosynthesis” process was exclusively enriched in genes modulated by MTX in M-CSF cells.

Validation of the transcriptomic data.- MTX-treated monocytes led to the generation of macrophages with a significant and potentially increased expression on *CCL20* (in GM-MØ), *IL24*, *LIF*, *MET*, *AREG* and *GDF15* mRNA levels (in GM-MØ and M-MØ) and decreased *CD32*, *CD69* and *THBS1* (in GM-MØ) (Supplementary Tables 1, 2). To verify the transcriptomic data, monocytes from six different donors were exposed to MTX and differentiated to GM-MØ and M-MØ and the expression of these genes was analyzed (Figure 1E, Supplementary Figure 1). Long-term MTX treatment resulted in significantly enhanced expression of *CCL20* (20 fold for GM-MØ), *LIF* (20 fold for GM-MØ; 4 fold for M-MØ), *MET* (16 fold for GM-MØ and 14 fold for M-MØ) and *GDF15* (18 fold for GM-MØ and 7 fold for M-MØ), thus validating the transcriptomic data (Figure 1E). The higher effect in gene expression in MTX-treated GM-MØ than MTX-treated M-MØ indicates that the effect of MTX is conditioned by the cytokine context (GM-CSF vs M-CSF). In the next experiments we focused on *CCL20*, the gene with the highest up-regulation in MTX-exposed GM-MØ, and *LIF* mRNA, an immunomodulatory cytokine member of the IL-6 family, as representative MTX-modulated genes for both macrophage subtypes, GM-MØ and M-MØ.

MTX dose response and kinetic analysis during macrophage differentiation.- The concentration of MTX used for the microarray analysis was 5 µM, a high concentration used in cancer patients. MTX pharmacokinetic studies in RA patients administered 25-40 mg MTX showed peak plasma levels of 1-2 µM MTX two hours after drug administration, but plasma levels decline to 10-50 nM MTX within 24-48 hours after drug administration (23, 24). Therefore, we next performed dose response experiments with clinically relevant concentrations of MTX for RA patients. MTX at concentrations of 50 nM significantly increased *CCL20* and *LIF* mRNA levels in GM-MØ (Supplementary Figure 2A). By contrast, MTX at 5 nM did not modify gene expression, indicating that the effect of MTX treatment on CSF-dependent polarization of human monocytes begins with 50 nM MTX (Supplementary Figure 2A). Importantly, *CCL20* and *LIF* protein can be detected in

MTX responsiveness in macrophages

the culture supernatant of MTX-exposed pro-inflammatory GM-MØ but not in resting M-MØ (Supplementary Figure 2B). Supplementation with folinic acid completely reversed the up-regulation of *CCL20* and *LIF* mRNA and protein in MTX-exposed GM-MØ, indicating the specificity for folate metabolism (Supplementary Figure 2C,D). Kinetic analysis revealed that the expression of *CCL20* and *LIF* mRNA and protein significantly increased 4-5 days after MTX treatment and the protein reached maximum levels after 7 days during GM-CSF macrophage differentiation (Figure 2A,B). Altogether, these results validate the data from the global analysis of gene expression and indicate that *CCL20* and *LIF* constitute novel biomarkers for MTX responsiveness in GM-MØ.

Short-term exposure to MTX in monocytes and fully differentiated macrophages.- In order to explore the molecular basis for MTX response, we next performed short-term experiments in monocytes and fully differentiated macrophages. To that end, monocytes and 7-day differentiated GM-MØ and M-MØ were exposed to MTX for a short period (24-48h) and the expression of *CCL20*, *LIF*, *MET* and *GDF15* mRNA analyzed by qRT-PCR. MTX significantly increased *CCL20*, *LIF*, *MET* and *GDF15* mRNA in GM-MØ after 24h, an effect enhanced by 48h treatment (Figure 3A, Supplementary Figure 3). By contrast, a short-term exposure to MTX did not modify gene expression neither in monocytes nor in M-MØ. Interestingly, no induction of these genes was observed in MTX-exposed fibroblast or HEK 293T cells (Supplementary Figure 3). These results indicate a different MTX responsiveness in monocytes and macrophages and evidences for a context- and differentiation-dependent effect of MTX in myeloid cells.

The uptake and intracellular concentration of MTX was found to be similar in GM-MØ and M-MØ, showing that the differential responsiveness to MTX in macrophages is not due to the differential expression of folate transporters (25) (Supplementary Figure 4). Since MTX and MTX-Pgl inhibits

various target enzymes involved in one-carbon metabolism (DHFR, TS, ATIC) (Figure 3B) (3), we next analyzed the expression of MTX-metabolizing enzymes in monocytes, GM-MØ and M-MØ (Figure 3C). Whereas *FPGS* and *MTHFR* mRNA expression was significantly higher in monocytes than in macrophages and *ATIC* mRNA differed between GM-MØ and M-MØ, *DHFR* mRNA levels were kept constant (Figure 3C). By contrast, thymidylate synthase (*TYMS* or TS) was the only enzyme whose expression significantly differed between the three myeloid cell populations, and whose expression is higher in GM-MØ than in M-MØ or monocytes at the mRNA and protein level (Figure 3C-E). This result suggested that the different MTX responsiveness of GM-MØ and M-MØ could derive from their different TS content, a hypothesis that was tested subsequently.

Thymidylate synthase expression conditions MTX-responsiveness in macrophages.- The differential expression of TS on monocytes and macrophages led us to explore the role of this enzyme in MTX responsiveness in macrophages by altering its function or expression. The anti-folates pemetrexed (PMX) and raltitrexed (ZD1694), potent TS inhibitors (26), significantly increased *CCL20*, *LIF*, *MET* and *GDF15* mRNA in GM-MØ (Figure 4A), indicating that the inhibition of TS enzyme activity contribute to anti-folate (MTX, PMX, ZD1694) responsiveness in GM-MØ. Next, we determined the changes in gene expression induced by MTX or PMX in the presence of thymidine in GM-MØ. Supplementation with thymidine significantly diminished the up-regulation of *CCL20*, *LIF*, *MET* and *GDF15* mRNA in MTX or PMX-exposed GM-MØ (Figure 4B). To fully confirm that MTX-triggered gene expression changes were dependent on TS inhibition, we determined the effect of silencing TS expression in GM-MØ. Knock down of TS using two different small interfering RNA significantly increased *CCL20*, *LIF*, *MET* and *GDF15* mRNA levels (Figure 4C) whereas *SLC19A1* mRNA levels were kept constant and *TYMS* mRNA expression diminished, thus suggesting that the effect of MTX on *CCL20*, *LIF*, *MET* and *GDF15* gene expression depends on its capacity to inhibit TS. Moreover, MTX (Figure 4D) and PMX

MTX responsiveness in macrophages

(Figure 4E)-triggered gene induction significantly diminished (70-80%) when silencing TS in GM-MØ (Figure 4D), confirming this hypothesis.

Lastly, we found a correlation between TS expression during macrophage differentiation and MTX responsiveness. Kinetic studies revealed that *TYMS* mRNA and TS protein are initially detected 3 days after GM-CSF addition (Figure 4F), whereas MTX-response (CCL20 and LIF induction) begins on day 4 (Figure 2A). Conversely, the expression of other folate/MTX metabolizing enzymes (*FPGS*, *GGH*, *DHFR*, *GART*, *ATIC* and *MTHFR*) are essentially kept constant along GM-CSF and M-CSF driven macrophage differentiation (Supplementary Figure 5). Altogether, these results confirm that MTX responsiveness on macrophages depends on TS expression levels.

TS expression on macrophages from RA synovial tissue.- Previously, we have shown that macrophages from RA joints exhibit a GM-CSF-dependent transcriptomic and phenotypic pro-inflammatory polarization state (27). As macrophages represent an important MTX cellular target in RA, the expression of TS was determined in normal and active RA synovium. TS expression was found in CD163⁺/TNF α ⁺ macrophages within the sublining of RA synovial membranes (Figure 5A-C). By contrast, CD163⁺ macrophages in the normal synovium lacked TS and TNF α expression. Moreover, TNF α treated macrophages maintained *TYMS* expression and MTX responsiveness, an effect not observed with other pro-inflammatory (IFN- γ) or anti-inflammatory (IL-4) stimuli (Figure 5D). These results indicate that macrophages from RA synovium, and not from normal joints, represent a cellular target for MTX.

TS inhibition modulates p53-regulated genes in GM-MØ.- The molecular pathways that are involved in MTX-altered transcriptome in macrophages were analyzed by IPA. TP53 appeared as the top upstream regulator of the genes modulated by MTX during long-term (GM-CSF and M-CSF macrophage differentiation) and short-term (GM-MØ) schedules and with a predicted activated

state (Figure 6A). Moreover, gene set enrichment analysis (GSEA) in 48h MTX-treated GM-MØ showed enrichment in “p53 gene signature” (Figure 6B). The fact that TS inhibition by MTX increased *LIF*, *CCL20*, *MET* or *GDF15* mRNA (Figure 4A-C), all p53 target genes, (28, 29) and the predicted bioinformatics analysis, led us to explore the link between TS inhibition (MTX, PMX) and p53 activation in GM-MØ. As shown in Figure 6C, blocking p53 with pifithrin- α (PFT) dose dependently diminished MTX-responsiveness (*CCL20*, *LIF*, *MET*, *GDF15* mRNA) in GM-MØ. Importantly, activation of p53 with nutlin-3 (29) increased those genes in both GM-MØ and M-MØ (Supplementary Figure 6), indicating that the link between p53 activation in MTX-mediated gene expression in macrophages depends on TS expression. Finally and to investigate this relation, TS expression was knock-down in GM-MØ in the presence of PFT. The up-regulation of genes in response to TS silencing significantly diminished when p53 was blocked (Figure 6D). These results indicate that inhibition of TS in GM-MØ modulates p53 and p53 target genes in response to the antifolate MTX (Figure 6E,F). Importantly, p53 expression was detected in CD163⁺ GM-CSF-polarized macrophages from RA joints and not from normal synovium (Supplementary Figure 7). Altogether, these results show that macrophage response to MTX is polarization-dependent and determined by the TS-p53 axis.

DISCUSSION

In the present manuscript we show that human myeloid cells exhibit a cell type-specific responsiveness to MTX, and that MTX-responsiveness correlates with the level of expression of TS. Specifically, pro-inflammatory TS⁺ GM-MØ are susceptible to MTX, whereas anti-inflammatory TS^{low/-} M-MØ and monocytes, are refractory to MTX. Furthermore, we demonstrate that MTX responsiveness of human GM-CSF polarized-macrophages can be modified by altering TS expression or function by 1) thymidine, that bypasses the metabolic blockade; 2) antifolates pemetrexed and raltitrexed (ZD1694), that selectively targets TS; 3) siRNA-mediated knock-down of TS. All these results demonstrate that TS expression determines MTX-responsiveness in macrophages. Moreover, we show that p53 activity contributes to the TS-dependent MTX-responsiveness of human macrophages, thus providing evidence for the involvement of the TS-p53 axis in the macrophage response to MTX and in the differential responsiveness to MTX of monocytes and macrophages.

The role of anti-proliferative and chemotherapeutic drugs in myelomonocytic cells has been explored previously (30-33). A recent example is trabectedin, an anticancer drug used as second-line treatment of soft tissue sarcoma and ovarian carcinoma patients (31). Trabectedin blocks cancer cell proliferation by interacting with DNA, and also induce cell death specifically in monocytes and M2-polarized tumor-associated macrophages (31). Like trabectedin, MTX has selectivity for tumor-proliferating cells (3) and TS-expressing pro-inflammatory macrophages with a GM-CSF-dependent profile (this report). Importantly, GM-CSF contributes to the gene expression profile of macrophages in synovial fluid of RA (27), a pathology where MTX has shown a profound clinical benefit (4). In line with our findings, genetic polymorphisms affecting *TYMS* gene on MTX therapeutic outcome has been explored in RA patients (34, 35). *TYMS* gene expression is modulated by functional significant germ-line polymorphisms in the 5'-UTR (TSER 2R/3R repeat and TSER

3R G/C) and 3'-UTR (TS 1494del6b) of the gene (36, 37). Discrepant data are found in the literature indicating that the relation between *TYMS* polymorphisms and clinical response to MTX needs clarification (34, 35, 38).

TS catalyzes the reductive methylation of dUMP by 5,10-methyltetrahydrofolate to generate thymidylate and dihydrofolate (Figure 4B). This enzymatic reaction provides for the sole intracellular *de novo* source of thymidylate, an essential precursor for DNA biosynthesis and repair. As a result, TS remains a critical target enzyme in cancer chemotherapy. Inhibition of TS by chemotherapeutic drugs such as 5-fluorouracil (5-FU), PMX and ZD1694 results in decreased production of TMP, thymidylate deficiency, and imbalances in cellular nucleotide pools, which slow tumor growth by impairing DNA synthesis and repair (39). Moreover, TS represses expression of tumor suppressor genes such as *myc* and *p53* (40). These previous evidences are compatible with the data in this manuscript, as we demonstrate that MTX responsiveness of human macrophages is partly mediated by *p53*, because *p53* inhibitors limits the MTX-induced up-regulation of genes like *LIF* and *GDF15*, well known *p53* targets (28). Based on these results, we speculate that mutations in *p53* gene might lead to resistance to MTX treatment in RA patients, a phenomenon already established in tumors (41). Thus, determining the expression/activity of either *p53* or MTX-response genes in MTX responders and non-responders RA patients might allow the identification of clinically useful predictors of response to MTX, a tool currently non-existing in spite of the fact that MTX is the first choice for RA management (4).

In the manuscript, we also demonstrate that *LIF* and *CCL20* are novel markers for MTX responsiveness in human pro-inflammatory macrophages. The cytokine *LIF* belongs to the IL-6 family and exhibits pleiotropic functions. *LIF* is essential for blastocyst implantation, acts as a stimulus for platelet and bone formation, adipocyte lipid transport, muscle satellite cell proliferation

MTX responsiveness in macrophages

and promotes regulatory T cells (42, 43). LIF is constitutively expressed in the uterus and airway epithelia (42), tissues where macrophages are immunosuppressive and contribute to maintain local tolerance (44, 45). Previous studies have established the influence of LIF and IL-6 in monocytes and macrophages in the context of ovarian cancer. Tumor-associated LIF and IL-6 skewed monocytes into M2-polarized immunosuppressive macrophages in an M-CSF dependent manner (46). In line with these findings, the cell supernatant of MTX-exposed GM-MØ promotes an increase in M2-polarizing markers in peripheral blood monocytes (data not shown). MTX is a drug with an exceptional potency to treat inflammatory joint disease; however, as mentioned above, the precise mechanism by which MTX exerts its anti-inflammatory effects remains unclear. Consistent with the immunoregulatory role of LIF, it can be hypothesized that MTX-induced LIF (and other mediators) might drive a preferential M2 polarization in synovial monocytes, a phenotype that correlates with the one found in normal synovium (27).

MTX is a main anchor drug either alone or in many combination regimes with conventional disease-modifying anti-rheumatic drugs and biological agents in RA. MTX has the longest drug survival time and a good benefit/toxicity ratio. However, toxicity is a major reason for MTX withdrawal in RA patients (47). The major adverse effect of MTX is hepatotoxicity, principally in the form of fibrosis, followed by pneumonitis and neutropenia (5, 48). Since the transcriptional signature of MTX-treated macrophages indicates a significant increase in the expression of genes involved in hepatic fibrosis and stellate cell activation (Figure 1D), and MTX-selectively targets GM-CSF polarized macrophages as those found in the lung (49, 50), the hypothesis that MTX-mediated hepatotoxicity and/or pneumonitis is macrophage-dependent deserves further consideration and is currently under study.

REFERENCES

1. Sorich MJ, Pottier N, Pei D, Yang W, Kager L, Stocco G, et al. In vivo response to methotrexate forecasts outcome of acute lymphoblastic leukemia and has a distinct gene expression profile. *PLoS medicine*. 2008;5(4):e83.
2. Ferguson WS, Goorin AM. Current treatment of osteosarcoma. *Cancer investigation*. 2001;19(3):292-315.
3. Gonen N, Assaraf YG. Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist Updat*. 2012;15(4):183-210.
4. Braun J, Rau R. An update on methotrexate. *Current opinion in rheumatology*. 2009;21(3):216-23.
5. Chan ES, Cronstein BN. Methotrexate--how does it really work? *Nat Rev Rheumatol*. 2010;6(3):175-8.
6. Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol*. 2003;138(3):501-11.
7. Spurlock CF, 3rd, Tossberg JT, Fuchs HA, Olsen NJ, Aune TM. Methotrexate increases expression of cell cycle checkpoint genes via JNK activation. *Arthritis Rheum*. 2012;64(6):1780-9.
8. Blits M, Jansen G, Assaraf YG, van de Wiel MA, Lems WF, Nurmohamed MT, et al. Methotrexate normalizes up-regulated folate pathway genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2791-802.
9. Bingle L, Brown NJ, Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*. 2002;196(3):254-65.
10. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010;362(10):875-85.
11. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*. 2001;193(6):727-40.
12. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature reviews Immunology*. 2008;8(7):533-44.
13. Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1996;39(1):115-24.
14. Hamilton JA, Tak PP. The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum*. 2009;60(5):1210-21.
15. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3537-45.
16. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(11):750-61.
17. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell metabolism*. 2012;15(4):432-7.
18. Kratz M, Coats BR, Hisert KB, Hagman D, Mutskov V, Peris E, et al. Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages. *Cell metabolism*. 2014;20(4):614-25.
19. Akagawa KS. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int J Hematol*. 2002;76(1):27-34.
20. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, 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*. 2004;101(13):4560-5.

MTX responsiveness in macrophages

21. Sierra-Filardi E, Puig-Kroger A, Blanco FJ, Nieto C, Bragado R, Palomero MI, et al. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood*. 2011;117(19):5092-101.
22. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19(2):185-93.
23. Hoekstra M, Haagsma C, Neef C, Proost J, Knuif A, van de Laar M. Bioavailability of higher dose methotrexate comparing oral and subcutaneous administration in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2004;31(4):645-8.
24. Godfrey C, Sweeney K, Miller K, Hamilton R, Kremer J. The population pharmacokinetics of long-term methotrexate in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol*. 1998;46(4):369-76.
25. Samaniego R, Palacios BS, Domiguez-Soto A, Vidal C, Salas A, Matsuyama T, et al. Macrophage uptake and accumulation of folates are polarization-dependent in vitro and in vivo and are regulated by activin A. *J Leukoc Biol*. 2014.
26. Chattopadhyay S, Moran RG, Goldman ID. Pemetrexed: biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(2):404-17.
27. Palacios BS, Estrada-Capetillo L, Izquierdo E, Criado G, Nieto C, Municio C, et al. Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A-dependent pro-inflammatory profile. *J Pathol*. 2014.
28. Riley T, Sontag E, Chen P, Levine A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(5):402-12.
29. Lowe JM, Menendez D, Bushel PR, Shatz M, Kirk EL, Troester MA, et al. p53 and NF-kappaB coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Cancer Res*. 2014;74(8):2182-92.
30. Galluzzi L, Senovilla L, Zitvogel L, Kroemer G. The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(3):215-33.
31. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Liguori M, et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell*. 2013;23(2):249-62.
32. Kaneno R, Shurin GV, Tourkova IL, Shurin MR. Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *Journal of translational medicine*. 2009;7:58.
33. King TJ, Georgiou KR, Cool JC, Scherer MA, Ang ES, Foster BK, et al. Methotrexate Chemotherapy Promotes Osteoclast Formation in the Long Bone of Rats via Increased Pro-Inflammatory Cytokines and Enhanced NF-kappaB Activation. *Am J Pathol*. 2012;181(1):121-9.
34. Lima A, Seabra V, Bernardes M, Azevedo R, Sousa H, Medeiros R. Role of key TYMS polymorphisms on methotrexate therapeutic outcome in portuguese rheumatoid arthritis patients. *PLoS One*. 2014;9(10):e108165.
35. Jekic B, Lukovic L, Bunjevacki V, Milic V, Novakovic I, Damnjanovic T, et al. Association of the TYMS 3G/3G genotype with poor response and GGH 354GG genotype with the bone marrow toxicity of the methotrexate in RA patients. *European journal of clinical pharmacology*. 2013;69(3):377-83.
36. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Res*. 2003;63(11):2898-904.

37. Lurje G, Manegold PC, Ning Y, Pohl A, Zhang W, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene variations: predictive and prognostic markers. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(5):1000-7.
38. Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *International journal of molecular medicine.* 2003;11(5):593-600.
39. Wilson PM, Danenberg PV, Johnston PG, Lenz HJ, Ladner RD. Standing the test of time: targeting thymidylate biosynthesis in cancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology.* 2014;11(5):282-98.
40. Ju J, Pedersen-Lane J, Maley F, Chu E. Regulation of p53 expression by thymidylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(7):3769-74.
41. Goker E, Waltham M, Kheradpour A, Trippett T, Mazumdar M, Elisseyeff Y, et al. Amplification of the dihydrofolate reductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gene mutations. *Blood.* 1995;86(2):677-84.
42. Metcalf D. The unsolved enigmas of leukemia inhibitory factor. *Stem cells.* 2003;21(1):5-14.
43. Metcalfe SM. LIF in the regulation of T-cell fate and as a potential therapeutic. *Genes and immunity.* 2011;12(3):157-68.
44. Bedoret D, Wallemacq H, Marichal T, Desmet C, Quesada Calvo F, Henry E, et al. Lung interstitial macrophages alter dendritic cell functions to prevent airway allergy in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3723-38.
45. Svensson J, Jenmalm MC, Matussek A, Geffers R, Berg G, Emerudh J. Macrophages at the fetal-maternal interface express markers of alternative activation and are induced by M-CSF and IL-10. *J Immunol.* 2011;187(7):3671-82.
46. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood.* 2007;110(13):4319-30.
47. Grove ML, Hassell AB, Hay EM, Shadforth MF. Adverse reactions to disease-modifying anti-rheumatic drugs in clinical practice. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians.* 2001;94(6):309-19.
48. Akoun GM, Gauthier-Rahman S, Mayaud CM, Touboul JL, Denis MF. Leukocyte migration inhibition in methotrexate-induced pneumonitis. Evidence for an immunologic cell-mediated mechanism. *Chest.* 1987;91(1):96-9.
49. Guilliams M, De Kleer I, Henri S, Post S, Vanhoutte L, De Prijck S, et al. Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med.* 2013;210(10):1977-92.
50. Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al. Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity.* 2013;38(4):792-804.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Determination of the long-term MTX-dependent transcriptomic profile of monocytes and validation of the transcriptomic data. **A.** Schematic representation of the experiments. MTX (5 μ M) was added once on monocytes and mRNA levels were determined at day 7 of the GM-CSF (Mo+GM) or M-CSF (Mo+M)-induced differentiation. Quantification (**B**) and comparison (**C**) of the number of genes whose expression is significantly altered (adjusted $p < 0.05$) on MTX-treated monocytes after 7 day of the GM-CSF (Mo+GM) or M-CSF (Mo+M)-induced differentiation. **D.** Analysis for molecular functions significantly enriched within the sets of genes whose expression is altered by MTX exposure in Mo+GM (left) and Mo+M (right). **E.** *CCL20*, *LIF*, *MET* and *GDF15* mRNA expression levels determined by qRT-PCR on monocytes differentiated with GM-CSF (Mo+GM) or M-CSF (Mo+M) in the absence or in the presence of MTX. Results are expressed as relative mRNA levels, which indicate the expression of each gene in MTX-treated relative to its expression in untreated cells. Mean and SEM of six independent donors are shown ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$).

Figure 2. MTX induces CCL20 and LIF expression on day 5 of the GM-CSF differentiation. CCL20 (upper panel) and LIF (lower panel) mRNA expression levels determined by qRT-PCR (**A**) or ELISA (**B**) on monocytes differentiated with GM-CSF or M-CSF in the absence or in the presence of 50 nM of MTX. MTX was added once on monocytes and mRNA (**A**) or protein (**B**) levels were measured at the indicated time points along the GM-CSF (Mo+GM-CSF) or M-CSF (Mo+M-CSF)-induced differentiation. For **A**, results are expressed as relative mRNA levels, which indicates the expression of each gene in MTX-treated relative to its expression in untreated cells at every time point (d, days). Mean and SEM of four independent donors are shown ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$). For **B**, results indicate the expression of each cytokine in MTX-treated relative to its expression in untreated cells at every time point. Mean and SEM of four independent donors are shown ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$).

Figure 3.- Short-term exposure to MTX in monocytes and macrophages. **A.** *CCL20* and *LIF* mRNA expression levels determined by qRT-PCR on monocytes (Mo), GM-MØ or M-MØ in the absence or the presence of 50 nM of MTX for the indicated time points. Mean and SEM of four independent donors are shown ($*p<0.05$). **B.** Key components of the folate/MTX metabolism with emphasis in the thymidylate biosynthesis pathway. **C.** The expression of the folate/ MTX metabolizing enzymes *FPGS*, *GGHS*, *DHFR*, *TYMS*, *GART*, *ATIC* and *MTHFR* was analyzed by qPCR on monocytes (Mo), GM-MØ (GM) and M-MØ (M). Mean and SEM of six independent donors are shown ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$). **D.** Immunoblot analysis of TS in lysates of HEK 293T cells transfected with pcDNA3 or TS-pcDNA3. Vinculin protein levels were determined as a loading control. **E.** Upper panel, immunoblot analysis of TS in lysates of monocytes (Mo), GM-MØ (GM) or M-MØ (M). Vinculin protein levels were determined as a loading control. Lower panel, immunofluorescence analysis of monocytes (Mo), GM-MØ and M-MØ, as determined by confocal microscopy, after using TS-specific antibody. Nuclei were counterstained with DAPI. The experiment was done in five independent donors, and a representative experiment is shown. Scale bars: 50 μ m.

Figure 4.-TS expression conditions MTX responsiveness in macrophages. *CCL20*, *LIF*, *MET* and *GDF15* mRNA expression levels determined by qRT-PCR on GM-MØ in the absence or the presence of 50 nM of MTX, PMX or ZD1694 (ZD) for 48h (**A**) or treated with MTX or PMX in the absence or the presence of thymidine (dT) for 48h (**B**). Mean and SEM of seven (A) or eight (B) independent donors are shown. **C.** Gene expression determined by qRT-PCR on GM-MØ transfected with control siRNA (-) or two different siRNA for *TYMS* (si8, si9). The values in the presence of control siRNA were given an arbitrary value of 1. **D-E.** Gene expression determined by qRT-PCR on GM-MØ transfected with control siRNA (-) or siRNA for *TYMS* (si8, si9) and exposed to MTX (**D, left**) or PMX (**E**) for 48h. Results are expressed as % induction, and the values in the presence of control

MTX responsiveness in macrophages

siRNA were given an arbitrary value of 100. Mean and SEM of eight (MTX) or five (PMX) independent donors for si8, and five (MTX) or three (PMX) independent donors for si9 are shown ($*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$). **D right**, immunoblot analysis of TS and GAPDH in GM-MØ transfected with control siRNA (scr) or siRNA for TYMS (si8) in the absence or the presence of MTX for 48h. **F.** *TYMS* mRNA expression levels determined by qRT-PCR on monocytes differentiated to GM-MØ or M-MØ in the presence of 50 nM of MTX. Mean and SEM of four independent donors are shown. Insert, immunoblot analysis of TS and GAPDH in monocytes differentiated to GM-MØ in the presence of 50 nM of MTX at the indicated time points.

Figure 5.-Expression of TS by macrophages from RA joints. **A.** Immunofluorescence analysis of normal (upper panels) and active RA (lower panels) synovial tissues, as determined by confocal microscopy using CD163-, TS-, and TNF α -specific antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. The experiment was done on six independent samples, and a representative experiment is shown. Samples were devoid of staining when incubated with isotype-matched irrelevant antibodies as negative controls. Scale bars: 100 μ m. **B.** Magnification (20X) of the areas indicated by a dotted square in active RA synovial tissues. **C.** Quantification of TS and TNF α staining in CD163 macrophages from normal and active RA synovial tissue. Background-subtracted mean intensities (in a.u.) from 150-300 macrophages/tissues were plotted, and average \pm SEM are shown (6 independent samples and 3 random fields by tissue type). Percentage of positive cells (> 25 a.u.) is indicated for each sample. Scale bars, as indicated ($***$, $p<0.001$). **D.** *CCL20*, *LIF* and *TYMS* mRNA expression levels determined by qRT-PCR on GM-MØ either untreated (-) or treated for 48h with IFN- γ , IL-4 or TNF α in the absence or in the presence of 50 nM of MTX for the indicated time points. Mean and SEM of four independent donors are shown ($*p<0.05$).

Figure 6.-Molecular basis of MTX response in GM-MØ: TP53. **A.** Top upstream regulators in long-term schedule, MTX-exposed monocytes and differentiated with GM-CSF (Mo+GM-CSF) or M-CSF (Mo+M-CSF) and short-term schedule, 48h MTX-exposed GM-MØ, determined by IPA. **B.** GSEA results for MTX-treated vs untreated GM-MØ for 48h indicating the normalized enrichment score (NES) and the false discovery rate (FDR). **C.** Gene expression determined by qRT-PCR on GM-MØ stimulated with MTX in the absence or the presence of pifitrin- α (PFT, 25-50 μ M) during 48h. **D.** Gene expression determined by qRT-PCR on GM-MØ transfected with control siRNA (-) and siRNA for TYMS and exposed to PFT (50 μ M) for 48h. Results are expressed as fold induction, which indicates the expression of each gene in siRNA TYMS-transfected relative to siRNA control cells, and untreated or treated with PFT. For C-D, mean and SEM of six independent donors are shown ($^*p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$). **E.** Proposed model of MTX induced response in GM-MØ. MTX (PMX or ZD1694) enters macrophages through SLC19A1, becomes polyglutamated (MTX-Pgl) and inhibits the enzyme TS. TS inhibition results in decreased pool of deoxythymidine leading to activation of p53 and p53 response genes (LIF, CCL20). The putative role of LIF in the induction of Treg and M-MØ polarization is also shown. **F.** Correlation between MTX responsiveness and TS expression in monocytes and macrophages.

DISCLOSURE OF CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

For Peer Review

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Julia Villarejo, Erika González, and Miguel A. Vega for technical help and Javier Menéndez, Paloma Sánchez-Mateos and Angel L. Corbí for helpful discussions.

For Peer Review

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

CM, BSP, LEC, designed research, performed research and analyzed data; AB, AD analyzed microarray data; SFA, JJ, MEMC contributed vital reagents and materials and analyzed data; APK conceived the study, designed research, analyzed data and wrote the paper. All authors had final approval of the version.

For Peer Review

Figure 1

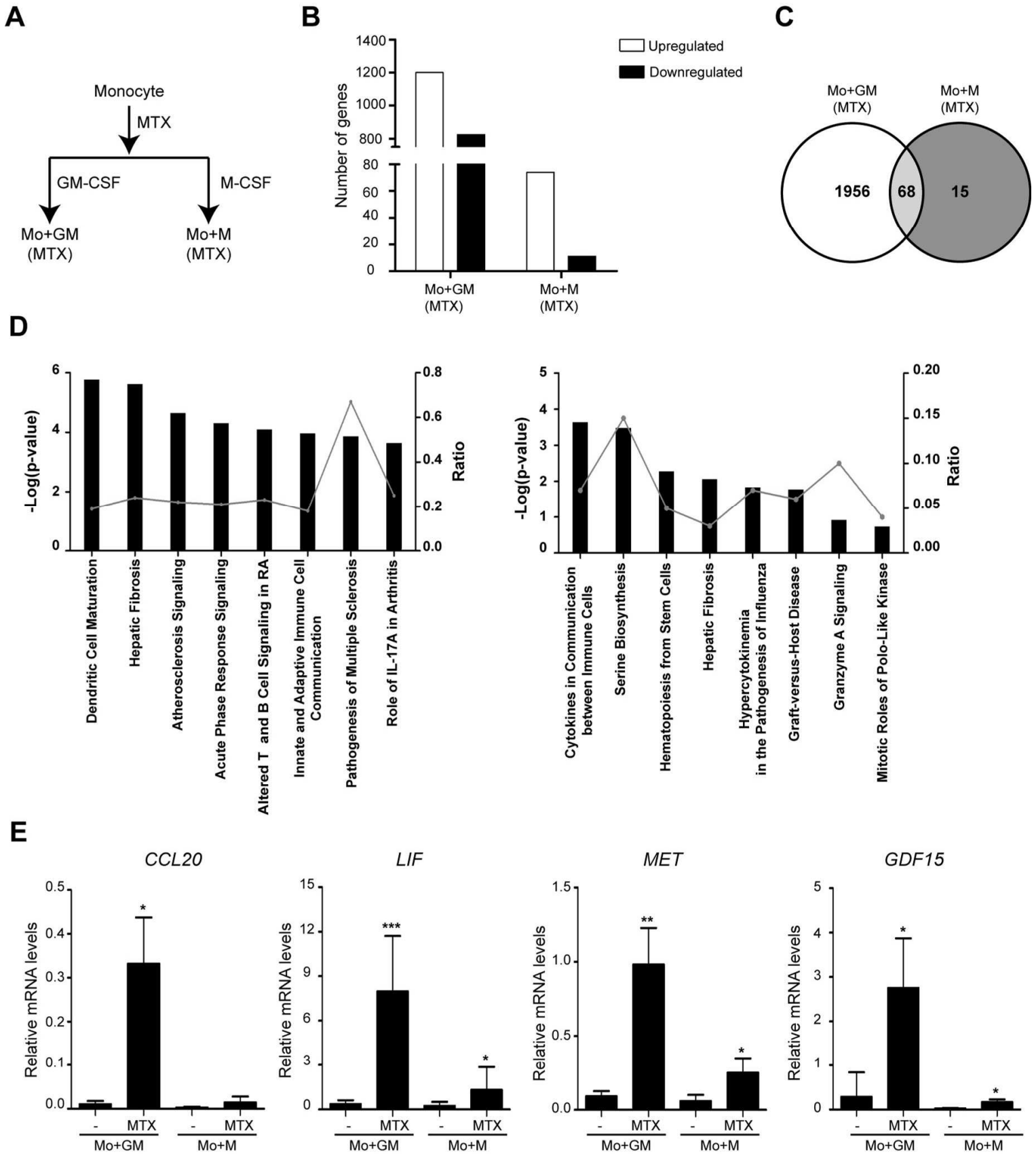


Figure 2

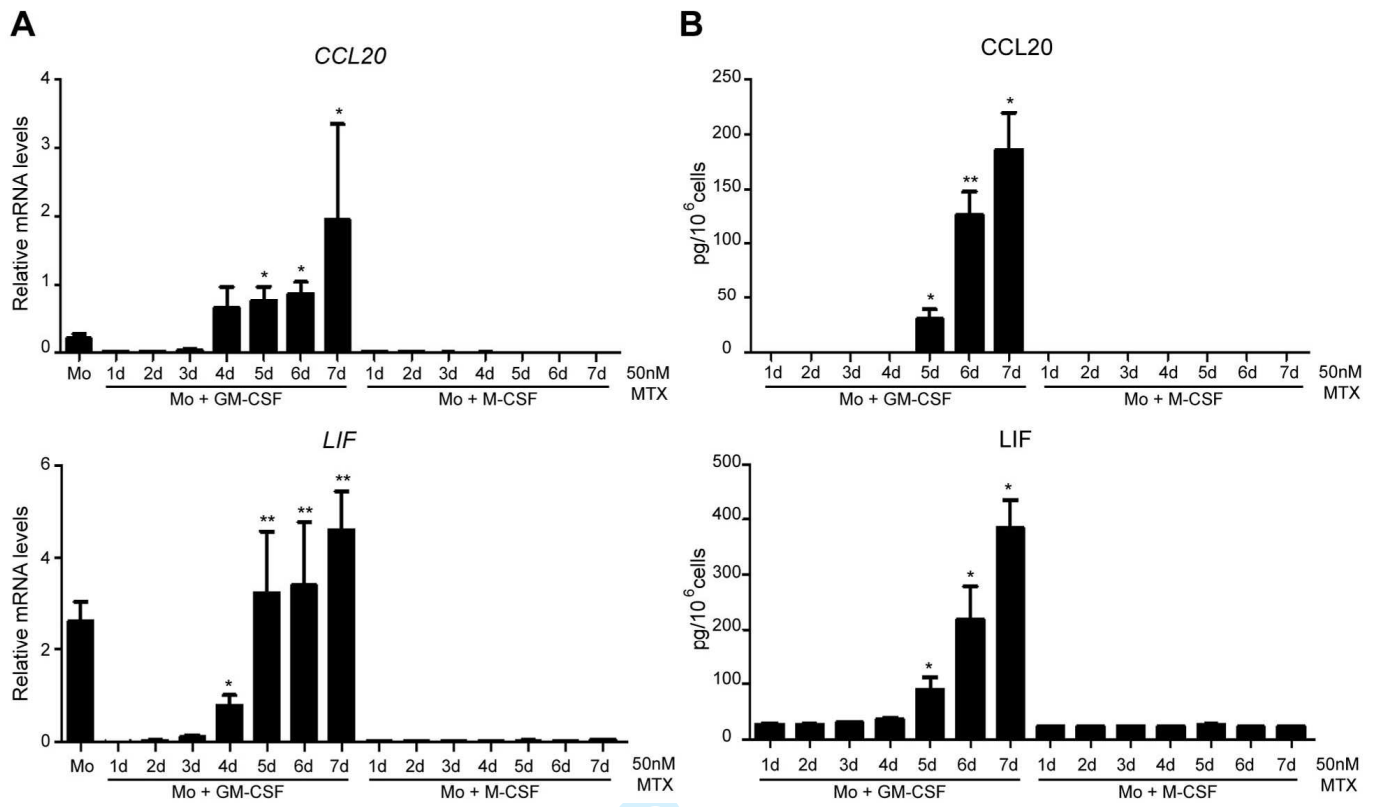


Figure 3

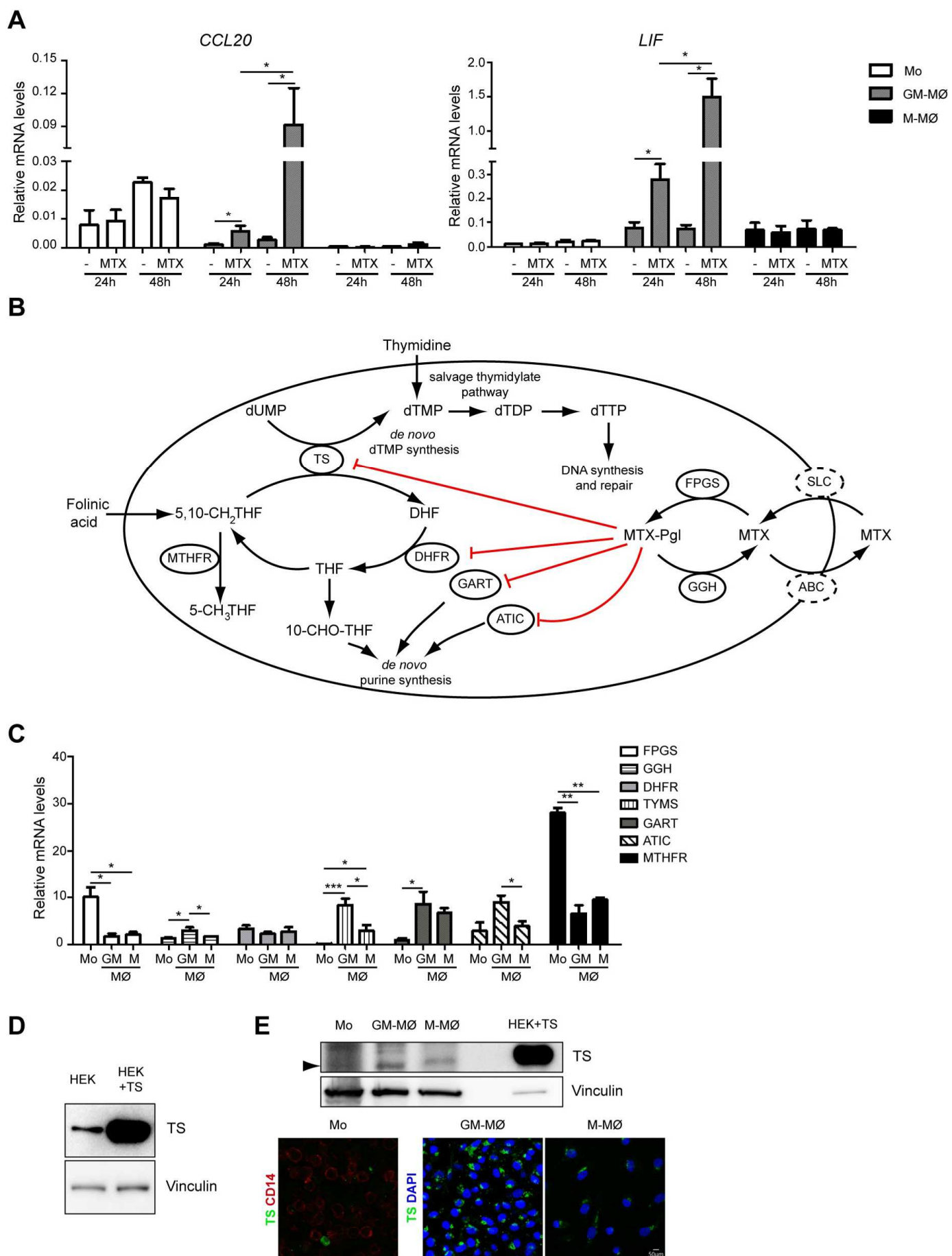


Figure 4

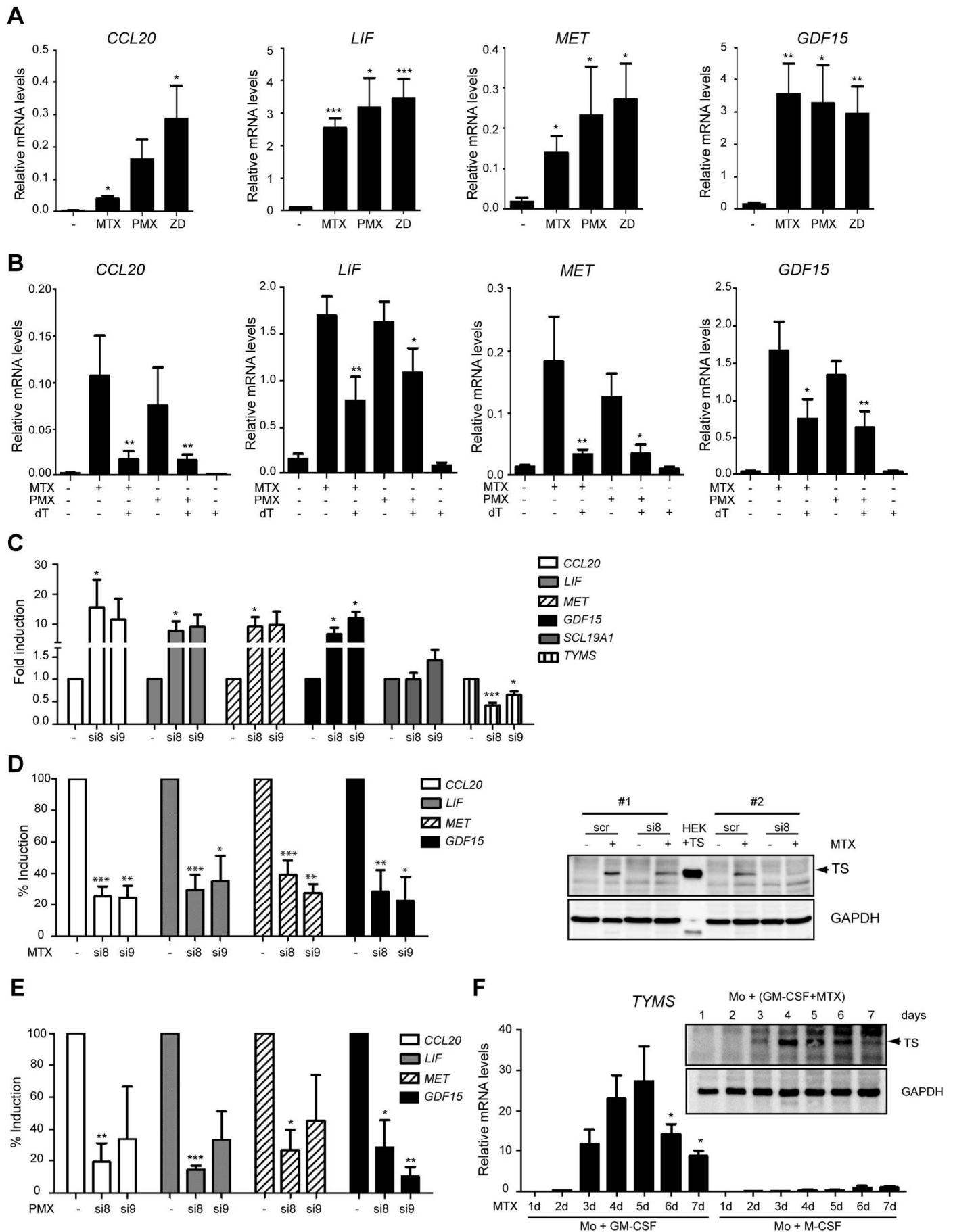


Figure 5

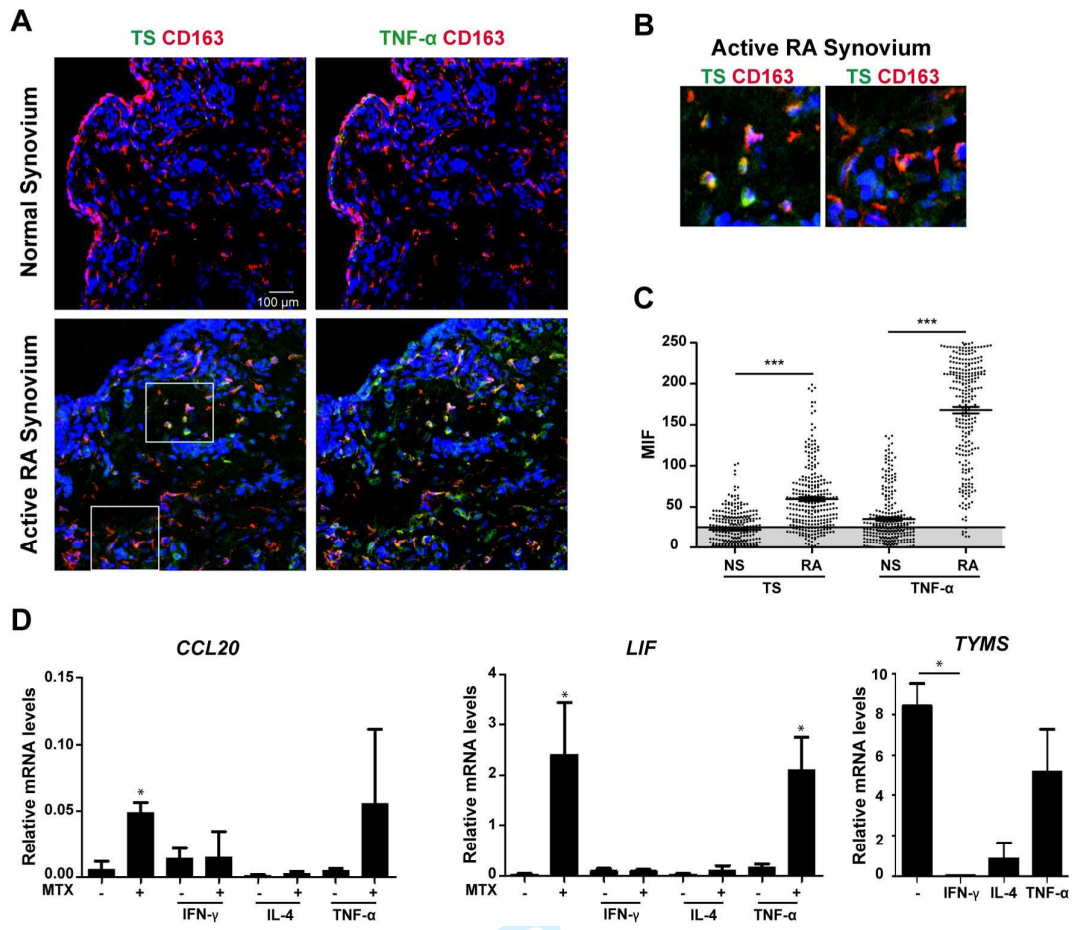
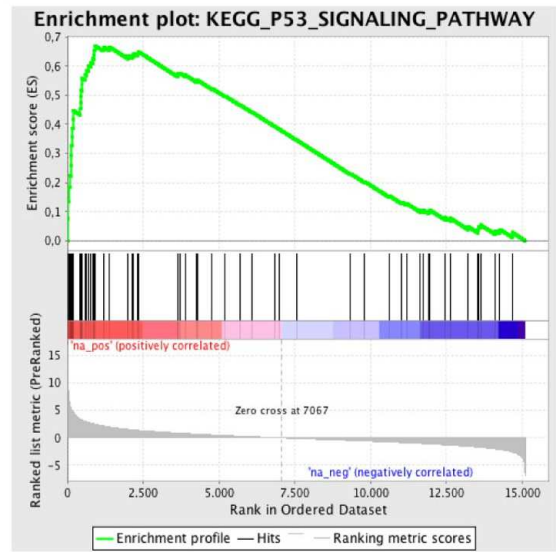


Figure 6

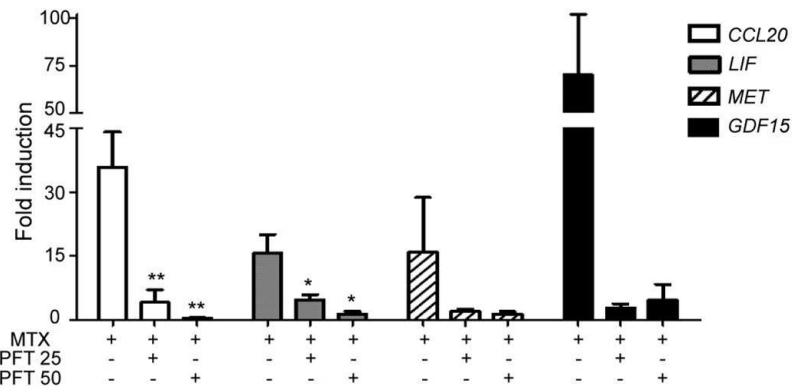
A

	Upstream regulator	p-value	Predicted activation state	Condition
7 d MTX	TP53	1,02 e-18	Activated	Mo+GM-CSF
	STAT3	1,73 e-13	-	Mo+GM-CSF
	PPARG	1,39 e-11	-	Mo+GM-CSF
	TP53	6,73 e-10	Activated	Mo+M-CSF
	MUC1	4,51 e-06	-	Mo+M-CSF
	NR3C1	8,72 e-06	Inhibited	Mo+M-CSF
48h MTX	TP53	1,48 e-12	Activated	GM-MØ
	NR3C1	3,37 e-11	Inhibited	GM-MØ
	TP63	6,83 e-11	Activated	GM-MØ

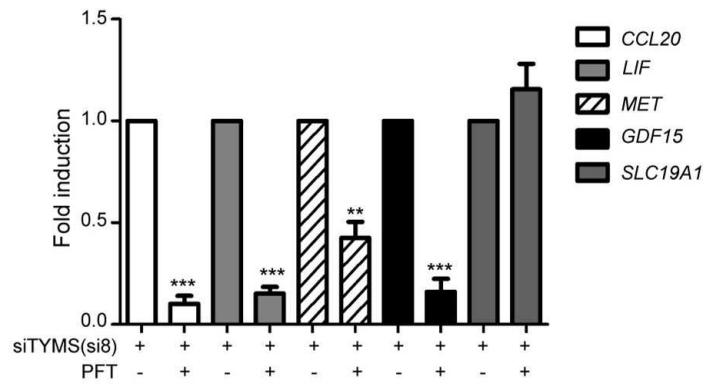
B



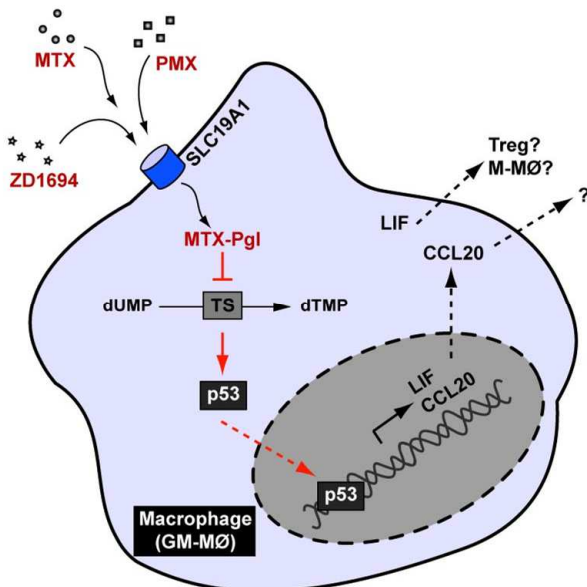
C



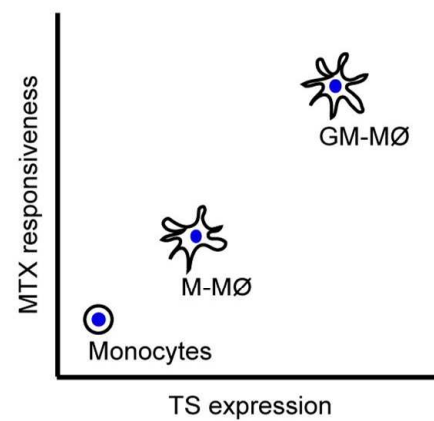
D



E



F



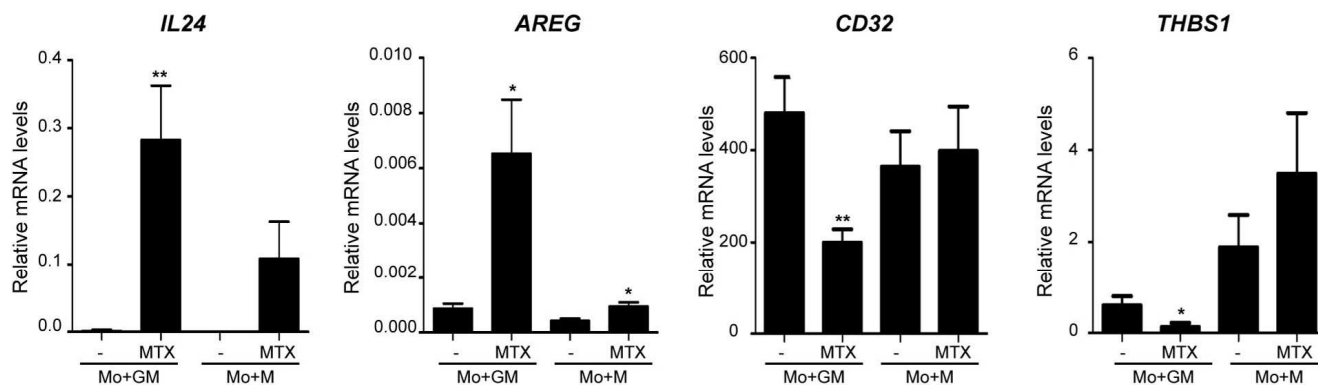
	GeneSymbol	Log ₂ FC	Adj p-value		GeneSymbol	Log ₂ FC	Adj p-value
Up-regulated genes	<i>CCL20</i>	8,6231	0,0035	Down-regulated genes	<i>AZU1</i>	-2,8427	0,0014
	<i>VGF</i>	8,1866	0,0022		<i>PDE9A</i>	-2,8440	0,0014
	<i>MMP10</i>	7,8972	0,0014		<i>HSPA6</i>	-2,9124	0,0023
	<i>IL24</i>	7,0336	0,0013		<i>TCEA3</i>	-2,9163	0,0017
	<i>RRAD</i>	6,9096	0,0015		<i>ADAMTS10</i>	-2,9228	0,0028
	<i>MMP1</i>	6,8917	0,0023		<i>RNASE3</i>	-2,9847	0,0192
	<i>EDN1</i>	6,8055	0,0021		<i>RNASE2</i>	-2,9996	0,0161
	<i>RND3</i>	6,6856	0,0026		<i>P2RY12</i>	-3,0084	0,0024
	<i>ABCB5</i>	6,5076	0,0036		<i>RNASE2</i>	-3,0111	0,0178
	<i>KRT23</i>	6,4602	0,0074		<i>ADRB1</i>	-3,0325	0,0098
	<i>NEURL3</i>	6,4368	0,0052		<i>ADSSL1</i>	-3,0925	0,0040
	<i>CCL4</i>	6,3714	0,0037		<i>NFE2</i>	-3,1872	0,0029
	<i>LIF</i>	6,2426	0,0014		<i>RNASE4</i>	-3,2023	0,0014
	<i>CAMK1G</i>	5,9884	0,0047		<i>SERPINB10</i>	-3,2225	0,0060
	<i>TNFSF15</i>	5,9670	0,0013		<i>AQP7</i>	-3,3934	0,0019
	<i>MET</i>	5,9553	0,0016		<i>TNNT3</i>	-3,4732	0,0014
	<i>CLDN14</i>	5,7570	0,0037		<i>CRH</i>	-3,5512	0,0096
	<i>ARC</i>	5,7272	0,0013		<i>LEP</i>	-3,6789	0,0257
	<i>RSAD2</i>	5,6707	0,0062		<i>AQP7P1</i>	-3,7193	0,0027
	<i>NEFM</i>	5,6161	0,0013		<i>PAGE2B</i>	-3,9029	0,0016
<i>ITGB1BP3</i>	5,4469	0,0017	<i>MTL5</i>	-4,0766	0,0051		
<i>SLC1A2</i>	5,3950	0,0014	<i>F13A1</i>	-4,1313	0,0147		
<i>TRAF1</i>	5,3738	0,0013	<i>AQP7P1</i>	-4,2525	0,0059		
<i>CCR7</i>	5,3222	0,0089	<i>WDR86</i>	-4,4012	0,0184		
<i>NEU4</i>	5,2990	0,0260	<i>ELANE</i>	-4,6321	0,0052		

Supplementary table 1.- Top 25 MTX-upregulated and down-regulated genes in monocytes differentiated with GM-CSF (Mo+GM).

	GeneSymbol	Mo + GM (MTX)		Mo + M (MTX)	
		Log ₂ FC	Adj p-value	Log ₂ FC	Adj p-value
Common MTX-modulated genes	<i>VGF</i>	8,1866	0,0022	7,6693	0,0238
	<i>IL24</i>	7,0336	0,0013	7,3538	0,0211
	<i>RRAD</i>	6,9096	0,0015	6,5155	0,0489
	<i>INHBA</i>	1,2957	0,0155	6,4291	0,0211
	<i>LCE1C</i>	3,9363	0,0070	6,4208	0,0232
	<i>AIM1L</i>	3,5381	0,0013	6,2569	0,0211
	<i>HCAR3</i>	1,8500	0,0349	5,5413	0,0364
	<i>RHCG</i>	4,6087	0,0014	5,4551	0,0232
	<i>IL8</i>	3,1873	0,0251	5,2479	0,0478
	<i>IL1A</i>	3,3824	0,0309	5,2014	0,0392
	<i>NEU4</i>	5,2990	0,0260	5,1417	0,0494
	<i>PLK2</i>	4,4700	0,0149	5,0879	0,0478
	<i>NIPAL4</i>	3,4075	0,0046	4,9316	0,0344
	<i>HES4</i>	5,2059	0,0013	4,8325	0,0211
	<i>GDF15</i>	4,3778	0,0014	4,7209	0,0485
	<i>GZMB</i>	4,8802	0,0016	4,5576	0,0449
	<i>ARC</i>	5,7272	0,0013	4,4585	0,0211
	<i>MET</i>	5,9553	0,0016	4,2814	0,0217
	<i>ULBP1</i>	4,1197	0,0030	4,2661	0,0211
	<i>CD70</i>	3,4693	0,0131	4,2201	0,0478
	<i>KRT17</i>	4,0319	0,0033	4,0514	0,0229
	<i>AREG</i>	4,8916	0,0019	4,0365	0,0489
	<i>BEX2</i>	4,4017	0,0028	3,9610	0,0238
	<i>S1PR3</i>	3,5087	0,0026	3,9560	0,0217
	<i>LAMP3</i>	5,2216	0,0013	3,7114	0,0370
<i>LIF</i>	6,2426	0,00138	3,7054	0,0259	

Supplementary table 2.- Top 25 commonly MTX-regulated genes in monocytes differentiated with GM-CSF (Mo+GM) or M-CSF (Mo+M).

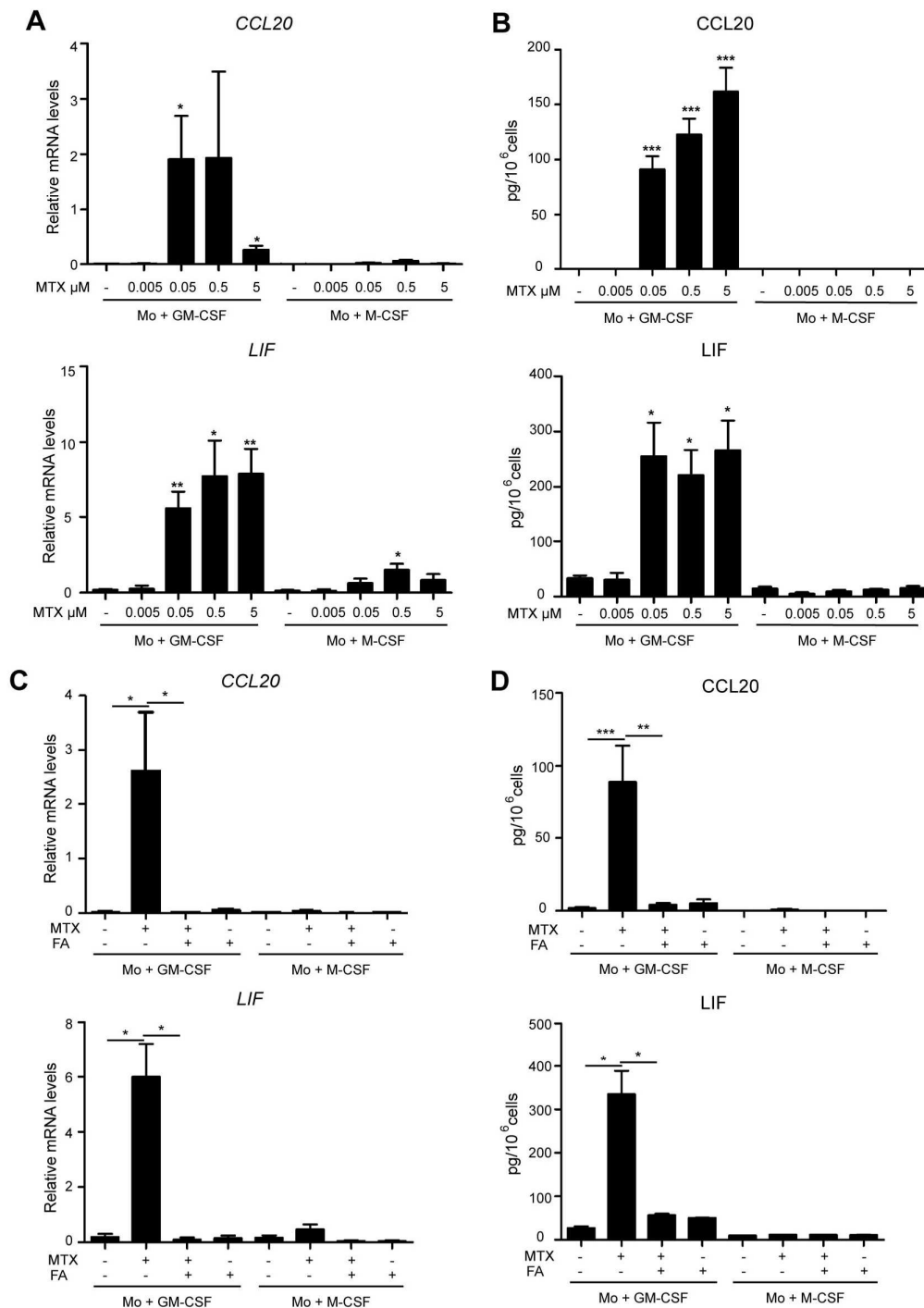
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1.- *IL24*, *AREG*, *CD32* and *THBS1* mRNA expression levels determined by qRT-PCR on monocytes differentiated with GM-CSF (Mo+GM) or M-CSF (Mo+M) in the absence or in the presence of MTX (5 μ M). Results are expressed as relative mRNA levels, which indicate the expression of each gene in MTX-treated relative to its expression in untreated cells. Mean and SEM of six independent donors are shown (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

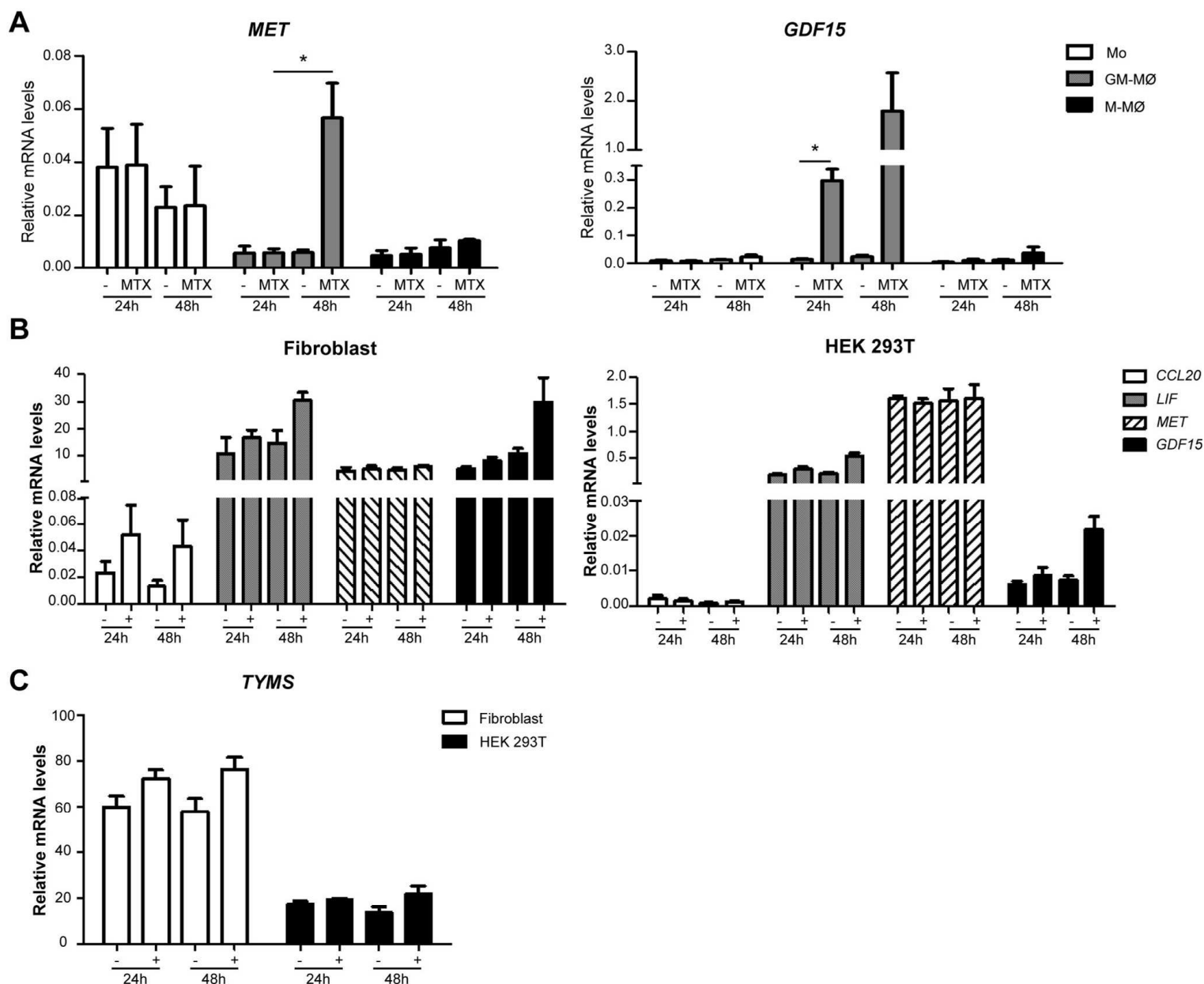
Peer Review

Supplementary Figure 2



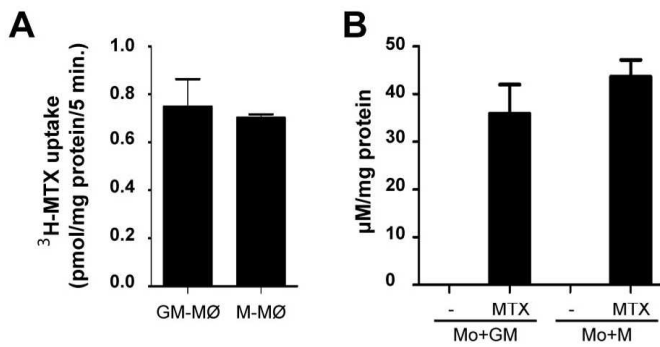
Supplementary Figure 2. MTX dose-response and folic acid competition in long-term experiments. CCL20 (upper panels) and LIF (lower panels) expression levels determined by qRT-PCR (A) or ELISA (B) on monocytes differentiated in the presence of the indicated doses of MTX. MTX was added once on monocytes and mRNA (A) or protein (B) levels were measured at day 7 of the GM-CSF or M-CSF-induced differentiation. CCL20 (upper panels) and LIF (lower panels) expression levels determined by qRT-PCR (C) or ELISA (D) on monocytes differentiated in the presence of MTX (50 nM) and folic acid (FA, 100 μ M). MTX and FA were added once on monocytes and mRNA (C) or protein (D) levels were measured at day 7 of the GM-CSF or M-CSF-induced differentiation. For A,C results are expressed as relative mRNA levels, which indicates the expression of each gene in MTX-treated relative to its expression in untreated cells in every point. Mean and SEM of five (A) or three (C) independent donors are shown (* p <0.05, ** p <0.01). For B, D results indicate the expression of each cytokine in MTX-treated relative to its expression in untreated cells at every point. Mean and SEM of five (B) or three (D) independent donors are shown (* p <0.05, ** p <0.01).

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3.- Effect of MTX on myeloid cells, fibroblast and HEK 293T cells.- **A.** *MET* (left panel) and *GDF15* (right panel) mRNA expression levels determined by qRT-PCR on monocytes (Mo), GM-MØ or M-MØ in the absence or in the presence of 50 nM of MTX for the indicated time points. Mean and SEM of four independent donors are shown ($*p < 0.05$). **B.** *CCL20*, *LIF*, *MET* and *GDF15* mRNA expression levels determined by qRT-PCR on fibroblast (upper panel) and HEK 293T cells (lower panel) in the absence or in the presence of 50 nM of MTX for the indicated time points. Mean and SEM of four independent experiments are shown ($*p < 0.05$). **C.** *TYMS* mRNA expression levels determined by qRT-PCR on fibroblast and HEK 293T cells in the absence or in the presence of 50 nM of MTX for the indicated time points. Mean and SEM of four independent experiments are shown ($*p < 0.05$).

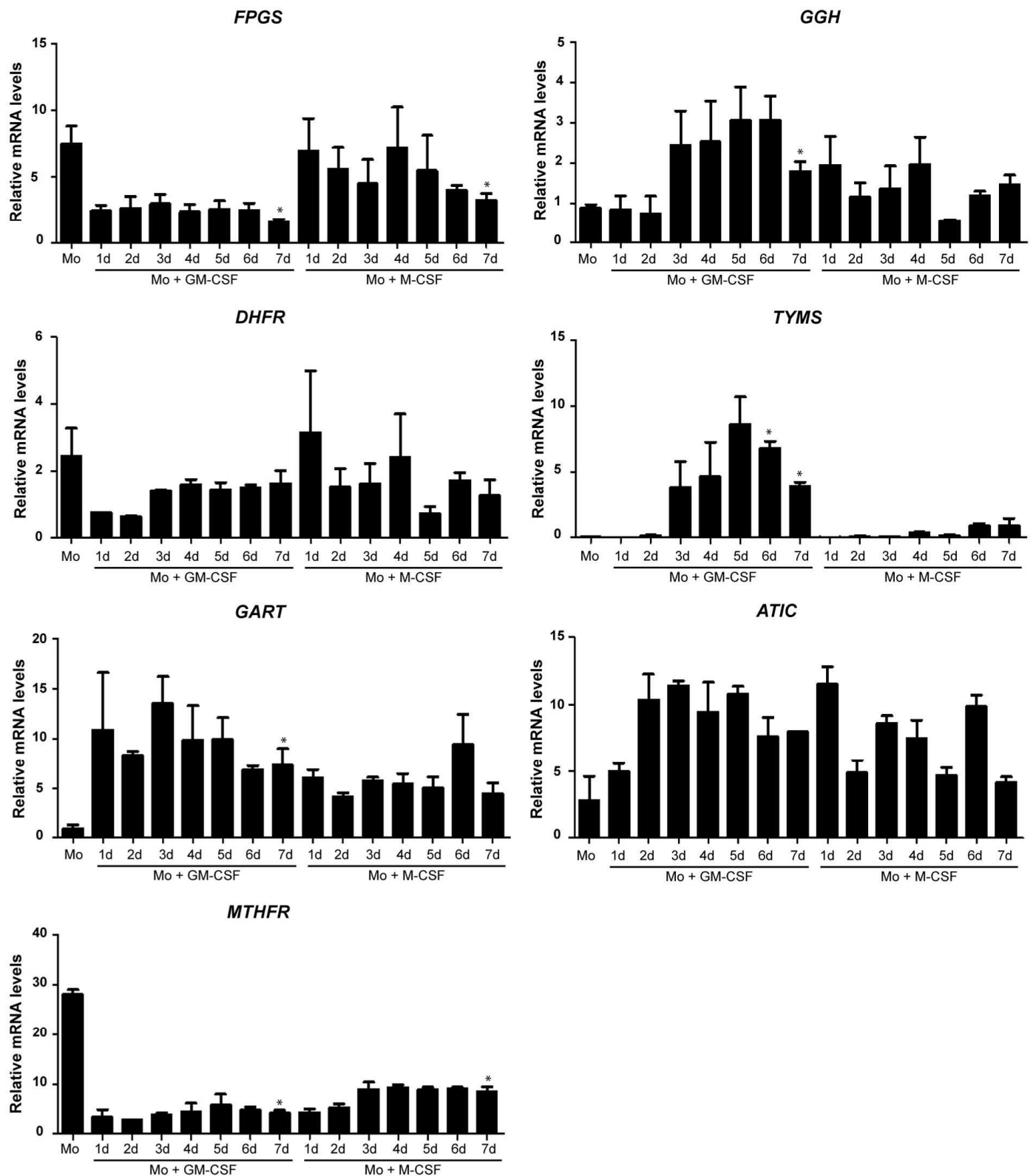
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4.- Uptake and intracellular concentration of MTX in GM-MØ and M-MØ. **A.** [³H]-MTX (50 nM) uptake was assessed at pH 7.4 for the indicated time in GM-MØ and M-MØ. **B.** Intracellular MTX was detected by HPLC in GM-MØ and M-MØ exposed to 50nM of MTX during 48h.

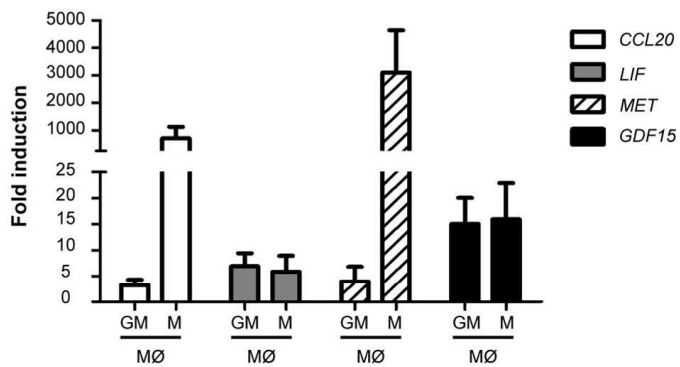
Peer Review

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5.- Expression of folate/MTX metabolizing enzymes during macrophage differentiation. *FPGS*, *GGH*, *DHFR*, *TYMS*, *GART*, *ATIC* and *MTHFR* mRNA expression levels determined by qRT-PCR on monocytes differentiated to GM-MØ or M-MØ at the indicated time points along GM-CSF (Mo+GM-CSF) or M-CSF (Mo+M-CSF)-induced differentiation. Mean and SEM of four independent donors are shown (* $p < 0.05$).

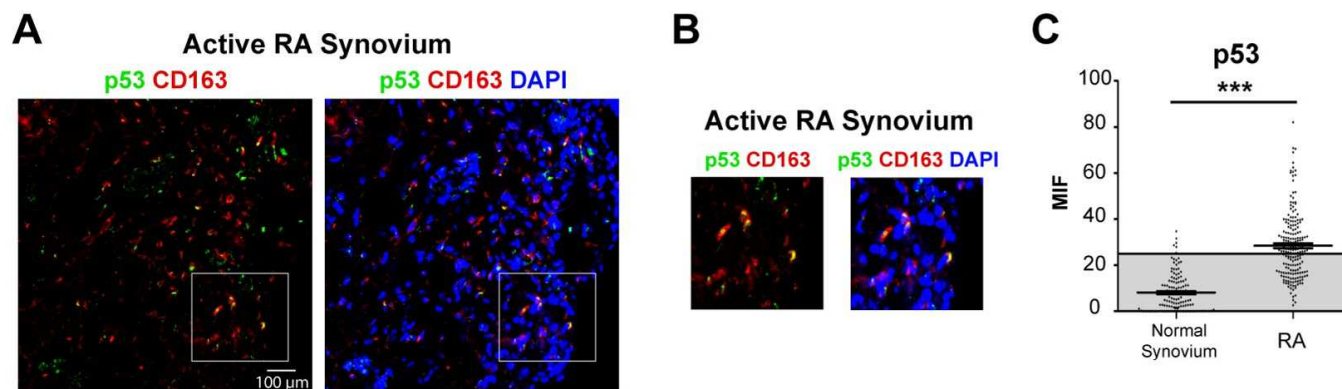
Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. Nutlin-3 induces p53-dependent gene expression in GM-MØ and M-MØ. CCL20, LIF, MET and GDF15 mRNA expression levels determined by qRT-PCR on GM-MØ and M-MØ treated for 48h with 10 µM of nutlin-3. Mean and SEM of six independent donors are shown.

Peer Review

Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 7.- Expression of p53 by macrophages from RA joints. **A.** Immunofluorescence analysis of active RA synovial tissue, as determined by confocal microscopy using CD163-, and p53-specific antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. The experiment was done on three independent samples from each type, and a representative experiment is shown. Scale bars: 100 μ m. **B.** Magnification (20X) of the areas indicated by a dotted square in **A.** **C.** Quantification of p53 staining in CD163 macrophages from normal (normal synovium) and active RA synovial tissue (RA). Background-subtracted mean intensities (in a.u.) from 150-300 macrophages/tissues were plotted, and average \pm SEM are shown (3 independent samples and 3 random fields by tissue type). Percentage of positive cells (> 25 a.u.) is indicated for each sample. Scale bars, as indicated (***, $p < 0.001$).

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

MTX uptake.- [$3',5',7\text{-}^3\text{H(N)}$]MTX (25 Ci/mmol, Moraveck Biochemicals) was used at 50 nM. Uptake experiments were performed in Krebs buffer (123 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 0.85 mM CaCl_2 , 5 mM D-glucose, 10 mM HEPES, and 10 mM MES, adjusted to pH 5.5 or pH 7.4 with NaOH). Macrophages (3×10^5) were rinsed twice with Krebs buffer at 37°C, after which uptake was initiated by adding 300 μl uptake medium containing ^3H -MTX for 5 min at 37°C. Cells were washed with ice-cold Krebs buffer at pH 7.4, solubilized with 1% SDS 0.2N NaOH and used for determination of radioactivity by liquid scintillation spectrometry. Protein concentrations of the lysates were determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad).

MTX quantitation.- MTX was detected and quantified using a 7200 Infinity ultra-high performance liquid chromatograph coupled to a 6490 triple quadrupole mass spectrometer provided with an iFunnel electrospray ionization source (UHPLC-ESI-QqQ-MS) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) and a Acquity UPLC HSS T3 column (2.1 x 100 mm, 1.8 μm) (Waters Corporation, Mildford, USA). UHPLC conditions were as follow: mobile phase A: 50 mM ammonium acetate + 0.2% formic acid in water and B: acetonitrile. Gradient (in minutes/%B): 0/0%; 1.5/15%; 5/30%; 7/55%; 10/65%; 11/100%; 13/100%; 14/0%; 16/0%. Flow at 0.2 mL/min. Injection volume, 2 μL .

Gene name	GeneBank ID	Oligonucleotide sequences sense	Oligonucleotide sequences antisense
CCL20	NM_004591	gctgctttgatgtcagtgct	gcagtcaaagttgcttgctg
LIF	NM_002309	tgccaatgccctctttattc	gtccaggttggtgggaac
IL24	NM_001185156	cccagaaactgtgggaagc	gggcactcgtgatgttatcc
MET	NM_000245	aaatgtgcatgaagcaggaa	tctctgaattagagcagatgtga
GDF15	NM_004864	ccggatactcacgccaga	agagatacgcaggtgcaggt
AREG	NM_001657	tgatcctcacagctgttct	tccattctctgtcgaagtttct
TYMS	NM_001071	cccagtttatggcttccagt	gcagttggccaactccctgt
MTHFR	NM_005957	ccgggttaattaccacctg	attcggctgcagttcagg
GGH	NM_003878	aggctggatcttacagagaaagac	ctgagcgtctgaggtcaaca
FPGS	NM_004957	ccctgccagtttgactatgc	ctgtgaagttctgttggtctgc
DHFR	NM_000791	tcccagaacatgggcatc	tggtcattctctggaatatctga
GART	NM_000819	tccctgagaaacttggggta	gctgcaaccatgagaagacc
ATIC	NM_004044	gagggactgcaaaagctctc	ggaaatcccgtcaactcaga
SLC19A1	NM_194255	cagttcctcgtgccatc	ggcaaagaacgtgttgacc
TBP	NM_003194	cggctgttaacttcgcttc	cacacgccaagaaacagtga
CD32	NM_004001	cggctgttaacttcgcttc	cacacgccaagaaacagtga
THBS1	NM_003246	caatgccacagttcctgatg	tggagaccagccatcgtc

Supplementary Table 3.- Oligonucleotide sequence used to quantify mRNA transcripts by qRT-PCR