

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Relevancia fisiopatológica de la reprogramación de
macrófagos por antifolatos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sara Fuentelsaz Romero

Directora

Amaya Puig Kröger

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

RELEVANCIA FISIOPATOLÓGICA DE LA REPROGRAMACIÓN DE MACRÓFAGOS
POR ANTIFOLATOS

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Sara Fuentelsaz Romero

DIRECTORA

Amaya Puig Kröger



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DOCTORADO EN BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

RELEVANCIA FISIOPATOLÓGICA
DE LA REPROGRAMACIÓN DE MACRÓFAGOS
POR ANTIFOLATOS

TESIS DOCTORAL

Sara Fuentelsaz Romero

DIRECTORA

Amaya Puig Kröger

2021

*on days i could not move
it was women
who came to water my feet
until i was strong enough
to stand
it was women
who nourished me
back to life*

- *sisters*

Home body

En la mayor parte de la historia
anónimo fue una mujer

por ellas

*porque fueron, somos
porque somos, serán*

A G R A D E C I M I E N T O S

Hold each other in vulnerability.

*Strength is not hardening,
softening is.*

Gracias a todos los que me habéis inspirado, guiado, querido y aguantado este viaje.
Si quieres algo, ve a por ello.
Y punto.
(sí, aunque tengas muchos puntos)

A Cutuli,
por meterme la idea de ser doctora en la cabeza.
(*not bad*, pero casi te mato)

A Mer,
por creer en mí como persona y como científica.

Y a mis chicas del Germán/*lab*,
Marta, Ana, Noe y Marina,
siempre se nos dio bien hacer comando.

A Amaya, mi directora,
por abrirme las puertas de tu investigación, darme la oportunidad de crecer
y no matarme por tanto gerundio.

A Paloma,
por hacerme un hueco en su laboratorio y llenarnos las comidas de conocimiento.

A Julia,
por acabar queriéndome.

A todas las que me acompañaron al principio y formaron parte del *Palomar*.
Raquel, gracias por tu ayuda para ubicarme.
Y en especial, a las que pasaron y dejaron su hueco,
Elena, Estefanía, Carol y Alex.

A Bárbara,
por descubrirme el maravilloso mundo de la citometría,
su enorme ayuda y apoyo.

A Blanca,
por brindarme su ayuda siempre.

A José Ramón,
por las largas tardes de confocal, debates científicos y tacos.

A Clara,
por tu apoyo y tu ayuda incondicional.
Amiga, sin duda, un tercio de esta tesis es tuya.

A toda la gente del experimental.
A Paco, por cuidar de mis ratones.
A Marta, la mejor *leader* del hospital.
A Jorge, por su indispensable apoyo con el citómetro.
A JM^a, por resolverme todas mis cuestiones estadísticas.
A Marian y Alberto, María y Carla, Laura, David, Bea y resto de hepatos.

A Miguel y a Rafa,
dos piezas claves de mi trayecto hasta aquí.

Rafa, mi yogui.
Gracias por creer en mí.

Miguel, el *mountain climber*.
Infinitas gracias por no dejar de enseñarme a escalar
y por tu ayuda incondicional.

A las madres de macrófagos,
Alba, Celia y Elena.

Alba, la *hacker*,
la tecnología contigo es mucho más fácil.

Celia, la descubridora de CD14,
un placer compartir contigo *papers* y
conciertos de la *queen* Boza.

A mi *squad*, Helen y Carol.
Mis reinas del norte y del sur en Madrid.
Mi casa en mitad de tanta pipeta.
Y mi sostén *everyday*.
Gracias por tanto.

A los del Corbilab,
por toda la aportación de conocimiento y ayuda desde el principio.
En especial a Concha, por evaluar mi trabajo.

A María Eugenia y Paula, del IDIPaz;
A Isidoro y Ana, del HULP;
por hacer posible los resultados más importantes y traslacionales de este trabajo.

A los miembros del tribunal,
Paloma, Isabel, José Luis, Ángel y Cristina.
Gracias por querer formar parte del final de este trayecto.
Espero que disfrutéis.

Y como no, a mi equipo,
por aguantarme pretésica.

Moni,
la mejor técnico que te puede acompañar.
Gracias por tu predisposición, ayuda y cariño.
La ciencia contigo es mucho más fácil.

Balti,
espero haberte allanado el terreno.
Mucho ánimo y fuerza para el camino que te queda por recorrer.

Israel,
eres un genio.
No puedo agradecerte todo lo que me has ayudado.

Rodolfo busca nombre,
Me tenéis aquí siempre.
Ya os echo de menos.

A mis hermanos,
por ser mi hogar,
Sin vosotros no habría llegado hasta aquí.

Charli,
por acompañarme un capítulo más de mi vida.
Esta tesis va por ti.

Lucía,
por ser mi luz,
ponerme los pies sobre la tierra
y la cabeza en el corazón.

A Oma,
nunca podré agradecer tu presencia lo suficiente.

A Karras, a Batman y a Thor,
por adoptarme siempre que lo he necesitado.

A mi amigo Luis y a mis Bichis,
por su apoyo.

Paloma,
la mejor ilustradora de dibujos,
no podría cerrar mi tesis mejor.

Carmen,
la mejor compañera de cafés desde mi inicio como científica.

Ruth,
mi partner in crime,
mi talismán de *papers*
y mi fondo de pantalla durante todo este viaje.
Gracias por tu verdad.
Es una suerte tenerte.

A Lucía, Bárbara y Alejandra, por resonarme muy dentro.
A Karina y Rebeca, *thanks darlings for my journey home*.
A Chini, Amara y el amor de su gente.

A mis entrenadores,
Ángel, Miguel, Sergio, Juanan y Sara,
y a los que han compartido tanto *thruster, snatch, deadlift* y *burpees* conmigo,
me habéis hecho más fuerte.

En especial a ti, leona,
gracias por no dejar de enseñarme.
Te llevo conmigo.

A Tony,
por no dejar de inspirarme.
Eres un ejemplo de esfuerzo constante.

A Santi y a Pirri,
por quererme y por creer en mí.

A la MariCarmen y a Juangra,
y a Blanca, Paola y León,
por su amor.

A Cristóbal,
por regalarme *Illustrator, Photoshop, GraphPad*, paseos, perros y girasoles.
Todos ellos básicos en mi existencia predoctoral.

A James,
mi norte en el sur.
Gracias por ver mi luz en mitad de la noche
y por quedarte retenido en aduanas.
Cúidate mucho, el mundo te necesita,
you know.

A mi tío Paco,
por ser un referente de fortaleza, constancia y amor.

A mi tía Montse,
por visualizarme en bata.

A mi tío Óscar,
the show must go on y me tienes aquí.

A mis abuelas,
por su fuerza y ternura.

A mis padres,
por dármeLO TODO.
No dejéis de crecer nunca.

Papá,
tú también eres capaz.

Mamá,
eres una guerrera.
Esta tesis va por ti.

A mi abuelo Paco,
somewhere over the rainbow.

A Anabel y a Xesca,
que me han cuidado y guiado al final de este camino,
Gracias por recordarme.

En especial a ti, Xes,
por no dejar de acompañarme.
Si he llegado hasta aquí es gracias a ti.

A Virginia Woolf y a Rupi Kaur,
por luchar por las que no tienen voz
y por ese maravilloso prólogo.

Pero sobretodo,
esta tesis va por mi.

*some day we will find
what we are looking for
or maybe not,
maybe we'll find something
much greater than that*

Y en cuanto a ti, lector,
gracias por dedicar un momento de tu vida a mi trabajo.
Esta no será, muy probablemente, la mejor tesis que leas,
tampoco será la mejor defensa a la que quizás asistas,
ni yo seré la chica de 28 años que más sabe de macrófagos, antifolatos o artritis.
Pero te aseguro que esta tesis soy yo contra todo pronóstico.
No se me ocurría un plan mejor de verano 2021 que ponerme a leer *papers* en vez de novelas
y pasarme el día pegada a mi *Mac* escribiendo una tesis y haciendo dibujitos.
Así que, espero que, de alguna forma, este trabajo te aporte, ayude o facilite
o, que al menos,
se cuele en algún sitio de tu mente y haga que quieras saber más.

Í N D I C E

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| Abreviaturas | 9 |
| Resumen | 19 |
| Abstract | 23 |
| Introducción | 27 |
| 1. Macrófagos | 29 |
| 1.1. Ontogenia del macrófago | 29 |
| 1.2. Características de los macrófagos | 30 |
| 1.3. Macrófagos residentes en tejido | 31 |
| 1.4. Macrófagos en inflamación | 32 |
| 1.5. Estados de activación de macrófagos | 33 |
| 2. Memoria inmune innata | 40 |
| 2.1. Sistema inmunitario innato y adaptativo | 40 |
| 2.2. Memoria del sistema inmunitario innato | 40 |
| 2.3. Reprogramación epigenética | 43 |
| 2.4. Reprogramación metabólica | 44 |
| 2.5. Tolerancia a endotoxina | 45 |
| 2.6. Señalización por TLR4: implicación en tolerancia a endotoxina | 46 |
| 2.7. Tolerancia cruzada a LPS | 48 |
| 3. Metabolismo de un carbono y ácido fólico | 49 |
| 3.1. Transporte de folatos y retención intracelular: poliglutamilación | 51 |
| 3.2. Metabolismo de folato | 52 |
| 4. Antifolatos: metotrexato y pemetrexed | 53 |
| 4.1. Antifolatos | 53 |
| 4.2. Metotrexato | 54 |
| 4.2.1. Origen e historia del MTX | 54 |
| 4.2.2. Indicaciones terapéuticas del MTX | 55 |
| 4.2.3. Farmacología y farmacocinética del MTX en artritis reumatoide | 57 |
| 4.2.4. Metabolismo celular del MTX | 58 |
| 4.2.5. Mecanismo de acción del MTX en artritis reumatoide | 59 |
| 4.2.6. Mecanismo de acción de MTX en macrófagos | 62 |
| 4.3. Pemetrexed | 63 |
| 4.3.1. Origen e historia del PMX | 63 |
| 4.3.2. Indicaciones terapéuticas del PMX | 64 |
| 4.3.3. Metabolismo celular y mecanismo de acción del PMX | 64 |
| 4.4. Comparación entre los antifolatos MTX y PMX | 65 |
| 5. Artritis | 67 |
| 5.1. Artritis indiferenciada | 67 |
| 5.1.1. Presentación clínica y características generales de la artritis indiferenciada | 67 |
| 5.1.2. Diagnóstico y tratamiento de la artritis indiferenciada | 68 |
| 5.2. Artritis reumatoide | 69 |
| 5.2.1. Etiología, patofisiología y desarrollo de la artritis reumatoide | 70 |
| 5.2.2. Membrana sinovial de articulación sana y de pacientes con artritis reumatoide | 72 |
| 5.2.3. Macrófagos en artritis reumatoide | 73 |
| 5.2.4. Manifestación extraarticular y comorbilidad de la artritis reumatoide | 76 |

| | |
|--|------------|
| 5.2.5. Diagnóstico de la artritis reumatoide | 76 |
| 5.2.6. Tratamiento de la artritis reumatoide | 77 |
| 5.2.7. Remisión clínica de la artritis reumatoide y criterios de mejoría | 79 |
| 5.3. Artritis psoriásica | 79 |
| 5.3.1. Membrana sinovial de pacientes con artritis psoriásica | 79 |
| 5.3.2. Etiología y patofisiología de la artritis psoriásica | 80 |
| 5.3.3. Macrófagos en artritis psoriásica | 80 |
| 5.3.4. Diagnóstico de la artritis psoriásica | 80 |
| 5.3.5. Tratamiento de la artritis psoriásica | 81 |
| Objetivos | 85 |
| Materiales y métodos | 89 |
| 1. Características de las cohortes de pacientes y del Ensayo Clínico METOMAC | 91 |
| 2. Generación y cultivo de macrófagos | 94 |
| 3. Análisis de la expresión génica | 95 |
| 4. SDS-PAGE y Western Blot | 97 |
| 5. Cuantificación de citoquinas y CD14 soluble | 98 |
| 6. Estudio histológico | 98 |
| 7. Citometría de flujo | 101 |
| 8. Diseño de gráficos y esquemas y análisis estadísticos | 101 |
| Resultados | 103 |
| Capítulo I: Estudio de la acción tolerogénica de metotrexato sobre macrófagos como mecanismo de acción en enfermedades mediadas por mecanismos inmunes | 105 |
| Capítulo II: Estudio de la capacidad del pemetrexed para inducir un estado de tolerancia a LPS en macrófagos | 115 |
| Capítulo III: Expresión de GM-CSF y polarización de macrófagos en artritis indiferenciada persistente y en evolución | 139 |
| Discusión | 155 |
| Conclusiones | 182 |
| Bibliografía | 185 |
| Anexos | 207 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1. Ontogenia del macrófago | 29 |
| Figura 2. Macrófagos residentes en tejidos, funciones en homeostasis e implicaciones patológicas | 32 |
| Figura 3. Esquema del modelo <i>colour wheel</i> | 34 |
| Figura 4. Expresión celular de las citoquinas IL-34, M-CSF y GM-CSF junto con sus receptores específicos M-CSFR o CSF-1R (CD115) y GM-CSFR o CSF-2R (CD116) | 37 |
| Figura 5. Representación esquemática de la polarización de macrófagos <i>in vitro</i> con las citoquinas GM-CSF y M-CSF | 38 |
| Figura 6. Componentes de la inmunidad innata e inmunidad adaptativa | 40 |
| Figura 7. Representación esquemática del comportamiento de las células del sistema inmunitario innato durante los diferentes programas de la memoria inmune innata: <i>trained immunity o tolerancia</i> | 42 |
| Figura 8. Representación esquemática de la señalización por TLR4 | 47 |
| Figura 9. Representación esquemática de la <i>tolerancia cruzada</i> inducida por MTX en GM-MØ <i>in vitro</i> | 49 |
| Figura 10. Metabolismo de un carbono | 50 |
| Figura 11. Estructura química del ácido fólico y folatos | 50 |
| Figura 12. Metabolismo del folato simplificado | 53 |
| Figura 13. Antifolatos poliglutamilados y no poliglutamilados | 54 |
| Figura 14. Estructura química del ácido fólico y metotrexato | 55 |
| Figura 15. Recomendaciones EULAR para el manejo de la artritis reumatoide | 56 |
| Figura 16. Farmacocinética de MTX en pacientes con artritis reumatoide | 57 |
| Figura 17. Metabolismo celular del MTX simplificado | 58 |
| Figura 18. MTX induce la liberación de adenosina extracelular | 60 |
| Figura 19. Mecanismo de acción del MTX en linfocitos T en artritis reumatoide | 61 |
| Figura 20. Mecanismo de acción de MTX en GM-MØ <i>in vitro</i> | 62 |
| Figura 21. Estructura y características químicas de la molécula de PMX y de su fórmula comercial, pemetrexed disódico | 63 |
| Figura 22. Indicaciones terapéuticas del PMX aprobadas por la EMA | 64 |
| Figura 23. Metabolismo celular del PMX simplificado | 65 |
| Figura 24. Comparación entre los antifolatos metotrexato y pemetrexed | 66 |
| Figura 25. Recomendaciones EULAR para el manejo de artritis de reciente comienzo | 69 |

| | |
|---|------------|
| Figura 26. Factores implicados en el inicio y progresión de la artritis reumatoide | 71 |
| Figura 27. Representación esquemática de una articulación sana y una articulación de artritis reumatoide con sinovitis | 73 |
| Figura 28. Esquema representativo de la implicación de macrófagos en la patogénesis de la artritis reumatoide | 74 |
| Figura 29. Representación esquemática de la polarización de macrófagos en artritis reumatoide | 76 |
| Figura 30. Criterios EULAR 2010 para el diagnóstico de la artritis reumatoide | 77 |
| Figura 31. Fórmula y valores DAS28 para valorar el grado de actividad de la enfermedad | 77 |
| Figura 32. Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad para el tratamiento de la artritis reumatoide | 78 |
| Figura 33. Criterios CASPAR para el diagnóstico de artritis psoriásica | 81 |
| Figura 34. Criterios GRAPPA para el diagnóstico de la afectación axial en artritis psoriásica | 81 |
| Figura 35. Recomendaciones EULAR para el manejo de artritis psoriásica | 82 |
| Figura 36. Esquema representativo del procedimiento de obtención de CD14 ⁺ purificados a partir de concentrado leucocitario | 94 |
| Figura 37. Cuantificación de la expresión de proteínas mediante microscopía confocal | 100 |
| Figura 38. Estrategia de gateo de la población de macrófagos viable para el análisis de citometría de flujo | 101 |
| Figura 39. Diseño experimental del Ensayo Clínico METOMAC y farmacocinética de MTX | 107 |
| Figura 40. MTX <i>in vivo</i> disminuye la producción de citoquinas en respuesta a LPS en plasma | 109 |
| Figura 41. MTX <i>in vivo</i> disminuye la producción de TNF- α en respuesta a LPS en monocitos | 110 |
| Figura 42. MTX <i>in vivo</i> promueve la adquisición de un perfil transcripcional menos proinflamatorio y más profibrótico en monocitos | 111 |
| Figura 43. MTX <i>in vivo</i> no modifica la producción de citoquinas en respuesta a LPS en GM-M \emptyset | 113 |
| Figura 44. PMX induce un perfil génico proinflamatorio en GM-M \emptyset | 117 |
| Figura 45. MTX y PMX promueven la adquisición de un perfil génico proinflamatorio en GM-M \emptyset | 119 |
| Figura 46. PMX promueve un estado de tolerancia transcripcional a LPS en GM-M \emptyset | 121 |
| Figura 47. El estado de tolerancia transcripcional inducido por PMX en GM-M \emptyset es dependiente de p53 | 122 |
| Figura 48. PMX disminuye la producción de citoquinas inflamatorias en respuesta a LPS en GM-M \emptyset | 123 |
| Figura 49. El PMX disminuye la señalización por TLR4 en respuesta a LPS en GM-M \emptyset | 125 |

| | |
|---|------------|
| Figura 50. PMX regula la expresión del <i>mRNA</i> de <i>TNFAIP3</i> y TLR4 | 126 |
| Figura 51. PMX regula la expresión de CD14 en GM-MØ | 127 |
| Figura 52. La regulación de la expresión de CD14 por PMX depende de la enzima timidilato sintasa | 128 |
| Figura 53. MTX regula la expresión de CD14 en GM-MØ | 129 |
| Figura 54. MTX y PMX no modifican la expresión de CD14 en M-MØ | 130 |
| Figura 55. La adición de CD14 soluble restaura la activación de p38 y JNK, la degradación de IκBα y la producción de IL-6 en respuesta a LPS en PMX GM-MØ | 131 |
| Figura 56. La adición de CD14 soluble restaura la activación de p38 y JNK y la degradación de IκBα en respuesta a LPS en MTX GM-MØ | 132 |
| Figura 57. La concentración de CD14 soluble es menor en el plasma de pacientes con AR tras 6 meses de tratamiento con MTX | 133 |
| Figura 58. La concentración de CD14 soluble es menor en el suero de pacientes con artritis reumatoide respondedores a MTX que en no respondedores a MTX | 135 |
| Figura 59. Análisis de la capacidad de las variables sCD14 basal (ng/ml) y ΔsCD14 para discriminar entre pacientes con artritis reumatoide respondedores o no a MTX | 136 |
| Figura 60. CD115 y CD163: pan-marcadores de macrófagos en tejido sinovial | 143 |
| Figura 61. Selección del <i>sublining</i> como región de interés de estudio de la membrana sinovial de los diferentes grupos de artritis inflamatorias | 144 |
| Figura 62. Expresión de GM-CSF en artritis en diferentes fases de evolución y artritis establecida | 145 |
| Figura 63. Expresión de activina A en el líquido sinovial de artritis en diferentes fases de evolución y artritis establecida | 146 |
| Figura 64. Expresión de marcadores de polarización en macrófagos de artritis reumatoide y macrófagos diferenciados <i>in vitro</i> | 147 |
| Figura 65. Expresión de activina A, TNF-α y MMP12 en macrófagos CD163 ⁺ de membrana sinovial sana, artritis en diferentes fases de evolución y artritis establecida | 149 |
| Figura 66. Expresión de CD209 en macrófagos CD163 ⁺ de membrana sinovial sana, artritis en diferentes fases de evolución y artritis establecida | 150 |
| Figura 67. Dos subgrupos de macrófagos CD163 ⁺ se expresan en artritis indiferenciada en evolución y artritis establecida. | 151 |
| Figura 68. Densidad de macrófagos CD163 ⁺ en membrana sinovial sana, artritis indiferenciada en evolución y artritis establecida | 152 |
| Figura 69. Modelo propuesto del mecanismo de acción de MTX en pacientes con artritis reumatoide | 162 |
| Figura 70. PMX induce un estado de <i>tolerancia cruzada</i> a LPS en GM-MØ | 165 |
| Figura 71. Representación esquemática de la formación de folatos a partir de ácido folínico | 166 |

| | |
|---|------------|
| Figura 72. La especificidad del efecto del antifolato PMX en macrófagos se verifica en presencia de ácido folínico | 167 |
| Figura 73. Los niveles de sCD14 sérico disminuyen en pacientes con artritis reumatoide respondedores a la terapia con MTX | 173 |
| Figura 74. Perfil farmacocinético de MTX en cada uno de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC | 209 |
| Figura 75. MTX <i>in vivo</i> disminuye la expresión de IL-6 en respuesta a LPS en plasma | 209 |
| Figura 76. MTX <i>in vivo</i> disminuye la expresión de IL-1 β en respuesta a LPS en plasma | 210 |
| Figura 77. MTX <i>in vivo</i> disminuye la expresión de IL-10 en respuesta a LPS en plasma | 210 |
| Figura 78. MTX <i>in vivo</i> disminuye la expresión de TNF- α en respuesta a LPS en plasma | 211 |
| Figura 79. MTX <i>in vivo</i> disminuye la producción de TNF- α en respuesta a LPS en monocitos | 211 |
| Figura 80. MTX <i>in vivo</i> no modifica la expresión de IL-6 en monocitos | 212 |
| Figura 81. MTX <i>in vivo</i> no modifica la expresión de IL-1 β en monocitos | 212 |
| Figura 82. MTX <i>in vivo</i> promueve la adquisición de un perfil transcripcional menos proinflamatorio y más profibrótico en monocitos | 213 |
| Figura 83. Expresión de <i>IL6</i> , <i>IL1B</i> y <i>TNFA</i> en monocitos y GM-M \emptyset del Ensayo Clínico METOMAC | 213 |
| Figura 84. PMX promueve un estado de tolerancia transcripcional a LPS en GM-M \emptyset mediado por el bloqueo del metabolismo de un carbono | 214 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|------------|
| Tabla 1. Criterios de selección de sujetos del ensayo clínico METOMAC | 91 |
| Tabla 2. Criterios de respuesta clínica a MTX | 93 |
| Tabla 3. Protocolo de RT | 95 |
| Tabla 4. Protocolo de qPCR | 95 |
| Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos empleados para RT-qPCR | 96 |
| Tabla 6. Anticuerpos primarios para <i>Western blot</i> | 98 |
| Tabla 8. Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia | 99 |
| Tabla 9. Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia y/o citometría de flujo | 99 |
| Tabla 10. Anticuerpos primarios para citometría de flujo | 101 |
| Tabla 11. Datos demográficos de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC | 107 |
| Tabla 12. Datos farmacocinéticos de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC | 108 |
| Tabla 13. Datos clínicos, demográficos y serológicos de la cohorte de inicio | 133 |
| Tabla 14. Datos clínicos, demográficos y serológicos de los pacientes con artritis reumatoide de la cohorte de validación | 134 |
| Tabla 15. Datos demográficos de los controles sanos de la cohorte de validación | 134 |
| Tabla 16. Datos clínicos, demográficos y serológicos de los pacientes incluidos en el estudio | 142 |
| Tabla 17. Patotipo del tejido sinovial de los diferentes grupos de artritis inflamatoria del estudio | 153 |
| Tabla 18. Correlación entre la densidad de macrófagos CD163 ⁺ de la membrana sinovial de artritis en diferentes fases de evolución y artritis establecida y la actividad de la enfermedad | 179 |

A B R E V I A T U R A S

| | |
|-----------------------|--|
| 5-MTHF | 5-metiltetrahidrofolato |
| 7'-OH-MTX | 7-hidroxi-metotrexato |
| AAPA | Anticuerpos antiproteínas acetiladas |
| ACarP | Anticuerpos antiproteínas carbamiladas |
| ACPA | Anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados |
| ACR | Colegio de Reumatología Americana, del inglés <i>American College of Rheumatology</i> |
| ADA | Adenosina desaminasa |
| ADAMTS | <i>A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs</i> |
| AHR | Receptor de hidrocarburos de arilos, del inglés <i>Aryl Hydrocarbon Receptor</i> |
| AI | Artritis indiferenciada |
| AI-APs | Artritis indiferenciada con evolución a artritis psoriásica |
| AI-AR | Artritis indiferenciada con evolución a artritis reumatoide |
| AIA | Artritis inducida por antígeno |
| AICAR | 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido |
| AICARFT | 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido formiltransferasa |
| AINE | Fármaco antiinflamatorio no esteroideo |
| ALRs | <i>AIM2-like receptors</i> |
| AMPA | Anticuerpos antimodificaciones postraduccionales de proteínas |
| AMPDA | AMP desaminasa |
| AMT | Aminopterina |
| Ang-2 | Angiopoyetina |
| AP-1 | <i>Activator protein-1</i> |
| APC | Célula presentadora de antígenos, del inglés <i>Antigen Presenting Cell</i> |
| APs | Artritis psoriásica |
| AR | Artritis reumatoide |
| ATIC | 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido formiltransferasa |
| BCG | Bacilo de Calmette-Guérin, del inglés <i>Bacillus Calmette-Guérin</i> |
| BCRP | <i>Breast Cancer Resistance Protein</i> |
| BH₂ | Dihidrobiopterina |
| BH₄ | Tetrahidrobiopterina |
| BSA | Albúmina de suero bovino, del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i> |
| CARS | Síndrome de respuesta compensatoria antiinflamatoria, del inglés <i>Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome</i> |
| CCL20 | Ligando 20 de la quimioquina tipo CC, del inglés <i>CC motif Chemokine Ligand 20</i> |
| CCR | Receptor de quimioquina tipo CC |
| CD163 | Receptor de hemoglobina-haptoglobina |

| | |
|---------------------|--|
| CD209 | DC-SIGN |
| CDAI | <i>Clinical Disease Activity Index</i> |
| Células NK | Células <i>natural killer</i> |
| Células Th1 | Linfocitos T <i>helper 1</i> |
| Células Th2 | Linfocitos T <i>helper 2</i> |
| Células Treg | Linfocitos T reguladores |
| CEs | Células endoteliales |
| CLRs | Receptores de lectina tipo C, del inglés <i>C-type Lectin Receptors</i> |
| Cmax | Concentración máxima |
| CMLs | Células de músculo liso |
| CMP | Progenitor mieloide común |
| csDMARD | Fármaco antirreumático modificador de la enfermedad sintético convencional, del inglés <i>Conventional Synthetic Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drug</i> |
| CSF-1 | Factor estimulador de colonias 1, del inglés <i>Colony Stimulating Factor 1</i> (también conocido como M-CSF) |
| CSF-1R | Receptor del factor estimulador de colonias 1, del inglés <i>Colony stimulating factor 1-Receptor</i> (también conocido como M-CSFR o CD115) |
| CSF-2 | Factor estimulador de colonias 2, del inglés <i>Colony Stimulating Factor 2</i> (también conocido como GM-CSF) |
| CSF-2R | Receptor del factor estimulador de colonias 2, del inglés <i>Colony Stimulating Factor 2-Receptor</i> (también conocido como GM-CSFR o CD116) |
| CSF-3 | Factor estimulador de colonias 3, del inglés <i>Colony Stimulating Factor 3</i> (también conocido como G-CSF) |
| CTLA4 | Antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos |
| CXCL10 | Ligando 10 de quimioquina de tipo CXC, del inglés <i>CXC motif Chemokine Ligand 10</i> |
| Cyt | Citosina |
| DAMPA | Ácido 2,4-diamino-N-metilpterico |
| DAMPs | Patrones moleculares asociados a daño, del inglés <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> |
| DAPI | 4,6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato |
| DAPSA | <i>Disease Activity PSoriatic Arthritis</i> |
| DAS28 | Puntuación de la actividad de la enfermedad medida en 28 articulaciones, del inglés <i>Disease Activity Score 28</i> |
| DC | Célula dendrítica |
| DHF | Dihidrofolato |
| DHFR | Dihidrofolato reductasa |
| DMRs | Regiones diferencialmente metiladas |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico, del inglés <i>Deoxyribunucleic Acid</i> |

| | |
|-----------------------------------|---|
| DNA-PK | Proteínas quinasas dependientes del DNA |
| DNMT | DNA metiltransferasa |
| dTMP | Deoxitimidina monofosfato |
| dTTP | Deoxitimidina trifosfato |
| dUMP | Deoxiuridina monofosfato |
| EA | Espondiloartritis o Espondiloartropatía |
| EGFR | Receptor del factor de crecimiento epidérmico |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| EMPs | Progenitores eritromieloides |
| ERK1/2 | <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> |
| ES | <i>Enrichment Score</i> |
| EULAR <i>Rheumatism</i> | Liga europea contra el reumatismo, <i>del inglés European League Against Rheumatism</i> |
| FAICAR | 10-formil-AICAR |
| FAME | Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad |
| FAMEsc | Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos convencionales |
| FBS | Suero fetal bovino, del inglés <i>Fetal Bovine Serum</i> |
| Fc | Región constante |
| FDA | <i>US Food and Drug Administration</i> |
| FDR | <i>False Discovery Rate</i> |
| FITC | <i>Fluorescein isothiocyanate</i> |
| FOCM | Metabolismo del folato, del inglés <i>folate-mediated one-carbon</i> |
| FoIAC | Ácido folínico, 5-formil-tetrahidrofolato, 10-CHO-THF |
| FPGs | Folil- γ -poliglutamato sintasa |
| FR | Factor reumatoide |
| FR-α | Receptor de folato- α , del inglés <i>Folate receptor-α</i> |
| FR-β | Receptor de folato- β , del inglés <i>Folate receptor-β</i> |
| FR-γ | Receptor de folato- γ , del inglés <i>Folate receptor-γ</i> |
| FR-δ | Receptor de folato- δ , del inglés <i>Folate receptor-δ</i> |
| FSC-H | <i>Forward Scatter Height</i> |
| G-CSF | Factor estimulador de colonias de granulocitos, del inglés <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i> (también conocido como CSF-3) |
| GAPDH | Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa |
| GARFT | Glicinamida ribonucleótido formiltransferasa |
| GGH | γ -glutamil hidrolasa |

| | |
|--------------------------------|--|
| GM-CSF | Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (también conocido como CSF-2) |
| GM-CSFR | Receptor del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor</i> (también conocido como CSF-2R o CD116) |
| GM-MØ | Macrófagos polarizados por GM-CSF |
| GMP | Progenitor granulocítico mieloide, del inglés <i>Granulocyte-monocyte progenitors</i> |
| GRAPPA | Grupo de Investigación y Evaluación de la Psoriasis y la Artritis Psoriásica, del inglés <i>Group for Research and Assessment of Psoriasis and Psoriatic Arthritis</i> |
| GSEA | Análisis de enriquecimiento en el conjunto de genes, del inglés <i>Gene Set Enrichment Analysis</i> |
| GSK3 | <i>Glycogen synthase kinase 3</i> |
| H3K27ac | Acetilación de la lisina 27 en la histona H3 |
| H3K4me1 | Metilación de la lisina 4 de la histona H3 |
| H3K4me3 | Trimetilación de la lisina 4 en la histona H3 |
| HAQ | Cuestionario de discapacidad, del inglés <i>Health Assessment Questionnaire</i> |
| HAT | Histona acetiltransferasas |
| HDAC | Histona desacetilasas |
| HDMT | Histona demetilasas |
| HDMTX | Dosis altas de MTX, del inglés <i>high-dose MTX</i> |
| HGUGM | Hospital General Universitario Gregorio Marañón |
| HIDS | Síndrome de la hiper inmunoglobulina D |
| HLA-DR | Antígeno leucocitario humano-antígeno D |
| HMGB-1 | <i>High mobility group box 1</i> |
| HMT | Histona metiltransferasas |
| HSCs | Células madre hematopoyéticas |
| IFN | Interferón |
| IFN-α | Interferón- α |
| IFN-β | Interferón- β |
| IFN-γ | Interferón- γ |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| iIL-12/23 | Inhibidores IL-12/23 |
| iIL-17 | Inhibidores IL-17 |
| iJAK | Inhibidores JAK |
| IL | Interleuquina |
| ILC | Célula linfóide innata, del inglés <i>Innate Lymphoid Cells</i> |

| | |
|-----------------------|--|
| IMP | Inosina 5'-monofosfato |
| iPDE4 | Inhibidores de la fosfodiesterasa-4 |
| IRAK1 | <i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i> |
| IRF3 | <i>Interferon Regulatory Factor 3</i> |
| IRG1 | <i>Inmune-responsive gene 1</i> |
| iTNF | Inhibidores de TNF |
| IVIg | Inmunoglobulina intravenosa, del inglés <i>Intravenous immunoglobulin</i> |
| JNK | <i>Jun N-terminal kinase</i> |
| LBP | Proteína de unión a lipopolisacárido, del inglés <i>LPS binding protein</i> |
| LDL | <i>Low Density Lipoprotein</i> |
| LDMTX | Dosis bajas de MTX, del inglés <i>low-dose MTX</i> |
| <i>lincRNA</i> | RNA largos intergénico no codificante, del inglés <i>long intergenic non-coding RNA</i> |
| <i>lncRNA</i> | RNA largos no codificantes, del inglés <i>long non-coding RNA</i> |
| LPS | Lipopolisacárido |
| LS | Líquido Sinovial |
| LTA | Ácido lipoteicoico, del inglés <i>Lipoteichoic acid</i> |
| Lys | Lisina |
| M-CSF | Factor estimulador de colonias de macrófagos, del inglés <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (también conocido como CSF-1) |
| M-CSFR | Receptor del factor estimulador de colonia de macrófagos, del inglés <i>Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor</i> (también conocido como CSF-1R o CD115) |
| M-MØ | Macrófagos polarizados por M-CSF |
| M1 | Macrófago activado por la vía clásica/macrófago con perfil proinflamatorio |
| M2 | Macrófago activado por la vía alternativa/macrófago con perfil antiinflamatorio |
| Maf | <i>Musculoaponeurotic fibrosarcoma protein</i> |
| MafB | <i>MAF bZIP transcription factor B</i> |
| MAPK | Proteína quinasas activadas por mitógenos, del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> |
| MAT | Metionina adenosiltransferasa |
| MetH | Metionina sintasa cobalamina-dependiente |
| MHCI | Molécula de histocompatibilidad I |
| MHCII | Molécula de histocompatibilidad II |
| MIF | Factor inhibidor de la migración de monocitos, del inglés <i>macrophage Migration Inhibitory Factor</i> |
| MMP | Metaloproteinasas de matriz |
| MMPs | Progenitores multipotentes, del inglés <i>Multipotent progenitors</i> |
| MØ | Macrófago |

| | |
|----------------------------|--|
| MO | Monocito |
| MRP | <i>Multidrug Resistance-associated Protein</i> |
| MS | Membrana sinovial |
| MSS | Membrana sinovial sana |
| MTHFC | 5,10-meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa |
| MTHFD | 5,10-metilentetrahidrofolato deshidrogenasa |
| MTHFR | 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa |
| MTHFS | 5,10-meteniltetrahidrofolato sintasa |
| MTX | Metotrexato |
| MTX-Pgl | Metotrexato poliglutamilado/poliglutamatos de metotrexato |
| MTX-Pgl₅ | Pentaglutamatos de metotrexato |
| MyD88 | <i>Myeloid differentiation primary-response protein 88</i> |
| NAD | Número de Articulaciones Dolorosas |
| NAD⁺ | Nicotinamida Adenina Dinucleótido |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato reducido |
| NAT | Número de Articulaciones Tumefactas |
| NFκB | <i>Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i> |
| NLRs | <i>NOD-Like Receptors</i> |
| NOS | Óxido nítrico sintasa |
| NSCLC | Cáncer de pulmón no micrócítico, del inglés <i>non-small cell lung cancer</i> |
| OCM | Metabolismo de un carbono, del inglés <i>One-Carbon Metabolism</i> |
| p38 | Proteína quinasa 38 activada por mitógeno |
| PABA | Ácido <i>p</i> -aminobenzoico, del inglés <i>p-aminobenzoicacid</i> |
| PADI4 | Peptidil arginina deiminasa 4 |
| PAMPs | Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> |
| PAP | Proteinólisis alveolar pulmonar |
| PBMCs | Células mononucleares de sangre periférica, del inglés <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCFT | Transportador de folato asociado a protones, del inglés <i>Proton-Coupled Folate Transporter</i> |
| PCR | Proteína C reactiva |
| PD-L1 | <i>Programmed-Death Ligand-1</i> |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés <i>Platelet Derived Growth Factor</i> |
| PEARL | <i>Princesa Early Arthritis Register Longitudinal</i> |

| | |
|--------------------------------|---|
| PFT | Pifitrina |
| PHD3 | Proil hidrolasa 3 |
| PI3K | Fosfoinositol 3-quinasa |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PMX | Pemetrexed |
| PMX-Pgl | Pemetrexed poliglutamilado/poliglutamatos de pemetrexed |
| PMX-Pgl₅ | Pentaglutamatos de pemetrexed |
| PPARγ | <i>Peroxisome Proliferator- Activated Receptor γ</i> |
| PRR | Receptor de reconocimiento de patrones, del inglés <i>Pattern Recognition Receptor</i> |
| qRT-PCR | <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> |
| RANKL | <i>Receptor Activator for Nuclear Factor κB Ligand</i> |
| RASF | Líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide |
| RFC | Transportador de folato reducido, del inglés <i>Reduce Folate Carrier</i> |
| RLRs | <i>RIG-I-like receptors</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico, del inglés <i>Ribonucleic acid</i> |
| RNI | Reactivos intermediarios de nitrógeno, del inglés <i>Reactive Nitrogen Intermediates</i> |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno, del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> |
| RSA | Resistencia sistémica adquirida |
| RSEM | <i>RNAseq by Expectation and Maximization</i> |
| SAM | S-adenosilmetionina |
| SDAI | <i>Simplified Disease Activity Index</i> |
| SDH | Succinato deshidrogenasa |
| sDMARD | Fármacos antireumáticos modificadores de la enfermedad, del inglés <i>Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drug</i> |
| SEM | Media del error estándar, del inglés <i>Standard Error of the Mean</i> |
| SER | Sociedad Española de Reumatología |
| SHMT | Serina hidroximetiltransferasa |
| siRNA | RNA pequeño de interferencia, del inglés <i>Small interfering RNA</i> |
| SIRS | Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, del inglés <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> |
| SSC-H | <i>Side Scatter Height</i> |
| STAT | <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> |
| TAM | Macrófagos asociados a tumor, del inglés <i>Tumor Associated Macrophages</i> |
| TBP | <i>TATA binding protein</i> |
| TE | Tolerancia a endotoxina |

| | |
|--------------------------------|--|
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante- β , del inglés <i>Transforming Growth Factor-β</i> |
| Th | Célula T <i>helper</i> |
| THF | Tetrahidrofolato |
| TIRAP | <i>TIR-domain-containing adaptor protein</i> |
| TLR | Receptor tipo <i>Toll</i> , del inglés <i>Toll Like Receptor</i> |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral- α , del inglés <i>Tumor Necrosis Factor-α</i> |
| TNFAIP3 | Gen de la proteína 3 inducida por TNF- α , del inglés <i>TNF Alpha-Induced Protein 3</i> |
| TRAF | <i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i> |
| TRAF6 | <i>Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6</i> |
| TRAM | <i>TRIF-related adaptor molecule</i> |
| Treg | Célula T reguladora |
| TRIF | <i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i> |
| TS | Timidilato sintasa |
| TYMS | Gen de timidilato sintasa |
| TyrK | Receptor tirosina-quinasa |
| u.a. | Unidades arbitrarias |
| VEGF | Factor de crecimiento endotelial vascular, <i>del inglés Vascular Endothelial Growth Factor</i> |
| Vmax | Velocidad máxima |
| VSG | Velocidad de sedimentación globular |

R E S U M E N

Los macrófagos son células del sistema inmunitario innato que exhiben una gran plasticidad fenotípica y funcional. La integración de señales derivadas de su ontogenia y del microambiente donde se localizan determinan diferentes estados de polarización. Esta versatilidad funcional les permite estar implicados tanto en el inicio de procesos inflamatorios en respuesta a patógenos como en el mantenimiento de la integridad tisular y resolución de la inflamación. Así, la desregulación de macrófagos está ligada al desarrollo y perpetuación de patologías autoinmunes asociadas con la inflamación crónica como la artritis reumatoide (AR) en la que los macrófagos contribuyen significativamente a la inflamación del tejido sinovial (sinovitis) y a la destrucción articular.

El mecanismo de acción del metotrexato (MTX), fármaco antiinflamatorio de primera elección en el tratamiento de la AR, no está completamente elucidado y se carece de marcadores de respuesta clínica validados. El MTX actúa selectivamente en macrófagos polarizados por GM-CSF (GM-M \emptyset) *in vitro* en los que establece un estado de *tolerancia* (memoria inmune innata) contra estímulos proinflamatorios. Para evaluar la capacidad del MTX de inducir un estado de *tolerancia cruzada* a LPS *in vivo* y determinar el tiempo-respuesta de dicho efecto se realizó el ensayo clínico EudraCT 2017-002902-11, que consistió en la administración de una dosis de MTX a seis sujetos sanos y la determinación de la concentración de citoquinas antes (basal) y después (3h, 24h y 120h) de la toma de MTX en sangre periférica, monocitos y macrófagos, y del perfil transcripcional de monocitos. En comparación con los niveles basales, la concentración de IL-6, IL-1 β , IL-10 (en plasma) y TNF- α (en monocitos) en respuesta a LPS es menor 5 días después de la toma de MTX; y, los monocitos presentan un perfil transcripcional menos proinflamatorio y más profibrótico y reparador.

El pemetrexed (PMX) es un fármaco antifolato que bloquea enzimas implicadas en el metabolismo de un carbono (OCM) y actúa selectivamente en macrófagos GM-M \emptyset . Considerando la gran variabilidad en la respuesta clínica a MTX y una serie de parámetros farmacocinéticos que confieren una ventaja farmacológica del PMX frente al MTX, evaluamos si el PMX inducía un estado de *tolerancia cruzada* a LPS *in vitro* en GM-M \emptyset . Los resultados indican que el PMX es capaz de reprogramar el perfil proinflamatorio de GM-M \emptyset de forma que, ante la exposición a LPS, disminuye la expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria y atenúa la producción de citoquinas proinflamatorias y la señalización de TLR4. Asimismo, demostramos la implicación de CD14, correceptor de TLR4, en la tolerancia inducida por PMX y MTX en respuesta a LPS en GM-M \emptyset . Nuestros resultados amplían el mecanismo de la acción de MTX en GM-M \emptyset , evidencian el efecto antiinflamatorio global de PMX en macrófagos humanos y revelan que el OCM supone una ruta metabólica implicada en el establecimiento de la memoria inmune innata. La relevancia fisiopatológica de estos resultados se apoya en la medida de la concentración sérica de CD14 soluble (sCD14) en dos cohortes de pacientes con AR en tratamiento con MTX. La concentración de sCD14 disminuye significativamente en pacientes con AR respondedores a MTX tras 6 meses de tratamiento en monoterapia y correlacionan con DAS28 (*Disease Activity Score 28*), mientras que no cambian en pacientes no respondedores al fármaco. Asimismo, la concentración basal de sCD14 es significativamente más alta en el suero de pacientes respondedores a MTX que en no respondedores y controles sanos. Tras evaluar la capacidad de las variables sCD14 basal y Δ sCD14 para discriminar entre pacientes respondedores y no respondedores a MTX, hemos confirmado que la determinación de los niveles de sCD14 podría predecir de forma muy significativa la respuesta a MTX en pacientes con AR.

El diagnóstico diferencial entre AR y artritis psoriásica (APs) en las etapas iniciales de la artritis indiferenciada (AI) resulta complejo debido a la falta de criterios específicos de clasificación y a la ausencia de biomarcadores de diagnóstico establecidos. Dada la implicación patológica de GM-CSF en el inicio, desarrollo y progresión de la artritis y en la polarización de macrófagos proinflamatorios, hemos analizado la expresión de GM-CSF y su fuente celular junto con la densidad y polarización de macrófagos, en el tejido sinovial de pacientes con AI en diferentes fases de evolución (AI-AR y AI-APs) en comparación con artritis establecidas (AI, AR y APs) como una primera aproximación para identificar posibles biomarcadores de diagnóstico y clasificación temprana de AI. Nuestros resultados han puesto de manifiesto la expresión de GM-CSF por células endoteliales CD90⁺, fibroblastos CD90⁺ FAP⁺ y macrófagos CD163⁺ y la expresión de marcadores (activina A, MMP12 y TNF- α) asociados con su polarización en todas las fases de artritis en evolución y establecidas, indicando la existencia de macrófagos proinflamatorios desde fases tempranas de AI que sugieren el papel patológico de GM-CSF desde el inicio de la inflamación. Además, hemos identificado algunas diferencias entre AI persistente y sus fases en evolución: la membrana sinovial de AI-AR y AI-APs tiene mayor densidad de macrófagos CD163⁺ y menor expresión de MMP12 que la membrana sinovial de AI, y, el líquido sinovial de pacientes con AI-AR presenta mayor expresión de activina A que el de pacientes con AI persistente.

CONCLUSIONES

1. MTX *in vivo* modula el perfil transcripcional de monocitos e induce un estado de tolerancia cruzada a LPS en monocitos y leucocitos 5 días después de su administración a sujetos sanos.
2. El bloqueo del metabolismo de un carbono por los antifolatos MTX y PMX induce un estado de tolerancia en macrófagos y revela a sCD14 como un potencial biomarcador de respuesta a MTX en pacientes con AR.
3. Macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de artritis en evolución y establecida presentan una predominancia de expresión de marcadores proinflamatorios asociados a la polarización de macrófagos por GM-CSF.
4. La densidad de macrófagos y la expresión de MMP12 en la membrana sinovial difieren entre pacientes con AI persistente y en evolución (AI-AR y AI-APs).

A B S T R A C T

Macrophages are cells of the innate immune system that exhibit a huge phenotypic and functional plasticity. The integration of signals derived from their ontogeny and the stimuli from the microenvironment determine different states of polarization. This functional versatility allows macrophages to be involved in the initiation of inflammatory response to pathogens, in tissue maintenance and repair and in the resolution of inflammation. Therefore, macrophage dysregulation is linked to the development and perpetuation of autoimmune pathologies associated with chronic inflammation such as rheumatoid arthritis (RA) in which macrophages contribute significantly to synovitis and joint destruction.

The mechanism of action of methotrexate (MTX), the anchor antiinflammatory drug for RA treatment, remains inconclusive. Importantly, no robust markers exist for MTX responsiveness. MTX acts selectively targets GM-CSF-polarized macrophages (GM-M \emptyset) where MTX establishes a state of innate immune tolerance against proinflammatory stimuli *in vitro*. The aim of this study was to evaluate the capacity of MTX to induce a state of *cross-tolerance* to LPS (innate immune memory) *in vivo* and to determine the kinetic of this effect. We carried out the clinical trial EudraCT 2017-002902-11 in which six healthy volunteers received a single dose of MTX. The production of cytokines in response to LPS in whole blood, monocytes and macrophages and the transcriptional profile of monocytes were determined before (baseline) and after (3h, 24h and 120h) MTX intake. 5 days (120h) after MTX intake a significant reduction in LPS-induced IL-6, IL-1 β and IL-10 (in whole blood) and TNF- α (in monocytes) was found respect to baseline levels. Moreover, monocytes exhibited a less pro-inflammatory and more profibrotic transcriptomic profile 5 days after MTX intake.

Pemetrexed (PMX) is an antifolate drug that inhibits the activity of enzymes involved in one-carbon metabolism (OCM) and exhibits pharmacokinetic advantages over MTX. Considering the large interpatient variability in MTX clinical response in RA patients, we evaluated whether PMX exhibits antiinflammatory action through the promotion of *cross-tolerance* to LPS in GM-M \emptyset *in vitro*. The results indicate that PMX reprograms the proinflammatory profile of GM-M \emptyset and upon exposure to LPS, PMX GM-M \emptyset diminishes the expression of genes involved in the inflammatory response, attenuates proinflammatory cytokines production and TLR4 signaling. Indeed, we demonstrated the involvement of CD14, a TLR4 correceptor, in this functional state in GM-M \emptyset treated with PMX, and also MTX. Our results indicate the global antiinflammatory effect of PMX in human macrophages, extend the mechanism of action of MTX in GM-M \emptyset and reveal that OCM is a metabolic circuit involved in the establishment of innate immune memory. The pathophysiological relevance of these results was supported by measurement of serum concentration of soluble CD14 (sCD14) in two cohorts of early RA patients under MTX monotherapy treatment. We found that after 6 months of MTX therapy, sCD14 levels significantly diminished exclusively in MTX-responder RA patients and sCD14 levels positively correlated with DAS28 (*Disease Activity Score 28*). Moreover, baseline sCD14 concentration was significantly higher in MTX-responders serum than in non-responders RA patients and healthy donors. After determining whether baseline sCD14 and Δ sCD14 could be variables to discriminate between MTX-responder and non-responder RA patients, we have found sCD14 as a valuable tool to predict MTX-response in RA patients.

The differential diagnosis between RA and psoriatic arthritis (PsA) at the initial stages of undifferentiated arthritis (UA) is complex due to the lack of specific classification criteria and the absence of diagnostic biomarkers. Given the putative pathological involvement of GM-CSF in the

onset, development and progression of arthritis and in the polarization of monocyte-derived proinflammatory macrophages, we have analyzed the expression of GM-CSF and its cellular source, as well as macrophages polarization and density in joints of patients with UA evolving to RA or PsA (UA-RA and UA-PsA) compared with persistent UA and established RA and PsA, respectively, to seek for diagnostic/prognostic UA biomarkers. Our results indicated that GM-CSF is expressed by CD90⁺ endothelial cells, CD90⁺ FAP⁺ fibroblasts and CD163⁺ macrophages. Activin A, MMP12 and TNF- α , markers of GM-CSF-dependent macrophage polarization, were found in all UA and established arthritis groups, indicating the existence of proinflammatory macrophages from early stages of UA and suggesting the pathological role of GM-CSF from the onset of inflammation. We have also identified some differences between persistent UA and its evolving phases: synovial tissue of UA-RA and UA-PsA exhibited higher CD163⁺ macrophages density and lower expression of MMP12 compared with persistent UA, and the synovial fluid activin A levels were higher in of UA-RA patients than persistent UA patients.

CONCLUSIONS

1. MTX modulates the transcriptional profile of monocytes and induces *cross-tolerance* to LPS *in vivo* in monocytes and in leukocytes 5 days after its administration in healthy subjects.
2. Blockade of one-carbon metabolism by the antifolates MTX and PMX conditioned macrophages towards a tolerant state and reveals sCD14 as a potential biomarker for MTX response in RA patients.
3. CD163⁺ macrophages from synovial tissue in all UA and established arthritis groups show a predominance of proinflammatory GM-CSF-associated markers.
4. Macrophage density and synovial MMP12 expression differ between evolving UA (UA-RA and UA-PsA) phases and persistent UA

I N T R O D U C C I Ó N

1. Macrófagos

1.1. Ontogenia del macrófago

A finales del siglo XIX, Ellie Metchnikoff identifica por primera vez un tipo celular caracterizado por su naturaleza fagocítica, a los que llamó *fagocitos* y describe su papel en la protección frente a infecciones ¹. El término *macrófago* (*macros*: grande; *fagos*: comedor) fue acuñado por Aschoff en 1924. En 1972, van Furth y colaboradores clasifican a todas las células mononucleares con capacidad fagocítica y a sus progenitores de médula ósea con la denominación de *sistema fagocítico mononuclear* ^{1,2}. El modelo de ontogenia del macrófago inicial desarrollado por van Furth establece que monocitos derivados de células madre de la médula ósea circulan por la sangre periférica y se infiltran posteriormente en los tejidos dando lugar a macrófagos especializados sin capacidad de proliferación ³. En la actualidad, este modelo se ha redefinido, debido a que se han identificado precursores de macrófagos derivados del saco vitelino y del hígado fetal. Se han establecido tres orígenes para los precursores de macrófagos tisulares: progenitores embrionarios del saco vitelino, monocitos hepáticos fetales y monocitos derivados de médula ósea ^{4,5} (**Figura 1**).

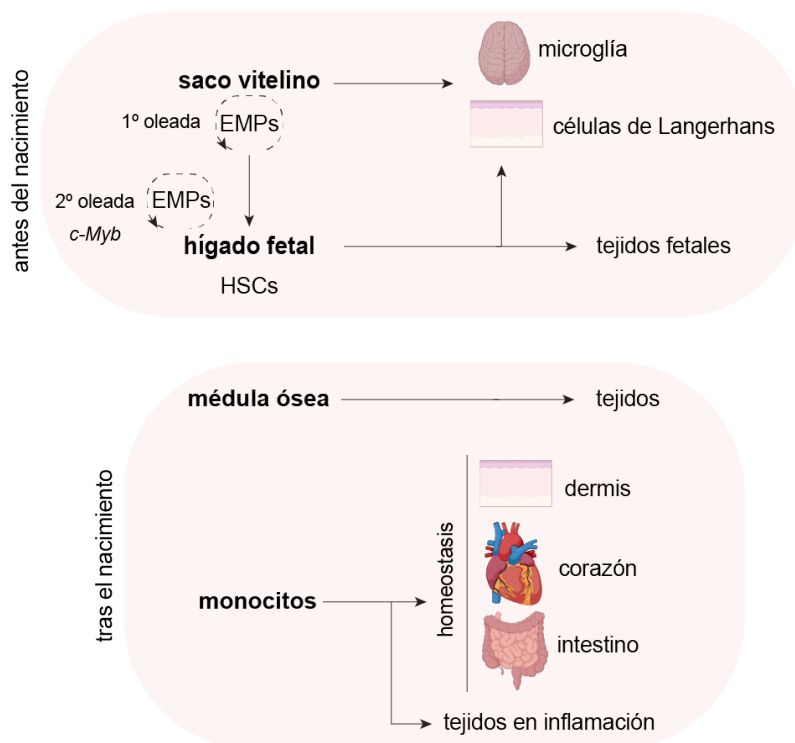


Figura 1. Ontogenia del macrófago. Existen tres orígenes para los precursores de macrófagos tisulares: progenitores embrionarios del saco vitelino, monocitos hepáticos fetales y monocitos derivados de médula ósea. Durante la respuesta inflamatoria y en algunos tejidos en homeostasis como intestino, corazón y dermis, los macrófagos se reemplazan continuamente a partir de monocitos de sangre periférica. EMPs: progenitores eritromieloides; HSCs: células madre hematopoyéticas ⁴⁻⁸.

El saco vitelino presenta progenitores eritromieloides (EMPs), que son los precursores embrionarios de los propios macrófagos del saco vitelino y de los monocitos fetales ^{7,8}. En una primera oleada de proliferación temprana, independiente al factor de transcripción *c-Myb*, los EMPs generan macrófagos vitelinos sin intermediarios monocíticos y, en una segunda ola, dependiente del factor de transcripción *c-Myb*, colonizan el hígado fetal para generar los múltiples linajes hematopoyéticos ⁷. Así, los monocitos derivados del hígado fetal provienen de EMPs y de células

madre hematopoyéticas (HSCs) que se diferencian a macrófagos tras su reclutamiento a los tejidos fetales y reemplazan a los macrófagos preexistentes derivados del saco vitelino ^{5-7,9}. Tras el nacimiento, la hematopoyesis hepática disminuye y se sustituye por hematopoyesis en la médula ósea. Existen algunas puntualizaciones como la microglía, que deriva exclusivamente de los precursores del saco vitelino ^{10,11}, o las células de Langerhans que tienen doble origen, derivan tanto de monocitos de hígado fetal como de progenitores del saco vitelino ¹². Además, en los macrófagos de pulmón se han descrito tres oleadas de colonización de precursores: del saco vitelino; del hígado fetal; y, la última, de médula ósea, que da lugar a los macrófagos intersticiales definitivos que son mantenidos por los progenitores monocíticos circulantes ¹³. Los macrófagos se reemplazan continuamente por monocitos de sangre durante la respuesta inflamatoria y en algunos tejidos en homeostasis como en intestino, corazón y dermis ³.

1.2. Características de los macrófagos

Los macrófagos, junto con los neutrófilos, participan en el desarrollo de la respuesta inmune innata, constituyendo la primera línea de defensa, después de la piel, contra los patógenos, frente a los que generan una respuesta rápida e inespecífica. Macrófagos, monocitos circulantes en sangre periférica y células dendríticas forman parte del *sistema fagocítico mononuclear*. El proceso de *fagocitosis* consiste en el reconocimiento e ingestión de partículas de más de 0.5 μm en una vesícula formada a partir de la invaginación de la membrana plasmática celular. Este proceso resulta clave en la respuesta inmune innata ya que permite la eliminación de microorganismos patógenos invasores, cuerpos apoptóticos y complejos inmunitarios favoreciendo la integridad tisular ^{14,15}.

Los macrófagos constituyen una población celular heterogénea debido a su alta plasticidad. Estas células son capaces de detectar señales extracelulares (estímulos, metabolitos y citoquinas), reajustar su perfil génico y sus capacidades funcionales de manera tejido- y estímulo-específica, lo que implica que desarrollen una gran variedad de funciones dependiendo de modificaciones a nivel metabólico y de la activación de vías de señalización y factores de transcripción específicos ^{16,17}. Esta versatilidad funcional les permite tanto iniciar y regular procesos inflamatorios como recuperar la homeostasis e integridad de tejidos ¹⁸.

Otra de las características de los macrófagos es su capacidad para producir y liberar citoquinas al medio extracelular. Las citoquinas son proteínas inmunomoduladoras que representan la base de la respuesta inmune. Las citoquinas resultan claves en la coordinación y regulación de la respuesta inmune al mediar la comunicación entre las células del sistema inmunitario. Según su contexto de activación y células que las producen se dividen en: interleuquinas (IL), quimioquinas, factores de necrosis tumoral (TNF), factores estimuladores de colonias (CSF) e interferones (IFN). Las IL regulan la activación funcional de las células inmunes y, al igual que los TNF, contribuyen a la diferenciación, proliferación y polarización de algunas subpoblaciones. Los TNF, además, median la infección viral y son capaces de inducir la muerte celular por apoptosis. Las quimioquinas desempeñan un papel básico en la respuesta inmune al contribuir a la migración de leucocitos, mediante un proceso conocido como *quimiotaxis*, y a la polarización de respuestas inmunitarias. Los IFN están implicados en la actividad antiviral y en la estimulación de las células NK (*natural killer*) ¹⁹⁻²¹.

Por último, los macrófagos también actúan como células presentadoras de antígeno. Endocitan, procesan y presentan antígenos de bacterias, parásitos y virus a través de sus moléculas de membrana MHC I y MHC II (moléculas de histocompatibilidad de clase I y II) y expresan moléculas

coestimuladoras, como CD40, CD80 y CD86, que inducen la activación y polarización de los linfocitos T y B ²²⁻²⁴.

1.3. Macrófagos residentes en tejido

Independientemente de su ontogenia, los macrófagos se encuentran presentes en todos los tejidos donde desarrollan funciones esenciales implicadas en la regulación y el mantenimiento de la homeostasis tisular como la eliminación de desechos celulares y células muertas ^{5,25}. Para ello, además de mantener la integridad tisular, los macrófagos residentes exhiben más funciones reparativas y antiinflamatorias que los macrófagos recién reclutados e infiltrados desde la sangre al tejido durante respuestas inflamatorias ²⁶⁻²⁸. La heterogeneidad funcional de este tipo celular también se manifiesta en los macrófagos residentes donde, además de contribuir al mantenimiento e integridad del tejido, exhiben funciones específicas. Aunque los macrófagos tisulares se caracterizan por la expresión común de los factores de transcripción PU.1, C/EBP α , MAF y MAFB, así como la expresión de CD64 y MERTK en su superficie, la existencia de citoquinas y metabolitos del microambiente tisular determinan la expresión de factores de transcripción tejido-específico que resultan esenciales para la diferenciación de macrófagos en cada tejido ²⁹. Así, la expresión de PPAR γ es clave en macrófagos alveolares; GATA6, en macrófagos del peritoneo; LXR α , en macrófagos de la zona marginal del bazo, macrófagos metalofílicos y macrófagos de médula ósea; y, RUNX3, en macrófagos intestinales de la lámina propia ²⁹.

Tras diferenciarse, los macrófagos desempeñan funciones efectoras de manera tejido-específica para contribuir a la homeostasis tisular y la alteración en su diferenciación o actividad se asocia con situaciones patológicas (**Figura 2**) ^{3,29}. En el hígado, los macrófagos hepáticos, denominados células de Kupffer, se encargan de la eliminación de antígenos de la circulación portal hepática y contribuyen a la detoxificación de bacterias y debris celulares. También participan en el metabolismo de la bilirrubina al fagocitar eritrocitos en deterioro. La desregulación de las células de Kupffer se asocia con la fibrosis hepática. Otro ejemplo representativo de macrófagos residentes en tejido que desempeñan una función específica son los osteoclastos, macrófagos de hueso implicados en la degradación y reabsorción ósea, cuya desregulación se asocia con una arquitectura ósea aberrante, osteopetrosis y osteoporosis ^{3,11,29-32}.









| | SUBGRUPO DE MØ | FUNCIÓN HOMEOSTÁTICA | PATOLOGÍA |
|---|---|---|--|
|  | macrófagos de médula ósea | regulación del nicho HSCs desarrollo de eritoblastos | leucemia |
| | osteoclastos | degradación y reabsorción ósea | osteoporosis osteopetrosis tumor óseo |
|  | histiocitos | tolerancia e inmunidad dérmica | fibrosis |
| | células de Langerhans | tolerancia e inmunidad dérmica | histiocitosis psoriasis dermatitis atópica |
|  | microglía | defensa del SNC, modulación proliferación supervivencia neuronal, fagocitosis remodelación sináptica, balance de fluidos y angiogénesis | neurodegeneración |
|  | macrófagos cardíacos | fagocitosis de cardiomiocitos | enfermedad isquémica de corazón |
|  | macrófagos alveolares | inmunidad pulmonar eliminación de surfactante pulmonar | proteinosis pulmonar alveolar |
|  | macrófagos de lámina propia | tolerancia e inmunidad gastrointestinal regulación de la microbiota | enfermedad inflamatoria intestinal |
| | macrófagos de muscularis mucosa | peristalsis | íleo posoperatorio |
|  | células de Kupffer | metabolismo de bilirrubina eliminación de debris celulares sanguíneas y eritrocitos eliminación de antígenos (circulación portal) | fibrosis |
|  | macrófagos de pulpa roja | reciclado de hierro eliminación de plaquetas y eritrocitos | trombocitopenia inmune anemia hemolítica autoinmune |
| | macrófagos metalofílicos | supervivencia inmune | ND |
|  | macrófagos de la zona marginal | mantenimiento de células B | enfermedades autoinmunes |
| | macrófagos espinales macrófagos sinusoides subcapsulares | presentación de antígenos a células B | ND |
|  | macrófagos tejido adiposo | regulación de la sensibilidad a insulina por adipocitos | obesidad resistencia a la insulina |

Figura 2. Macrófagos residentes en tejidos, funciones en homeostasis e implicaciones patológicas. MØ: macrófago; ND: No descrito ^{3,11,29-32}.

1.4. Macrófagos en inflamación

Las células del sistema inmunitario innato detectan la presencia de patógenos y señales de daño, se activan y desencadenan la primera fase de la cascada inflamatoria. En concreto, los macrófagos detectan patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs y patrones moleculares asociados a daño o DAMPs a través de los receptores PRRs (receptores de reconocimiento de patrones), entre los que se encuentran: TLRs (*Toll-like receptors*), NLRs (*NOD-like receptors*), CLR (C-type lectin receptors), RLRs (*RIG-I-like receptors*) y ALRs (*AIM2-like receptors*)^{33,34}. Los PAMPs son secuencias cortas de moléculas altamente conservadas y compartidas entre diferentes patógenos que inducen en los macrófagos la activación de cascadas de señalización proinflamatorias como la vía de

señalización de NFκB y funciones como la endocitosis, presentación de antígenos o fagocitosis de bacterias opsonizadas³⁴. Los DAMPs son moléculas liberadas por células en proceso de muerte celular, estrés o daño para aumentar la respuesta inflamatoria. Algunos DAMPs son moléculas extracelulares, como LDL (*Low density lipoprotein*) y ácido hialurónico, o intracelulares, como chaperonas y HMGB-1 (*High mobility group box 1*), que durante la inflamación salen al exterior celular y son detectadas por los macrófagos^{33,34}. El reconocimiento de PAMPs y DAMPs por PRRs induce al estrés tisular y promueve el inicio de la respuesta inflamatoria³.

Aunque en homeostasis los macrófagos constituyen entre el 10-15% de las células del tejido, en las primeras fases de la respuesta inflamatoria se incrementa el número de macrófagos para potenciar la respuesta inmune^{35,36}. Los monocitos del torrente sanguíneo son reclutados e infiltrados al tejido dañado y se diferencian a macrófagos. Los macrófagos eliminan patógenos mediante la producción de enzimas, especies reactivas de oxígeno (ROS), péptidos antimicrobianos y mediante la fagocitosis. La producción de ROS, junto con citoquinas proinflamatorias y quimioquinas promueven el reclutamiento de otros leucocitos (células NK, neutrófilos y linfocitos T) a la zona de inflamación y son capaces de inducir la respuesta inmune adaptativa. Una vez eliminado el estímulo, el número de macrófagos antiinflamatorios aumenta para resolver la inflamación, disminuye la respuesta Th1 (linfocitos T *helper* 1) y se reclutan poblaciones inmunosupresoras como *Treg* (linfocitos T reguladores). Entre las moléculas que promueven la resolución de la inflamación destaca IL-10, TGF-β (factor de crecimiento transformante-β) y PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas)^{37,38}. Los macrófagos con carácter antiinflamatorio y función reparadora, que derivan de monocitos circulantes, macrófagos tisulares o macrófagos proinflamatorios producen mediadores antiinflamatorios y metaloproteinasas de matriz (MMP) que contribuyen a la remodelación y reparación del tejido e inducen angiogénesis y, en última instancia, tolerancia a antígenos endógenos para devolver al tejido a sus condiciones basales³⁸⁻⁴⁰.

La transición secuencial del estado inflamatorio a antiinflamatorio (también conocido como *re-polarización M1 a M2*, que detallaremos a continuación) asegura la recuperación de la homeostasis del tejido tras la eliminación del daño o patógeno. El desequilibrio en el balance de ambos tipos de macrófagos desencadena patologías como inflamación crónica o inmunosupresión^{3,22,40}. Este desbalance es especialmente relevante en el desarrollo y perpetuación de enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide, donde no se produce la resolución completa de la inflamación lo que desemboca en un daño incontrolado y necrosis tisular⁴¹. Esta desregulación también resulta clave el contexto tumoral donde, las células tumorales pueden inducir un cambio transcripcional en los macrófagos adyacentes que conlleve la modificación de su actividad proinflamatoria y citotóxica por un carácter antiinflamatorio e inmunosupresor e incluso, inducir angiogénesis⁴².

1.5. Estados de activación de macrófagos

La activación de macrófagos depende de la integración de señales derivadas de su ontogenia y del microambiente tisular (factores de diferenciación, citoquinas y metabolitos) en el momento de la estimulación. Dada la amplitud de señales extracelulares que pueden reconocer, los macrófagos pueden adquirir un amplio espectro de estados funcionales de activación, también denominados estados de polarización. Este planteamiento es la base del modelo *colour wheel* (rueda de color), una clasificación de macrófagos en la que, de forma análoga a los tres colores primarios de una rueda de color, define a tres grupos básicos de macrófagos (*macrófagos activados por la vía clásica*,

macrófagos reguladores y *macrófagos wound-healing* o *reparadores*) que pueden tener características compartidas por más de un grupo de macrófagos, de manera similar a los colores secundarios (**Figura 3**)³⁶. A modo de simplificación, y con analogía a las respuestas Th1/Th2 de linfocitos, la clasificación de macrófagos se ha dividido en dos grandes grupos de acuerdo con su respuesta frente a patógenos: *macrófagos M1* o *macrófagos activados por la vía clásica* y *macrófagos M2* o *macrófagos activados por la vía alternativa*^{36,43,44}.



Figura 3. Esquema del modelo *colour wheel*. Adaptado de³⁶.

En respuesta a citoquinas derivadas de la respuesta Th1 (IFN- γ , GM-CSF o TNF- α) o estímulos procedentes de microorganismos como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), los macrófagos adquieren un fenotipo proinflamatorio con gran capacidad presentadora de antígenos, inmunogénica y antitumoral y son altamente eficientes en la eliminación de patógenos. Este proceso se conoce comúnmente como *polarización de macrófagos M1* y este tipo de macrófagos se caracterizan por liberar grandes cantidades de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23, ROS y reactivos intermediarios de nitrógeno (RNI) que conducen al reclutamiento de células Th1 y a la amplificación de la respuesta inmune a través de la expresión de IL-12, CCL2, CXCL9 y CXCL10^{22,25,37,45,46}.

De forma contraria, ante citoquinas derivadas de la respuesta Th2 (IL-4, IL-13, IL-10) y M-CSF o glucocorticoides, los macrófagos adquieren un fenotipo antiinflamatorio e inmunosupresor que participa en la resolución de la inflamación, remodelación, reparación de tejidos y angiogénesis. Este proceso se conoce comúnmente como *polarización de macrófagos M2* y este tipo de macrófagos se caracterizan por una gran capacidad fagocítica y por producir IL-10, TGF- β , y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)^{22,25,37,45,46}.

A pesar de su amplio uso, la dicotomía M1/M2 representa dos extremos opuestos de un amplio rango fenotípico y funcional de estados de activación, por lo que el modelo *colour wheel* fue posteriormente reelaborado explicando la polarización de macrófagos como un sistema dinámico³⁵. Aunque solo reflejan algunos aspectos de los macrófagos *in vivo*, las poblaciones de macrófagos generadas *in vitro* representan un modelo muy útil y ampliamente extendido para estudiar la biología del macrófago. Basado en sus perfiles de citoquinas, los monocitos diferenciados a macrófagos *in vitro* bajo la influencia de citoquinas polarizadoras M1 (LPS, IFN- γ , GM-CSF) representan la activación clásica y son considerados macrófagos proinflamatorios, mientras que monocitos diferenciados a macrófagos bajo citoquinas polarizadoras M2 (IL-4, IL-10, M-CSF) representan la activación alternativa y son considerados macrófagos antiinflamatorios, respectivamente^{47,48}.

1.5.1. Factores estimuladores de colonias

Los factores estimuladores de colonias (CSFs) son un conjunto de proteínas que se definieron originariamente por su capacidad de generar diferentes tipos de poblaciones mieloides murinas a partir de células progenitoras de médula ósea *in vitro* ⁴⁹. Después se corroboró que, además de ejercer una función relevante en el contexto de inflamación, podían actuar de forma directa sobre diferentes poblaciones del linaje mieloides promoviendo la supervivencia, proliferación y/o diferenciación. Cada CSF interviene en la respuesta del hospedador frente al daño tisular e infección, y presentan una gran implicación en el desarrollo de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Existen cuatro tipos de CSFs: el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF o CSF-1), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF o CSF-2), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF o CSF-3) y la interleuquina-3 (IL-3 o CSF) ⁵⁰. Los CSFs directamente relacionados con la diferenciación de macrófagos e implicados en el desarrollo de este trabajo son M-CSF y GM-CSF (**Figura 4**), cuyas características se describen a continuación.

M-CSF

El factor estimulador de colonias de macrófagos, M-CSF (en inglés *Macrophage Colony-Stimulating Factor*), es una glicoproteína dimérica con enlaces disulfuro y un peso molecular de 70 kDa. Es el primer CSF purificado ⁵¹ y el primero en mostrar su capacidad para estimular la formación de colonias de macrófagos murinos a partir de células progenitoras de médula ósea ⁵². M-CSF se expresa, además de por macrófagos, de manera constitutiva por una gran variedad de células de origen mesenquimal y epitelial como células endoteliales, fibroblastos, osteoblastos y células de músculo liso ^{53,54}, y se detecta en plasma a concentraciones de hasta 10 ng/mL en homeostasis ^{54,55}. M-CSF (CSF-1) se encuentra en tres isoformas biológicamente activas: csCSF-1, glicoproteína de superficie celular; spCSF-1, proteoglicano secretado; y, sgCSF-1, glicoproteína secretada). Mientras que csCSF-1 es una glicoproteína transmembrana, spCSF-1 y sgCSF-1 son las formas solubles secretadas por células endoteliales y osteoblastos ^{56,57}. La síntesis local de csCSF-1 mantiene la regulación de varias poblaciones de macrófagos tisulares ⁵⁸ y la función principal de las formas secretadas es el mantenimiento de las células de Kupffer y osteoclastos ^{56,59}.

Las actividades biológicas de M-CSF están mediadas por la señalización a través del receptor M-CSFR, (CSF-1R o CD115) un receptor transmembrana tirosina quinasa de tipo III que se expresa en el sistema de fagocitos mononucleares ^{55,60}. En condiciones homeostáticas, CD115 regula el nivel de M-CSF mediante endocitosis y su posterior degradación intracelular. CD115 constituye un pan-marcador de macrófagos y monocitos humanos y murinos ^{3,61,62}, y resulta clave para el desarrollo de las células dendríticas inflamatorias que se acumulan en tejidos dañados o en inflamación ⁶³. La unión de M-CSF a CSF-1R conduce a la dimerización y autofosforilación del receptor, y a la activación de las rutas de señalización PI3K, ERK y PLC ⁶⁴. CSF-1R es el único receptor tirosina quinasa que comparte los ligandos M-CSF e IL-34, citoquinas con baja similitud de secuencia pero ambas esenciales en la diferenciación de macrófagos residentes de tejidos ^{55,60}. La expresión de IL-34 se restringe a la epidermis y cerebro, donde es producida por queratinocitos y neuronas ^{55,60,65}. Mientras que IL-34 es responsable de la diferenciación y supervivencia de las células de Langerhans y de la microglía, la dependencia de M-CSF está ampliamente extendida en la mayoría de poblaciones de macrófagos ^{12,55}. Esto se manifiesta en ratones con una mutación natural en el gen que codifica para M-CSF (CSF-1). Aunque el número de monocitos sanguíneos que tienen se encuentra en un rango normal, los ratones *Csf^{1op/op}* presentan una reducción drástica en macrófagos de la cavidad peritoneal, dermis, riñón e hígado y sus funciones están alteradas ⁶⁶. A su vez, M-CSF junto con RANKL, miembro de la

familia del TNF, promueven la diferenciación de macrófagos a osteoclastos, macrófagos especializados en la degradación ósea. La deficiencia de M-CSF se asocia con osteopetrosis como resultado de la producción deficiente de osteoclastos^{60,67,68}. Los niveles circulantes de M-CSF están aumentados en muchos tipos de cáncer y se asocian con peor pronóstico. La depleción de M-CSF en modelos experimentales evidencian el papel de esta citoquina en el desarrollo y progresión tumoral, así como en la diferenciación de macrófagos asociados a tumor (TAM) con un perfil antiinflamatorio similar a macrófagos de tipo M2⁵⁰. También se ha descrito como M-CSF está implicado en el reclutamiento de monocitos CCR2⁺ a los sitios de inflamación mediante la inducción de producción de CCL2⁶⁹.

GM-CSF

El factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos, GM-CSF (en inglés *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*), es una glicoproteína ácida con enlaces disulfuro internos y un peso molecular de 23 kDa. Originalmente se definió como factor de crecimiento hematopoyético debido a su capacidad para promover la proliferación y diferenciación de granulocitos y macrófagos murinos *in vitro* a partir de células progenitoras de médula ósea⁴⁹. También se describió su actuación sobre células del linaje mieloide, neutrófilos y macrófagos en supervivencia e inflamación^{70,71}. A diferencia de M-CSF, los niveles de GM-CSF en circulación sistémica en condiciones homeostáticas resultan casi indetectables, pero se elevan rápidamente en condiciones de inflamación o durante la infección por patógenos⁷². GM-CSF se expresa en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, fundamentalmente en células endoteliales, fibroblastos, células dendríticas, linfocitos T, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos en respuesta a citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IL-23 y TNF- α ^{72,73}. Las citoquinas IL-4, IL-10, IL-27 e IFN- γ inhiben su expresión⁷⁴⁻⁷⁶. Las actividades biológicas de GM-CSF están mediadas por la señalización a través del receptor GM-CSFR (CSF-2R o CD116) que se expresa en precursores mieloides, monocitos, macrófagos, granulocitos y células dendríticas. CSF-2-R está formado por una subunidad de unión a ligando (CSF-2-R α) y una subunidad de transducción de señal común a las citoquinas IL-3 e IL-5 (CSF-2-R β c), a través de la cual se produce la señalización^{73,77}. La unión de GM-CSF a GM-CSFR desencadena la activación de múltiples vías de señalización entre las que se incluyen JAK2/STAT5, MAPK y PI3K-Akt^{72,73}.

Localmente, GM-CSF actúa de forma concentración-dependiente en células mieloides promoviendo supervivencia y/o polarización o diferenciación. GM-CSF media la supervivencia de DCs en tejidos no linfoides. La señalización de GM-CSF es necesaria para el desarrollo de DCs residentes en tejidos no linfoides en homeostasis y para la inducción de linfocitos T CD8⁺ frente a antígenos⁶³. GM-CSF también presenta un papel clave en la supervivencia, diferenciación y mantenimiento de macrófagos alveolares⁷⁸. Cuando los precursores de hígado fetal migran al pulmón GM-CSF conduce su diferenciación a macrófagos alveolares mediante la expresión de PPAR γ ⁷⁹. Ratones deficientes de GM-CSF presentan proteínosis alveolar pulmonar (PAP), una patología asociada a la alteración de la señalización de GM-CSF. En PAP se acumula el surfactante pulmonar debido a que los macrófagos alveolares no lo eliminan eficientemente^{80,81}. Estos macrófagos presentan, además, la capacidad de eliminación del colesterol alterada lo que influye de forma directa a la patogénesis de la PAP⁸².

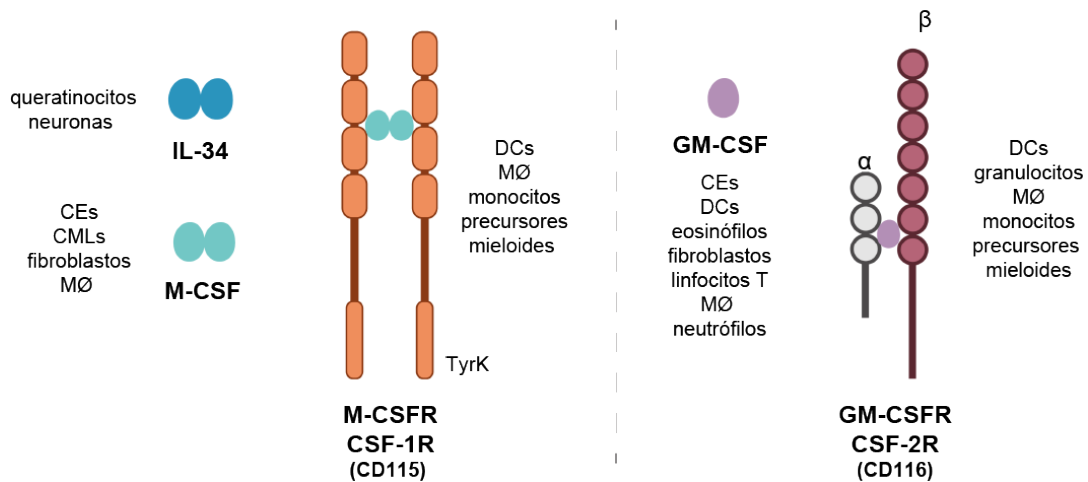


Figura 4. Expresión celular de las citoquinas IL-34, M-CSF y GM-CSF junto con sus receptores específicos M-CSFR o CSF-1R (CD115) y GM-CSFR o CSF-2R (CD116). CEs: células endoteliales; CMLs: células de músculo liso; DCs: células dendríticas; MØ: macrófagos; TyrK: receptor tirosina-quinasa. Adaptado de ^{50,55,60,73,83}.

Polarización de macrófagos por GM-CSF (GM-MØ) y M-CSF (M-MØ)

Como ejemplo representativo de monocitos diferenciados a macrófagos *in vitro* bajo la influencia de citoquinas polarizadoras destaca la polarización de macrófagos en presencia de los factores estimuladores de colonias GM-CSF y M-CSF (**Figura 5**). GM-CSF y M-CSF promueven la diferenciación de monocitos a macrófagos *in vitro* con diferente morfología, susceptibilidad a patógenos y respuesta inmune ^{48,84–86}, fenotipos celulares diferentes ^{69,87,88}, distinto estado metabólico ^{89,90} y funciones efectoras opuestas ^{48,91}. Los monocitos humanos diferenciados en presencia de GM-CSF (GM-MØ) adquieren un perfil proinflamatorio, inmunogénico y antitumoral asociado con la *polarización de macrófagos M1*; mientras que monocitos humanos diferenciados en presencia de M-CSF (M-MØ) adquieren un perfil antiinflamatorio e inmunosupresor asociado con la *polarización de macrófagos M2* ^{50,84,91}.

Durante la diferenciación de monocito a macrófago GM-MØ, GM-CSF promueve la adquisición de un perfil de expresión génica que incluye un conjunto de genes con un perfil de expresión proinflamatorio ^{69,91} que caracteriza a los macrófagos inmunoestimuladores y antitumorales. La activina A contribuye a la adquisición del *conjunto de genes proinflamatorios* ⁹¹. Las activinas son factores de crecimiento pluripotentes y de diferenciación pertenecientes a la familia del TGFβ. La activina A (βAβA), se considera un modulador clave de las respuestas proinflamatorias del linaje mieloides, su expresión aumenta en inflamación y en respuesta a mediadores proinflamatorios ^{92,93}. Los niveles de expresión de *INHBA*, gen que codifica para la subunidad βA de activina A ⁹³, son mayores en macrófagos GM-MØ que en M-MØ ⁹¹. La activina A es producida por macrófagos GM-MØ y promueve la adquisición de genes dependientes de la polarización por GM-CSF (*CCR2*, *EGLN3*, *CCL17*) ^{90,91}, mientras que inhibe la expresión de genes dependientes de M-CSF (*FOLR2*, *IL10*, *IGF1*, *SERPINB2*) ⁹¹. La activina A contribuye a la polarización de macrófagos proinflamatorios por GM-CSF (GM-MØ) a través de la señalización Smad2/3 y limita la adquisición de un fenotipo antiinflamatorio por M-CSF (M-MØ) ⁹¹. Algunos de los genes que se expresan preferencialmente en GM-MØ son *CCR2*, receptor de CCL2 que media la migración de monocitos y su infiltración; *EGLN3*, que codifica para la enzima PHD3; *MMP12*, también conocida como elastasa de macrófagos (HME); junto con *CCL17*, *CLEC5A*, *ECSCR* e *IRF4*, entre otros ^{69,90,91,94}. En respuesta a estímulos patogénicos que activan TLR como el LPS, los GM-MØ producen citoquinas

proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-23 y TNF- α ^{35,47,50,85,91,94,95} y quimioquinas como CCL1, CCL2, CCL5, CCL22 y CCL24 que promueven el reclutamiento de leucocitos^{35,36,47,95}.

Por otro lado, durante la diferenciación de monocito a macrófago M-M ϕ , M-CSF promueve la adquisición de un conjunto de genes con un *perfil de expresión antiinflamatorio*^{47,91,94,96,97} que caracteriza a los macrófagos residentes de tejidos^{88,96,98,99} y macrófagos asociados a tumor (TAM) *in vivo*¹⁰⁰. La expresión del *conjunto de genes antiinflamatorios*, que se asocia con la producción de IL-10 tras la estimulación de M-M ϕ por PAMPs, está altamente regulada por el factor de transcripción MafB *in vitro*¹⁰¹ y bajo el control de Maf *in vivo*¹⁰². Entre los genes que caracterizan a los macrófagos M-M ϕ destacan *FOLR2*, cuya expresión está regulada por el factor de transcripción PU.1¹⁰³, y la lectina de tipo C CD209 o DC-SIGN¹⁰⁴. También se expresan preferencialmente en M-M ϕ los genes *CD36*, *CD163L1*, *CD209*, *CMKLR1*, *ETS2*, *HMOX1*, *HTR2B*, *IGF1*, *IL10*, *IRF5*, *SERPINB2*, *SLC40A1* y *STAB1*^{87,88,91,94,101,105}. En respuesta a ligandos de TLR como LPS, los M-M ϕ producen altos niveles de IL-10 y menores niveles de citoquinas proinflamatorias que los GM-M ϕ ^{35,48,86,94,98}.

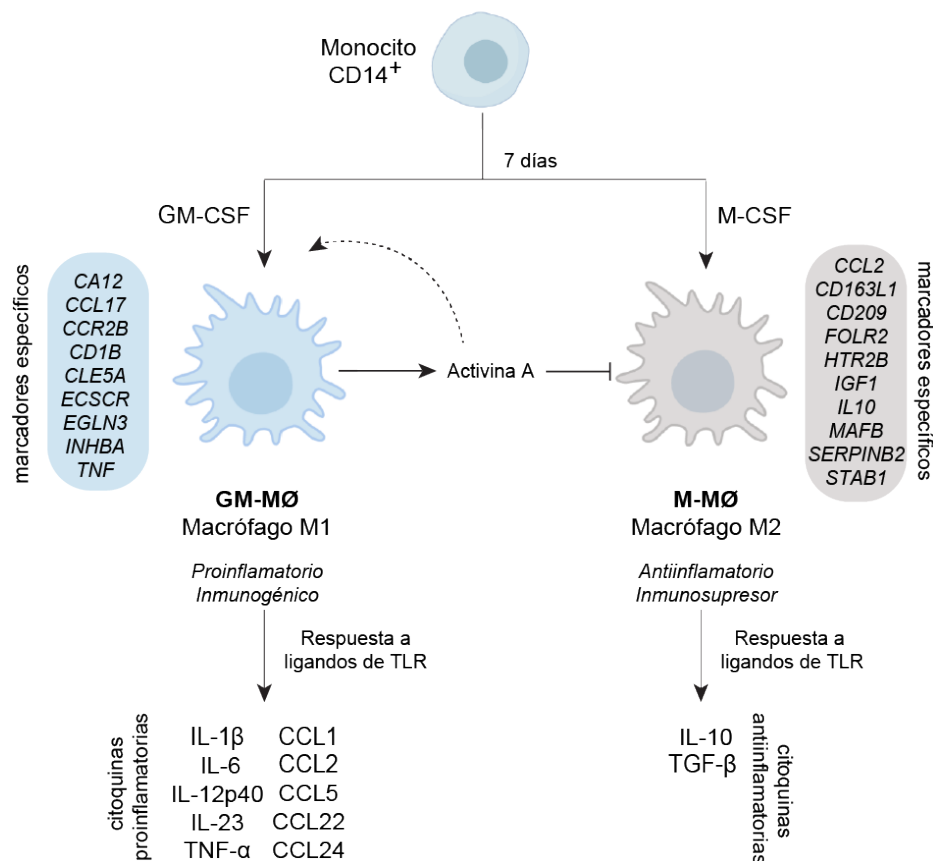


Figura 5. Representación esquemática de la polarización de macrófagos *in vitro* con las citoquinas GM-CSF y M-CSF.

Monocitos CD14⁺ purificados a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se cultivan durante 7 días en presencia de GM-CSF (1000 U/ml) o M-CSF (10 ng/ml) para generar macrófagos GM-M ϕ (M1, proinflamatorio) o M-M ϕ (M2, antiinflamatorio). Las citoquinas se añaden al cultivo cada dos días.

GM-CSF en inflamación y artritis

GM-CSF induce la movilización de monocitos y precursores hematopoyéticos hacia zonas de inflamación y la diferenciación de monocitos a partir de precursores (mielopoiesis)^{50,72}. En modelos murinos de autoinmunidad e inflamación, el bloqueo de GM-CSF reduce el reclutamiento de monocitos y neutrófilos hacia las zonas de inflamación; mientras que la administración *in vivo* de

GM-CSF moviliza monocitos desde la médula ósea hacia el torrente sanguíneo^{50,106}. A su vez, empleando ratones deficientes en GM-CSF (CSF-2^{-/-}) o anticuerpos monoclonales neutralizantes anti-GM-CSF en modelos experimentales de autoinmunidad e inflamación crónica, numerosos estudios han demostrado que GM-CSF actúa como mediador de inflamación tisular^{50,83,107}.

GM-CSF es una de las primeras citoquinas detectadas en el líquido sinovial de artritis reumatoide¹⁰⁸ y numerosas evidencias sugieren que GM-CSF juega un papel importante en el inicio y desarrollo de la artritis^{75,109,110}. Aparte de la presencia de GM-CSF en sitios de inflamación, GM-CSF funciona como adyuvante y potencia el sistema inmunitario al exacerbar la artritis experimental y la encefalomiелitis autoinmune, un modelo experimental de esclerosis múltiple¹¹¹⁻¹¹⁴. A su vez, se ha descrito que ratones CSF-2^{-/-} están protegidos del desarrollo de artritis inducida por antígeno (AIA)¹¹² y la importancia de GM-CSF en la artritis inflamatoria se refuerza, además, por el hecho de que la administración *in vivo* de anti-GM-CSF reduce la gravedad de la inflamación y severidad de AIA¹¹¹. En línea con estos datos, a partir de un modelo murino de artritis espontánea autoinmune mediado por células T (cepa murina SKG) se ha demostrado que la producción de GM-CSF por células Th17 está aumentada en inflamación crónica y este proceso resulta imprescindible en el inicio de la artritis experimental. Las células Th17 inducen la producción de GM-CSF por células del estroma sinovial como ILCs (células linfoides innatas), vía IL-2, y FLS, vía IL-17. La producción de GM-CSF por ILCs también se induce por IL-33 o ligandos de TLR9. GM-CSF, producida por ILCs, Th17 y FLS, activa a macrófagos sinoviales adyacentes que promueven la inflamación y daño articular en ratones SKG. Además, presencia de ILCs productoras de GM-CSF en el líquido sinovial de pacientes con AR apoyan estos resultados¹¹⁴.

Recientemente, se ha descrito como la producción de GM-CSF en la espondiloartritis (EA) humana tiene lugar por células localizadas en múltiples compartimentos linfoides. En concreto, la expresión de GM-CSF está aumentada en células CD4, CD8, $\gamma\delta$ e ILCs en pacientes con EA con respecto a controles sanos, y el aumento de producción de GM-CSF ocurre tanto en el contexto de respuesta tipo Th17, como de forma independiente a la citoquina IL-17A. Además, las células CD4 del líquido sinovial son las principales productoras de GM-CSF, lo que sugiere también la implicación de GM-CSF desde el inicio del proceso patogénico en EA¹¹⁵. GM-CSF induce la producción de la quimioquina CCL17 a través de una cascada de señalización que implica la activación y expresión del factor de transcripción IRF4 en monocitos humanos y monocitos y macrófagos murinos tratados *in vitro*^{116,117}. Otros autores han asociado CCL17 e IRF4, a macrófagos con perfil antiinflamatorio. CCL17 está implicada en la remodelación de tejidos y progresión de la inflamación en el contexto de artritis inflamatorias y daño tisular. La vía GM-CSF-IRF4-CCL17 está activada en pacientes con AR donde los niveles sistémicos de CCL17 disminuyen con la terapia anti-GM-CSFR¹¹⁸. Estudios recientes muestran que la activación de IRF4 por GM-CSF en macrófagos puede, además, inducir la expresión de otras moléculas proinflamatorias como MHC-II¹¹⁷ y la ruta GM-CSF-IRF4-CCL17 se asocia con la producción de TNF por parte de otras células¹¹⁹.

La sobreexpresión de GM-CSF se asocia con erupciones de artritis y pacientes que recibieron GM-CSF después de la quimioterapia muestran exacerbación de la AR y un incremento de la concentración de IL-6 y TNF- α en suero¹⁰⁹. Además, GM-CSFR (CD116) está sobreexpresado en macrófagos CD68 y CD163 en el tejido sinovial de pacientes con AR y artritis psoriásica (APs) en comparación con los niveles de expresión en pacientes con osteoartritis y controles sanos¹¹⁰. En línea con estos datos, macrófagos de la membrana sinovial de pacientes con AR activa muestran un

perfil de polarización transcriptómica y fenotípica proinflamatoria que se asemeja a la de macrófagos diferenciados en presencia de GM-CSF⁹⁹.

Dada la implicación de GM-CSF en el contexto de inflamación, se han llevado a cabo y están en continuo desarrollo un gran número de ensayos clínicos empleando anticuerpos neutralizantes contra GM-CSF o GM-CSFR en enfermedades autoinmunes e inflamatorias^{50,72,107}. Acorde al papel de GM-CSF en AR, y debido a que su depleción resulta efectiva y disminuye la severidad de la enfermedad, en la actualidad hay diferentes ensayos clínicos con fármacos¹²⁰ entre los que se incluyen *mavrilimumab*, IgG4 dirigido contra la cadena alfa de GM-CSFR^{121,122}; o, *namilumab*¹²³⁻¹²⁵, *lenzilumab*¹²⁶ y *GSK3196165*¹²⁷, IgG1 dirigidos contra GM-CSF.

2. Memoria inmune innata

2.1. Sistema inmunitario innato y adaptativo

El sistema inmunitario es el mecanismo de defensa del organismo frente a infecciones por parásitos, bacterias, hongos y virus. Constituye una red compleja de diferentes procesos, tipos celulares y moléculas que permiten neutralizar la invasión de patógenos. El sistema inmunitario, originariamente, se ha clasificado como sistema inmunitario innato y sistema inmunitario adaptativo (Figura 6).

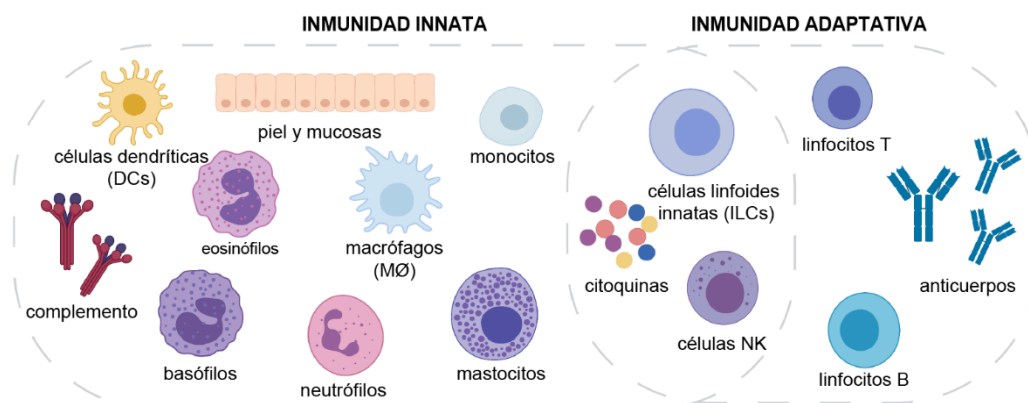


Figura 6. Componentes de la inmunidad innata e inmunidad adaptativa.

La inmunidad innata se considera inespecífica, rápida y sin capacidad para generar memoria inmunológica. El sistema inmunitario innato incluye barreras físicas y químicas (piel y mucosas), células mieloides (monocitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, mastocitos, eritrocitos y plaquetas), algunas células de carácter linfocitario (células NK e ILCs) y también componentes del sistema humoral como defensinas y el sistema del complemento. La inmunidad adaptativa se caracteriza por generar una respuesta más lenta pero específica frente a patógenos y generar memoria inmunológica. El sistema inmunitario adaptativo está basado en la familia de las inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) y células linfoides (linfocitos B y linfocitos T)^{128,129}.

2.2. Memoria del sistema inmunitario innato

La memoria inmunológica se refiere a la capacidad que tiene el sistema inmunitario de responder de forma más rápida y eficiente a la exposición repetida de un estímulo patogénico¹²⁸. El sistema inmunitario innato constituye la primera línea de defensa frente a patógenos y otras señales de daño

a las que el organismo está continuamente expuesto y proporciona la base para el desarrollo de la inmunidad adaptativa. Tradicionalmente, los sistemas inmunitarios innato y adaptativo se han diferenciado por la velocidad de actuación y especificidad de respuesta, así como, por la capacidad para generar memoria inmunológica. Sin embargo, desde hace años, este paradigma ha cambiado.

En plantas e invertebrados, carentes de sistema inmunitario adaptativo, se han atribuido características de memoria inmunológica a su sistema inmunitario innato. Las plantas son capaces de responder de forma más eficiente ante una reinfección mediante el sistema de resistencia adquirida o resistencia sistémica adquirida (RSA)¹³⁰. El RSA se disemina desde el sitio de infección hacia la totalidad de la planta mediante moléculas de señalización, aumentando la expresión de PRRs y la secreción de proteínas antimicrobianas¹³¹. Entre los mecanismos responsables de este proceso resultan cruciales modificaciones epigenéticas y metabólicas^{130,131}. De forma similar, el sistema inmunitario de invertebrados también tiene capacidad de generar respuestas de memoria frente a una reinfección subsecuente con el mismo patógeno o uno diferente. Por ejemplo, la infección con *Streptococcus pneumoniae* o *Beauveria bassiana* en *Drosophila melanogaster* le confiere protección frente a la reinfección con los mismos microorganismos a través de un mecanismo dependiente de la activación de TLRs que implica a macrófagos¹³². También se han descrito características de memoria inmunológica en *Anopheles gambiae*, al infectarse con *Plasmodium falciparum*¹³³, o en el escarabajo de la harina, *Tenebrio molitor*, donde la exposición a LPS le protege frente al hongo *Metarhizium anisopliae*¹³⁴.

Numerosos estudios en modelos *in vivo* han descrito características de memoria inmunológica asociadas al sistema inmunitario innato. Los primeros estudios en modelos animales mostraron que la vacunación con bacterias como el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), hongos (*Candida albicans*) o parásitos helmintos (*Nippostrongylus brasiliensis*) protegían frente a infecciones heterólogas de forma independiente a la producción de anticuerpos característicos de la memoria adaptativa¹³⁵. Por ejemplo, la vacunación con BCG protegía a los animales contra infecciones secundarias de *Candida albicans* y *Mycobacterium tuberculosis*^{136,137}, así como de la infección por malaria y fiebre amarilla^{138,139}. En mamíferos se ha descrito que, tras la inyección con BCG, las células NK producen una mayor cantidad de citoquinas proinflamatorias y muestran características de memoria inmunológica independiente a células T y B^{140,141}. Este estado funcional se denomina fenotipo *trained* o *entrenado*, que se describirá a continuación. En humanos, múltiples estudios epidemiológicos han demostrado que vacunas vivas atenuadas pueden proteger contra microorganismos heterólogos diferentes del patógeno vacunal. Un ejemplo de ello se da con la vacunación de recién nacidos con BCG, que protege frente a la tuberculosis pero también frente a infecciones del tracto respiratorio y sepsis neonatal^{142,143}.

Las células del sistema inmunitario innato presentan características de memoria inmunológica inespecífica, son capaces de recordar un primer encuentro con patógenos (como la vacunación con BCG), resultando en cambios funcionales que confieren protección frente a segundas reinfecciones a través de mecanismos que no implican a linfocitos T ni linfocitos B¹³⁰. El primer estímulo induce una reprogramación de las células que da lugar a un aumento (*trained immunity* o *inmunidad entrenada*) o una atenuación/disminución (*tolerance* o *tolerancia*) de su capacidad efectora tras la exposición a un segundo estímulo (Figura 7)^{135,144,145}. En concreto, el *trained immunity* se define como una protección aumentada no específica frente a infecciones o patógenos después de la exposición a ciertos componentes microbianos como el componente de la pared celular fúngica β -glucano¹⁴⁶, la vacunación con BCG¹⁴¹, la exposición a *Candida albicans*¹⁴⁷ o la

infección con *citomegalovirus* ^{148,149}. Las células *entrenadas* o *trained* exhiben mayor capacidad de producción de mediadores inflamatorios tras la exposición a un segundo estímulo y aumentan la capacidad de defensa. Por el contrario, la exposición a ciertas moléculas como LPS o lipopéptido triacilado (Pam3CSK4), induce un estado transitorio de *tolerancia*, donde las células *tolerizadas* o *tolerantes* responden de manera subóptima a una exposición subsecuente de LPS (*tolerancia a endotoxina*) o a un estímulo diferente a LPS (*tolerancia cruzada a endotoxina*) ^{135,144,150}.

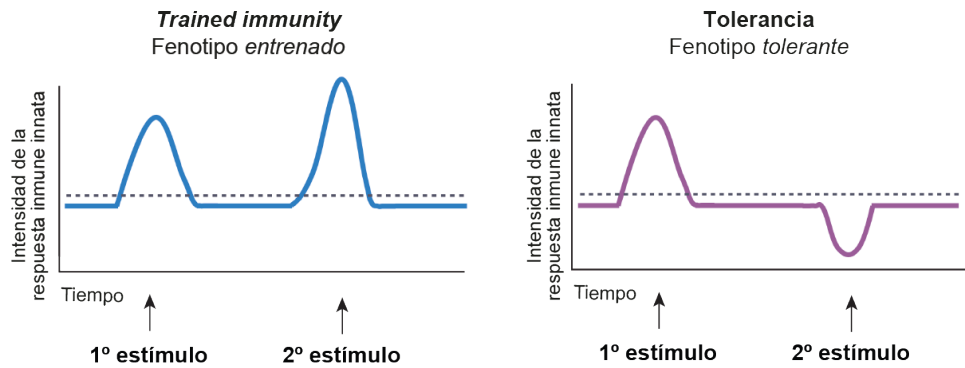


Figura 7. Representación esquemática del comportamiento de las células del sistema inmunitario innato durante los diferentes programas de la memoria inmune innata: *trained immunity* o *tolerancia*. Adaptado de ^{144,151}.

La memoria inmune innata o *inmunidad entrenada* no solo implica a monocitos de sangre periférica, macrófagos y células dendríticas de tejidos, células NK y células epiteliales (*inmunidad entrenada periférica*), sino también produce cambios a nivel de progenitores de médula ósea (*inmunidad entrenada central*) ^{135,151}. Estudios recientes han demostrado como la modulación de las células madre hematopoyéticas (HSCs) durante la inmunidad entrenada permite el sustento de la respuesta de las células mieloides a un segundo estímulo a pesar de su corta vida media en la circulación sanguínea ^{137,152–154}. El β -glucano y el BGC pueden reprogramar a progenitores mieloides (CMPs) que generan inmunidad entrenada dentro del compartimento mieloides de la médula ósea ^{152,153}.

A pesar de que la memoria inmune innata aunque constituye un mecanismo de defensa adicional del hospedador, también está involucrada en patologías ¹⁵¹. Como ejemplo, el concepto de tolerancia a endotoxina (LPS) se ha descrito en la inmunoparálisis o inmunosupresión que tiene lugar durante el estado de sepsis ¹⁵⁰. En el caso de condiciones de inflamación crónica, el efecto de la *inmunidad entrenada* o *trained* puede contribuir a la hiperinflamación y progresión de enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunitarios o neuroinflamación ^{151,155}.

La activación de rutas de señalización y transcripción génica inducidas por el estímulo inicial son diferentes en ambos programas de la memoria inmune innata, pero ambos están mediados por mecanismos similares basados en la reprogramación metabólica y reprogramación epigenética. Aunque los cambios metabólicos y epigenéticos están regulados por diferentes conjuntos de enzimas, ambas vías de reprogramación interactúan. Las rutas metabólicas pueden regular los programas epigenéticos al proporcionar metabolitos intermediarios que sirven de sustratos para las enzimas que contribuyen a los cambios epigenéticos, por ejemplo, el acetil-coA es el mayor sustrato de la enzima histona acetiltransferasas. A su vez, cambios metabólicos también dependen de modificaciones de histonas, y, por tanto, existe una comunicación entre ambas vías de reprogramación ^{156–159}.

2.3. Reprogramación epigenética

Las células inmunes responden a estímulos externos a través de programas funcionales y transcripcionales. La actividad transcripcional se regula mediante la accesibilidad a la cromatina o la afinidad de los factores de transcripción al DNA en el contexto de la cromatina. En esta modulación están implicadas las modificaciones epigenéticas que modifican la heterocromatina, silenciada o inactiva a nivel transcripcional, a eucromatina, activa a nivel transcripcional, y viceversa. Estas modificaciones condicionan el desarrollo celular, la activación inmune y la memoria del sistema inmunitario innato. La estimulación de las células innatas va acompañada de marcas en la cromatina (modificaciones postraduccionales de histonas) y cambios en la metilación del DNA que permiten el despliegue de la cromatina y facilitan el reclutamiento de complejos proteicos nucleares para inducir la transcripción génica de factores proinflamatorios ¹⁵⁷.

La metilación del DNA implica inaccesibilidad a la cromatina y represión transcripcional. Las enzimas DNA metiltransferasas (DNMT) reconocen y metilan las secuencias ricas en CpG en los residuos de citosina (Cyt). No existen muchas evidencias de que la metilación del DNA juegue un gran papel en la TE en macrófagos, a excepción de un estudio que describe cambios específicos inducidos por LPS en la metilación del DNA y propone que el β -glucano es capaz de revertir parcialmente el estado tolerancia inmune a LPS en macrófagos a nivel epigenético ¹⁶⁰. La mayoría de las regiones diferencialmente metiladas (DMRs), más del 90%, ocurren en regiones/elementos distales marcadas por la metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me1), parte ocurren en regiones distales de la acetilación de la lisina 27 en la histona H3 (H3K27ac) en *enhancers* y en regiones de cromatina abiertas, mientras que solo un 6% ocurre en promotores.

Numerosos estudios describen el papel clave de la modificación de histonas en la memoria inmune innata ¹⁵⁷. Los residuos de lisina (Lys) de las histonas pueden ser modificados mediante la adición de grupos metilo (metilación) o grupos acetilo (acetilación) que regulan la accesibilidad de la maquinaria transcripcional a las regiones promotora y *enhancer* de genes. La metilación de histonas se produce por enzimas histona metiltransferasas (HMT) y la eliminación de los grupos metilo por las enzimas histona demetilinasas (HDMT). Del mismo modo, la acetilación de histonas es catalizada por enzimas histona acetiltransferasas (HAT) y las enzimas histona desacetilasas (HDAC) eliminan los grupos acetilo. La persistencia de las marcas epigenéticas permite un reclutamiento rápido de factores de transcripción y expresión de genes tras la estimulación con un segundo estímulo. En este contexto, la *inmunidad entrenada* y la *tolerancia* a endotoxina están asociadas con alteraciones epigenéticas en la trimetilación de la lisina 4 en la histona 3 (H3K4me3), H3K27Ac, H3K4me1, así como la sensibilidad a la enzima DNAsa I, permitiendo una mayor o menor respuesta tras una segunda estimulación con LPS ¹⁶¹.

En la *inmunidad entrenada* las marcas epigenéticas características son H3K4me3 en el promotor de genes estimulados por el primer estímulo (por ejemplo, citoquinas proinflamatorias en respuesta a LPS) y H3K27ac en las regiones promotoras y *enhancer* distales junto con H3K4me1. Temporalmente el proceso es el siguiente: las células en estado quiescente (*naïve*, sin estimular) tienen la cromatina en un estado altamente condensado y metilación global del DNA y, por consiguiente, hay poca expresión génica de genes de citoquinas. Tras la estimulación, las marcas epigenéticas que aparecen son H3K27ac y H3K4me3 y disminuye la metilación del DNA, la cromatina se despliega, se activa la transcripción y las células estimuladas producen citoquinas. Cuando desaparece el primer estímulo, en la célula *entrenada* en estado *resting*, vuelve a disminuir la

expresión génica, la cromatina se recondensa parcialmente, hay una metilación parcial del DNA y como marca epigenética queda H3K4me1 de forma latente en *enhancers*. La exposición al segundo estímulo va ligada a las marcas H3K4me, H3K27ac y H3K4me1 y la disminución de la metilación global del DNA que provoca la apertura de la cromatina. Todo ello induce el aumento en la expresión génica y en la producción de citoquinas ^{135,151}.

En la *tolerancia* a LPS están implicados dos tipos de genes inducidos por la señalización de TLR4 que difieren en la modificación de histonas. Los *genes tolerizables* son genes inducidos por LPS pero que, tras una segunda estimulación con LPS, no se inducen, mientras que los *genes no tolerizables* son genes inducidos por LPS que se reinducen con la misma expresión o aumentada tras la estimulación de las células *tolerizadas* ¹⁶². Los genes tolerizables se asocian con genes implicados en la respuesta inflamatorias como los que codifican para citoquinas proinflamatorias, mientras que los genes no tolerizables se asocian a genes antimicrobianos. Aunque los promotores de ambos tipos de genes pueden ser modificados, únicamente las histonas de los promotores de los genes no tolerizables son re-acetiladas o -metiladas tras la estimulación con LPS en macrófagos *tolerantes*. Así, la inactividad transcripcional de macrófagos *tolerizados* en respuesta a un segundo estímulo de LPS está ligada a la disminución de las marcas de activación de histonas en los promotores de genes tolerizables que incluyen citoquinas proinflamatorias ¹⁶²⁻¹⁶⁴. Por ejemplo, en macrófagos *tolerizados*, H3K4me3 no aparece en el promotor de los genes como *IL6* y la exposición al segundo estímulo induce el silenciamiento de la expresión génica de *IL6*. Sin embargo, el tratamiento con pargilina, inhibidor de la desmetilación de lisina por la enzima lisina desmetilasa 1A (KDM1A), permite restaurar la marca H3K4me3 en el promotor del gen *IL6* durante tolerancia e inducir la expresión de *IL6* ¹⁶². Así mismo, se ha descrito un aumento de marcas de activación de histonas en el promotor de genes implicados en el metabolismo lipídico y fagocitosis de *macrófagos tolerizados* ^{160,162}.

Además de las modificaciones de histonas, los RNAs no codificantes (lncRNAs) hacen de link entre los cambios epigenéticos y metabólicos en la memoria inmune innata ¹⁵⁷.

2.4. Reprogramación metabólica

La respuesta de las células inmunes ante estímulos externos y el desarrollo de diferentes programas funcionales implica cambios metabólicos para adaptar las necesidades celulares de obtención energía ante las nuevas condiciones. En este sentido, el metabolismo celular también es un mediador clave de la reprogramación de células mieloides que tiene lugar durante la memoria inmune innata ^{156,158}.

Muchos estudios evidencian la asociación entre la memoria inmune innata y las alteraciones metabólicas, por ejemplo, rutas metabólicas como la glicólisis, la glutaminólisis o el metabolismo del colesterol desempeñan un papel fundamental en la producción de citoquinas y modificaciones epigenéticas de células *entrenadas* ^{156,159,165}. El metabolismo de la glucosa y glutamina resultan cruciales para la inducción de la *inmunidad entrenada* por BCG y los monocitos *entrenados* exhiben un aumento del ratio de la glicólisis aeróbica y producción de lactato, cambios que contribuyen a su reprogramación epigenética a largo plazo ¹⁶⁵. El β -glucano, componente de la pared fúngica que activa a dectina-1, induce un fenotipo *entrenado* en monocitos que se asocia con un aumento del consumo de glucosa, de la producción de lactato y del ratio NAD(P)⁺/NAD(P)H. Este cambio metabólico de fosforilación oxidativa hacia glicólisis está mediado por la ruta de señalización Akt-mTOR-HIF-1 α ¹⁴⁶. Además, el mevalonato, un metabolito esencial en la síntesis de colesterol resulta

clave para la inducción de la *inmunidad entrenada* por β -glucano a través del receptor IGF1-R, la señalización por mTOR y la H3K27ac. A su vez las estatinas, que inhiben la producción de mevalonato, previenen la inducción de la *inmunidad entrenada*. Estos resultados se apoyan en análisis realizados en pacientes con el síndrome de la hiper inmunoglobulina D (HIDS) que acumulan mevalonato debido a una deficiencia en la enzima mevalonato quinasa. Los monocitos de estos pacientes presentan un fenotipo *entrenado* y producen gran cantidad de citoquinas ¹⁶⁶. También se han implicado metabolitos de la ruta de síntesis del colesterol en la *inmunidad entrenada* inducida en macrófagos tras la exposición a β -glucano, BCG o oxLDL (lipoproteínas de baja densidad) ¹⁶⁶.

Respecto a los cambios metabólicos durante la *tolerancia*, la fosforilación oxidativa (metabolismo glicolítico) es característica de macrófagos *tolerizados* ^{164,167,168}. El itaconato, metabolito endógeno del ciclo de Krebs expresado por el gen *IRG1* en respuesta a LPS, inhibe a I κ B α e induce tolerancia en monocitos humanos y se ha sugerido su implicación en la inmunosupresión durante la sepsis ¹⁶⁹. El perfil transcripcional y metabólico de pacientes con sepsis revela como evento inicial clave de la respuesta inmune el cambio metabólico de fosforilación oxidativa hacia glicólisis aerobia. Sin embargo, monocitos aislados de pacientes sépticos durante la fase de inmunoparálisis muestran un ratio reducido de glicólisis y β -oxidación, así como una disminución en la producción de citoquinas ¹⁷⁰. La reprogramación funcional y metabólica de monocitos en sepsis está mediada por HIF-1 α y presentan un fenotipo inmunosupresor con alta capacidad de fagocítica y de remodelación de tejidos ¹⁷¹. Por su parte, el β -glucano revierte parte de los cambios epigenéticos, funcionales y transcripcionales de la tolerancia inducida por LPS en monocitos ¹⁶⁰ y es capaz de restaurar la expresión de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH) en monocitos *tolerantes* y revertir el estado de inmunoparálisis ¹⁶⁹.

2.5. Tolerancia a endotoxina

La tolerancia a endotoxina (TE) es un fenómeno en el que las células mieloides expuestas a bajas concentraciones de LPS adquieren un estado refractario transitorio en el que responden de manera subóptima a un segundo estímulo de LPS ¹⁵⁰. La primera observación que se conoce de tolerancia a LPS data de 1946, cuando Paul Baeson observó cómo la vacuna tifoidea aplicada de forma repetida en conejos causaba una reducción progresiva de la fiebre provocada por la vacuna ¹⁷². Este suceso también se observó en humanos cuando la reinyección con endotoxina a pacientes con fiebre tifoidea y malaria provocaba una reducción de síntomas como la fiebre ¹⁷³. Estudios posteriores en ratones mostraron que la exposición previa a LPS confería protección frente a una dosis letal subsecuente de LPS y demostraron la implicación de monocitos y macrófagos en TE ¹⁷³. Además, en diversos modelos *in vitro* de TE, se ha comprobado que tanto monocitos humanos como macrófagos murinos generan una respuesta atenuada a LPS tras la exposición previa a bajas concentraciones de LPS ^{162,174}.

Clínicamente, la tolerancia a endotoxina se asocia al estado de inmunoparálisis de monocitos y macrófagos que tiene lugar en pacientes con sepsis ^{150,175}. Durante la sepsis tienen lugar dos fases que pueden superponerse durante la enfermedad. Una fase inicial o fase aguda inflamatoria conocida como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) se caracteriza por una liberación exacerbada de citoquinas a nivel sistémico denominada *tormenta de citoquinas* y una segunda fase de inmunoparálisis conocida como síndrome de respuesta compensatoria antiinflamatoria (CARS) caracterizada por la expresión de reguladores negativos de la señalización por TLRs, producción de citoquinas antiinflamatorias y apoptosis de células inmunes ¹⁵⁰. La

inmunoparálisis que caracteriza a la TE se produce como adaptación patofisiológica frente a la respuesta inflamatoria exacerbada durante la *tormenta de citoquinas* y aumenta la susceptibilidad a infecciones secundarias. La tolerancia a LPS no sólo se limita a estados sépticos, también refleja los eventos patológicos que tienen lugar durante la pancreatitis, leucemia linfática crónica y fibrosis quística ¹⁵⁰.

A nivel funcional, la tolerancia a LPS se asocia con una disminución de la capacidad de presentación antigénica en monocitos y macrófagos por la disminución de la expresión de MHCII (HLA-DRs) y moléculas coestimuladoras (CD86), pero mayor actividad fagocítica debido al aumento de expresión del número de receptores *scavenger* y CLR como MARCO, CD64, CLEC4a ^{162,176-178}. Los monocitos y macrófagos *tolerizados* muestran una disminución de la expresión de citoquinas proinflamatorias (CCL3, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α) y un aumento en la expresión de citoquinas antiinflamatorias (IL-1RA, IL-10, TGF- β) en comparación con la respuesta a LPS de células no *tolerizadas* ^{150,176}. Todos estos eventos intervienen en el cambio de un fenotipo inflamatorio a un estado transitorio y refractario de tolerancia.

2.6. Señalización por TLR4: implicación en tolerancia a endotoxina

La tolerancia a endotoxina se regula a muchos niveles entre los que se incluye el receptor de señalización TLR4 (*Toll-like receptor 4*), reguladores negativos de la señalización por TLR4, remodelación de la cromatina y microRNAs ^{150,163}. La activación de TLRs desencadena vías de señalización celular que permiten el reclutamiento de las moléculas adaptadoras MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM, IRAK y TRAF ¹⁷⁹. TLR4 es el PRRs mayormente implicado en la detección de bacterias Gram negativas a partir del reconocimiento y unión del LPS de su pared bacteriana. TLR4 se expresa en la superficie de muchas células incluyendo monocitos y macrófagos ^{179,180}.

La señalización de LPS se inicia cuando el complejo LBP-LPS transfiere LPS a CD14 (**Figura 8**). CD14 actúa como correceptor de TLR4, permitiendo la unión de LPS con el heterodímero TLR4-MD2, lo que desencadena la activación de las vías de señalización MyD88- y TRIF-dependientes. La asociación de MyD88 a TLR4 conduce al reclutamiento de IRAK (dímero IRAK1 e IRAK4) y el complejo MyD88-IRAK1-IRAK4 activa a TRAF6. TRAF6 produce, a su vez, la activación de la ruta de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la ruta de señalización de NF κ B. La ruta de las MAPKs incluye p38, JNK y ERK1/2. La fosforilación de estas proteínas induce la activación de la familia de factores de transcripción AP-1 o la estabilización del *mRNA* para regular respuestas inflamatorias ^{33,163,180}. La activación de ruta de señalización de NF κ B implica que el complejo IKK fosforile al inhibidor I κ B α , permitiendo su ubiquitinación y su posterior degradación proteasomal. De este modo, el dímero activo de NF κ B (p65/p50), que es reclutado por I κ B α en el citoplasma, se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes proinflamatorios como *TNFA*, *IL1B* e *IL6* ^{33,163,181}. De forma más tardía a la señalización dependiente del adaptador MyD88, el complejo CD14-TLR4-MD2 se internaliza por endocitosis y se libera al compartimento endosomal donde recluta a TRIF ¹⁸². La interacción de TRIF con TRAF6 permite la activación de NF κ B y MAPKs, y la interacción de TRIF con TRAF3 recluta a TBK1 e IKK ϵ induciendo la fosforilación y activación de IRF3. IRF3 dimeriza y se transloca al núcleo donde induce la transcripción de genes de IFN tipo I (*IFNA*, *IFNB*), activando el factor de transcripción STAT1 a través de IFNAR. Además, el interferón de tipo II (IFN- γ ,) también activa STAT1. Ambos, IRF3 y STAT1, inducen la expresión de CXCL10, CCL5 y CCL2. Juntos, IRF3, AP-1 y NF κ B son los responsables de la expresión de genes inducidos en respuesta a LPS ^{33,150,163}.

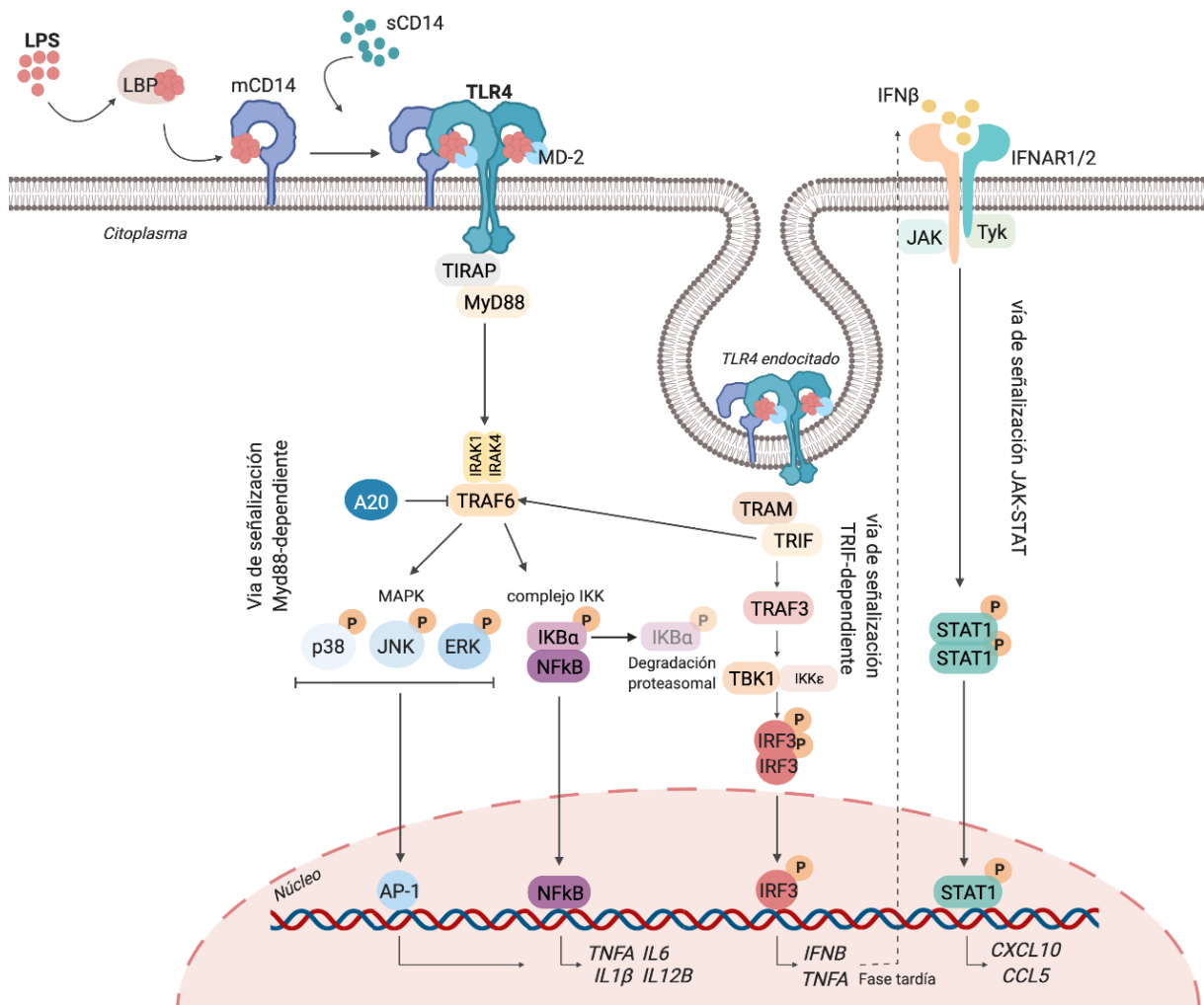


Figura 8. Representación esquemática de la señalización por TLR4. Adaptado de ¹⁵⁰.

La estimulación prolongada con LPS atenúa la expresión o actividad de muchos de estos intermediarios de la señalización LPS-TLR4 (expresión de TLR4, asociación del complejo LPS-TLR4-MyD88, actividad de IRAK, degradación I κ B α y la activación de ERK, p38, JNK y NF κ B) y aumenta la expresión de reguladores negativos como A20 e IRAK-M ^{163,164}. La ubiquitinasa A20, codificada por *TNFAIP3*, resulta clave para el control homeostático de la ruta NF κ B e interacciona con ligasas E3, TRAF6 e IKK, inhibiendo la ruta a diferentes niveles ^{183,184}.

La TE se asocia con una menor formación del complejo TLR4-MyD88, una disminución en la actividad de IRAK-1, MAPK y NF κ B (degradación de I κ B α) y un aumento de expresión de A20 ^{150,164,185,186}. Con respecto a NF κ B, se ha descrito un aumento de la expresión del dímero p50/p50 que carece del dominio de activación. p50/p50 ocupa el sitio del promotor del dímero activo p65/p50, impidiendo, así, la transcripción de *TNFA* e *IL12B* e induciendo la expresión de *IL10*, *TGFB1* y *COX2* ^{150,163,184}.

Por último, se ha descrito también un papel relevante de los microRNAs en el contexto de los mecanismos moleculares asociados a la TE. Los microRNAs o miRNA son moléculas de RNA de entre 15-25 nucleótidos que se unen a secuencias de *mRNA*, debido a su similitud, e inducen su degradación o bloquean su traducción y alteran la respuesta de las células mieloides a PAMPs o

DAMPs. A nivel de la señalización de TLR4, se ha descrito la implicación de algunos miRNAs como supresores a diferentes niveles. En TE se sobreexpresa de miRNA21, que inhibe la activación de NFκB y aumenta la traducción de IL-10; así como miRNA146 y miR155, que inducen la degradación de IRAK-1 y TRAF6; miRNA221, que inducen la degradación del mRNA de *Tnfa*; y, miRNA9, que bloquea la transcripción de NFκB, entre otros ^{150,162-164}.

2.7. Tolerancia cruzada a LPS

El término *tolerancia cruzada* o *heterotolerancia* hace referencia a los casos en los que la tolerancia se desarrolla a partir de un estímulo inicial diferente al estímulo posterior. La *tolerancia cruzada a LPS* o la *cross-tolerancia a LPS* se da cuando las células se exponen a un estímulo diferente de LPS (como TNF-α) y las células responden de manera subóptima a la estimulación posterior con LPS ^{150,185}. Por ejemplo, se ha descrito la disminución de TNF-α y el aumento de IL-10 en respuesta a LPS tras la inducción de TLRs por algunos DAMPs como ácido hialurónico o fibronectina ^{187,188}. Las proteínas S (*spike*) y N (*nucleocápside*) de SARS-CoV-2 inducen tolerancia a LPS *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y monocitos, al disminuir la producción de TNF-α e IL-6 por PBMCs tras la estimulación con LPS y al aumentar la expresión de PD-L1 y reducir la expresión de CD68 y HLA-DR en monocitos respecto a las células expuestas exclusivamente a LPS ¹⁸⁹.

La exposición de macrófagos a TNF-α induce un estado de *tolerancia* en macrófagos de forma que producen menor cantidad de citoquinas proinflamatorias tras la estimulación con LPS y Pam3Cys, ligando de TLR2. Además, el pretratamiento con dosis bajas de TNF-α protege a ratones de los efectos letales de la inyección de dosis altas de LPS. Mecánicamente, TNF-α induce *tolerancia cruzada* a LPS mediante dos mecanismos dependientes de la quinasa GSK3. El pretratamiento con TNF-α atenúa la señalización por TLR4 como consecuencia de un aumento de la expresión de A20 (*TNFAIP3*) y de IκBα e inhibe la remodelación de la cromatina inducida por LPS necesaria para la expresión de *IL6* ¹⁸⁵.

Algunos fármacos también están implicados en la inducción de un estado de *tolerancia* en células mieloides. Las inmunoglobulinas intravenosas (IVIg) que se emplean en el tratamiento de inmunodeficiencias, condiciona a macrófagos humanos a la adquisición de un estado de *tolerancia cruzada* a estímulos proinflamatorios *in vitro* e *in vivo* ¹⁹⁰. Los estudios de nuestro grupo de investigación han descrito que el fármaco metotrexato (MTX) induce tolerancia a TNF-α y LPS en macrófagos *in vitro*. Partiendo de la determinación del perfil de expresión génica inducido por MTX, fármaco de referencia en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), en macrófagos GM-MØ ¹⁹¹, se ha determinado que la acción antiinflamatoria del MTX es consecuencia de su capacidad para inducir un estado de tolerancia inmunológica frente a estímulos proinflamatorios en macrófagos GM-MØ *in vitro* (**Figura 9**) ¹⁸⁶. El tratamiento con dosis bajas de MTX condiciona a GM-MØ hacia un estado de *tolerancia cruzada* a ligandos de TLR como LPS (TLR4), LTA (ácido lipoteicoico, ligando de TLR2) y TNF-α en comparación con GM-MØ, al disminuir la producción de citoquinas IL-1β e IL-6 respecto a los macrófagos sin tratar con MTX. Además, el MTX también disminuye la producción de IL-6 en respuesta a líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide activa (RASf), lo que indica que el pretratamiento con MTX hace a los GM-MØ (MTX GM-MØ) menos respondedores ante estímulos proinflamatorios presentes en la cavidad articular de la AR. La *tolerancia cruzada* de MTX a LPS inducida por MTX se ha verificado *in vivo* en un modelo animal de sepsis. Los ratones tratados durante 7 días con MTX muestran una menor producción de IL-6 y TNF-α en suero en respuesta a LPS. A nivel molecular, MTX reduce la activación de la vía de las MAPK, NFκB y TRIF en respuesta a

LPS y TNF- α y la atenuación de la señalización por TLR4 está mediada por un aumento de la expresión del gen y la proteína *TNFAIP3/A20*. La trascendencia fisiopatológica de estos resultados se apoya en análisis realizados sobre muestras de pacientes con AR. La expresión de *TNFAIP3* en PBMCs es significativamente mayor en pacientes con AR que responden al tratamiento con MTX ¹⁸⁶, lo que sugiere a *TNFAIP3* como biomarcador de respuesta a MTX en AR.

Estos resultados preliminares del grupo suponen la base del primer objetivo de la tesis doctoral que consiste en determinar si la acción antiinflamatoria de MTX, derivada de su capacidad para inducir un estado inmune de tolerancia a estímulos proinflamatorios observada *in vitro* e *in vivo*, se verifica *ex vivo* en sujetos sanos tras la toma de MTX.

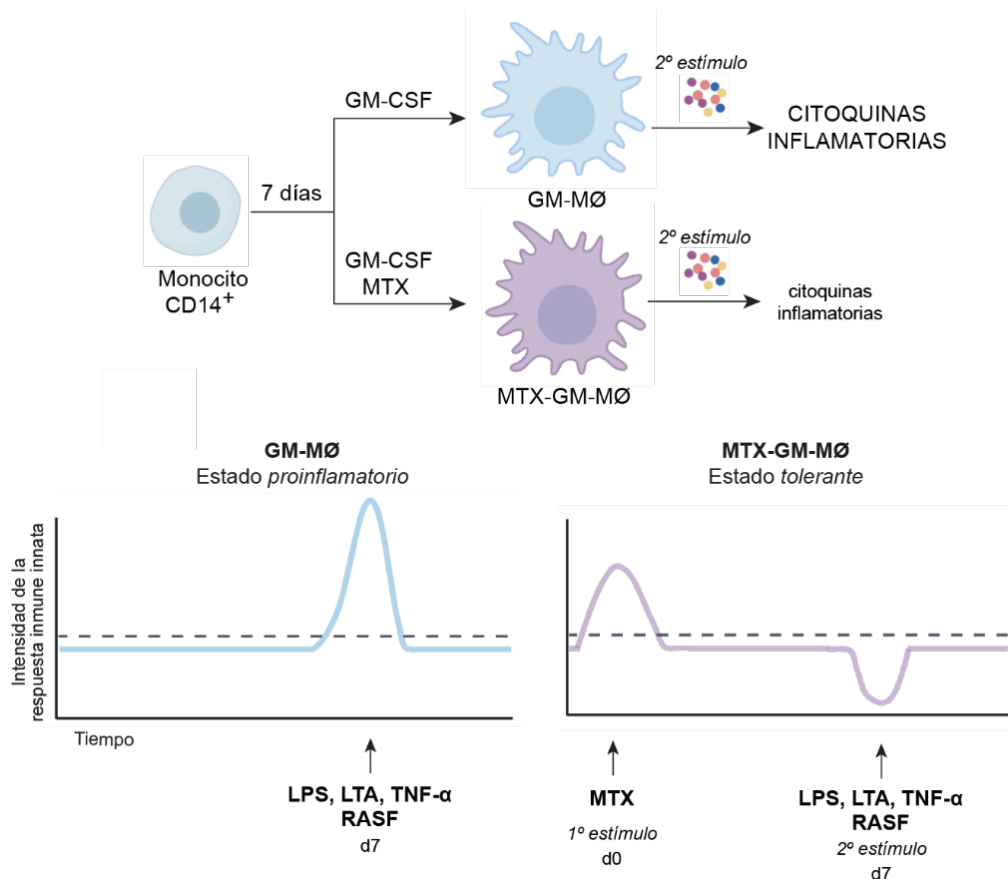


Figura 9. Representación esquemática de la tolerancia cruzada inducida por MTX en GM-MØ *in vitro*. Monocitos CD14⁺ tratados (50 nM, MTX GM-MØ) o no (GM-MØ) con MTX al inicio del proceso de diferenciación a macrófagos con GM-CSF. MTX GM-MØ hiporesponden tras la exposición al LPS, LTA, TNF- α o líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (RASf) a día 7¹⁸⁶.

3. Metabolismo de un carbono y ácido fólico

El metabolismo de un carbono (OCM, *one-carbon metabolism*), también conocido como metabolismo del folato (FOCM, *folate-mediated one-carbon*), engloba un conjunto de rutas metabólicas que implican a los ciclos de folato y metionina, donde se transfieren átomos de un carbono (1C) entre moléculas donadoras yceptoras. El tetrahidrolfolato (THF), comúnmente denominado folato, y sus formas derivadas juegan un papel esencial como intermediarios del OCM participando en eventos celulares esenciales como la síntesis de ácidos nucleicos, el metabolismo de aminoácidos como serina, glicina y metionina, reacciones de metilación y balance energético a partir de moléculas de ATP y NADPH. El OCM no solo proporciona y redistribuye átomos de carbono

necesarios para la biosíntesis, sino que también actúa como sensor del estado nutricional celular y regulador del balance redox celular y epigenético (**Figura 10**)¹⁹²⁻¹⁹⁶.

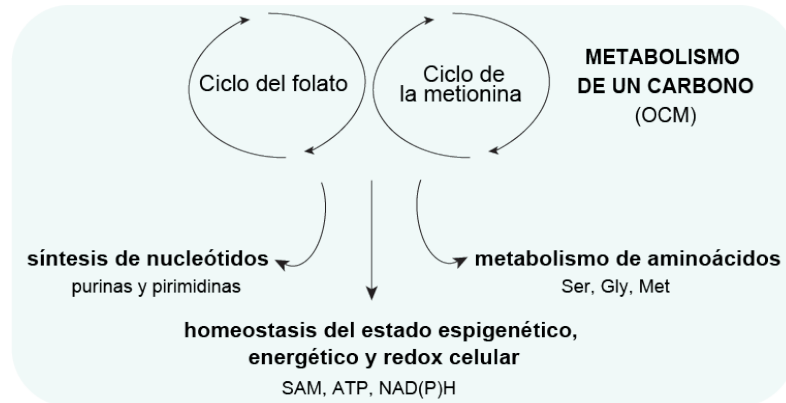


Figura 10. Metabolismo de un carbono. El metabolismo de un carbono (OCM) engloba a un conjunto de rutas metabólicas implicadas en los ciclos del folato y metionina^{197,198}.

El ácido fólico es la forma oxidada y sintética de la vitamina B9, pero se encuentra naturalmente presente en forma de folatos, derivados reducidos y biológicamente activos. Estructuralmente, está compuesto por un anillo de pteridina (2-amino-4-hidroxi-6-metilpteridina) unido por un puente metileno a un residuo de ácido *p*-aminobenzoico (PABA) formando el ácido pteróico que, a su vez, se une por un enlace peptídico a un residuo de ácido glutámico (**Figura 11**)^{198,199}.

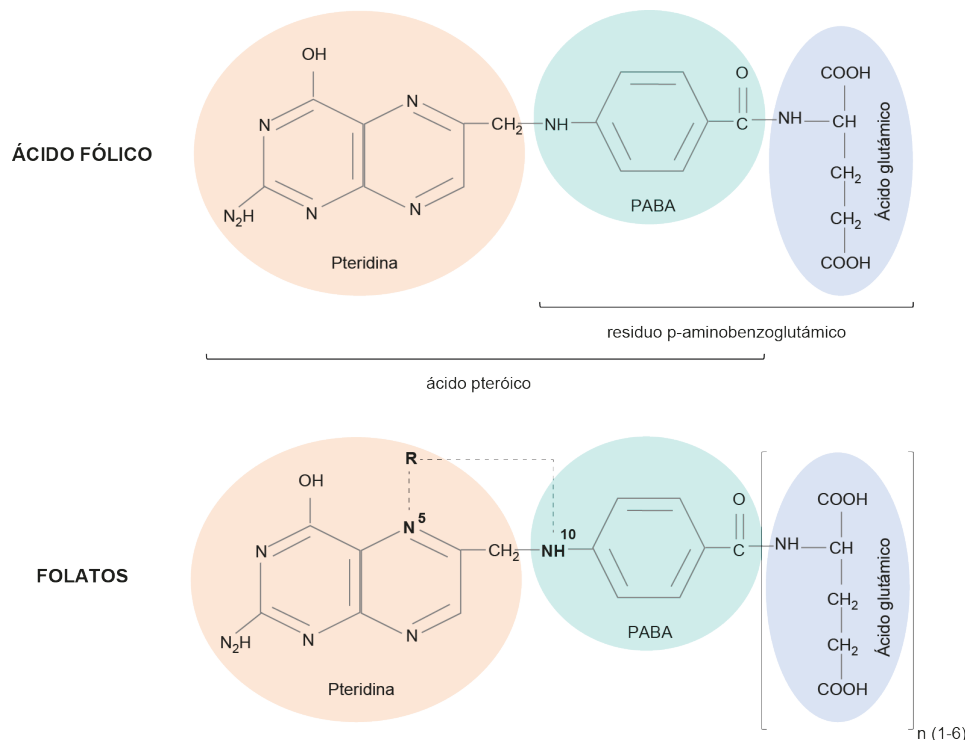


Figura 11. Estructura química del ácido fólico y folatos. Los derivados reducidos de los poliglutamatos constituyen las formas fisiológicamente activas de los folatos, y las posiciones N5 y N10, los sitios activos de la molécula. PABA: ácido *p*-aminobenzoico. Adaptado de¹⁹⁹.

Mientras que los requerimientos de la vitamina B9 son universales, los métodos de obtención de folato difieren entre organismos. Plantas, hongos, algunos protozoos, arqueas y

bacterias, como las presentes en la microbiota del tracto digestivo humano (*Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Streptococcus thermophilus*), son capaces de sintetizar folatos *de novo* a través de la misma ruta biosintética pero con algunas modificaciones^{200–204}. Sin embargo, los mamíferos no son capaces de sintetizar folatos por lo que los requerimientos nutricionales son dependientes de la dieta. Esto se debe que son capaces de sintetizar el anillo de pteridina pero carecen de las enzimas responsables de la unión de la pteridina a PABA. El ácido fólico se encuentra en verduras de hoja verde (rúcula, lechuga, espinacas, acelgas), otras verduras como brócoli, coles de Bruselas o espárragos, legumbres (judías, garbanzos, soja, guisantes) y frutos secos (semillas de girasol y cacahuets)^{198,199}.

Los diferentes folatos se diferencian en el estado de oxidación del anillo de pteridina, que puede presentar varias formas reducidas y varios tipos de sustituciones, y en el residuo de *p*-aminobenzoglutamato, que puede presentar unidos en el enlace peptídico varios residuos de glutamato. El anillo de pteridina puede encontrarse parcialmente reducido en la posición 7,8, dando lugar al 7,8-dihidrofolato (DHF) o completamente reducido en las posiciones 5, 6, 7 y 8, dando lugar al 5, 6, 7, 8-tetrahidrofolato (THF). El THF, a su vez, es capaz de aceptar unidades de un solo átomo de carbono (R) que se fijan mediante uniones covalentes en las posiciones 5 del átomo de nitrógeno (N5) del anillo de pteridina, 10 del nitrógeno (N10) o ambas (**Figura 11**), dando lugar a diferentes estados de oxidación de carbono: 5-formil-THF, 10-formil-THF o 5, 10-formil-THF, en su forma más oxidada; 5, 10-metilen-THF, en su forma intermedia; o 5-metil-THF, en su forma más reducida, cada una de ellas implicada en diferentes funciones biosintéticas del OCM. Además, múltiples residuos de glutamatos se pueden unir mediante enlaces peptídicos^{197,199}.

3.1. Transporte de folatos y retención intracelular: poliglutamilación

Los folatos se absorben principalmente en el intestino delgado, pero debido a su naturaleza hidrofílica, el transporte por difusión pasiva entre membranas celulares es mínimo, por ello, se requieren transportadores altamente específicos para mediar su absorción intestinal y transporte entre tejidos. La internalización del folato en las células está mediado por el transportador de folato acoplado a protones (PCFT), el transportador de folato reducido (RFC) y por los receptores de folato (FRs)^{199,205,206}.

El PCFT, también conocido como HCP-1 y codificado por el gen *SLC46A1*, media la internalización de folatos y derivados a nivel intestinal, placenta e hígado. Funciona de manera óptima a pH bajo (pH = 5.5) mediante un simporte unidireccional que cotransporta protones (H⁺) y folatos al interior celular^{207,208}. El RFC, codificado por el gen *SLC19A1*, supone la mayor ruta de internalización del folato y derivados al interior celular a pH fisiológico (pH = 7.4) en mamíferos. Es un intercambiador aniónico y su expresión es ubicua²⁰⁹. Los FRs, constituyen una familia génica de cuatro transportadores (FR- α , FR- β , FR- γ y FR- δ) que difieren en su distribución celular y selectividad por el ligando^{205,210}. FR- α y FR- β , codificados por los genes *FOLR1* y *FOLR2*, y, anclados a la membrana celular por un dominio glicosilfosfatidilinositol (GPI), median la internalización de folatos por un mecanismo de endocitosis tanto a pH ácido como neutro^{206,210,211}. FR- α se expresa en el epitelio celular, mientras que expresión de FR- β se restringe a células mieloides^{87,103,210,212}.

Una vez en el interior celular, los cofactores de THF sufren un proceso de poliglutamilación mediado por la enzima folil- γ -poliglutamato sintasa (FPGS). Esta enzima cataliza la adición secuencial de residuos de ácido glutámico al grupo γ -carboxil de la molécula de folato. Una de las funciones de

la poliglutamilación es aumentar la retención intracelular de los cofactores de THF. La adición de residuos de glutamato aumenta la carga negativa de la molécula y los polianiones de THF son incapaces de atravesar la bicapa lipídica por difusión pasiva²¹³⁻²¹⁵. Además, cofactores de THF con más de tres residuos de glutamato (poliglutamatos de cadena larga) no son sustratos de los sistemas de transporte MRP1-5 y ABCG2^{216,217}. La poliglutamilación también afecta a la actividad biológica de los folatos, ya que los poliglutamatos de THF presentan mayor afinidad por las enzimas implicadas en el FOCM que en forma de monoglutamato²¹³⁻²¹⁵.

El proceso de poliglutamilación es revertido por la enzima γ -glutamil hidrolasa (GGH) que cataliza la hidrólisis de los residuos terminales de glutamatos de folatos²¹⁸. La salida celular del folato está mediada por transportadores dependientes de ATP, también conocidos como transportadores ABC (*ATP-binding cassette*). En concreto, están implicados los transportadores ABCC1-5, también denominados MRP1-5 y el transportador ABCG2, también conocido como BCRP^{206,216,217,219}.

3.2. Metabolismo de folato

En el interior celular, los cofactores de THF funcionan como aceptores y donadores de unidades de un átomo de carbono (**Figura 12**). La primera fuente de unidades de un átomo de carbono es donada por el aminoácido serina a THF. Esta reacción reversible es catalizada por la enzima serina hidroximetiltransferasa (SHMT), resultando en la formación de glicina y 5,10-metilen-THF (5, 10-CH₂-THF). El 5,10-metilen-THF actúa como grupo donador de metilo para la reacción de la enzima timidilato sintasa (TS), que cataliza la conversión de deoxiuridina monofosfato (dUMP, también denominado uridilato) a deoxitimidina monofosfato (dTMP, también denominado timidina monofosfato o 5'-timidilato). El dTMP se fosforila subsecuentemente a deoxitimidina trifosfato (dTTP, también denominado timidina trifosfato), nucleótido precursor esencial para la síntesis de *ново* de pirimidinas. El producto de esta reacción es el DHF que es reciclado de manera cíclica a THF por la dihidrofolato reductasa (DHFR), enzima clave en el mantenimiento del *pool* citosólico de THF dependiente de NADPH^{195,198,199}.

Otra ruta metabólica en la que está implicado el folato es el ciclo de metilación. El 5,10-metilen-THF puede ser también sustrato de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) que cataliza su reducción junto con NADPH a 5-metil-THF (5-CH₃-THF), la forma más reducida del folato. 5-metil-THF es la forma fisiológica de ácido fólico mayoritaria en sangre, que se encuentra a una concentración entre 5-30 nM^{199,220}. 5-metil-THF actúa como sustrato para la enzima metionina sintasa cobalamina-dependiente (MetH) transfiriendo su grupo metilo a la homocisteína y resultando en la formación de metionina y THF. En esta reacción, como su propio nombre indica, es esencial la vitamina B12, ya que, la metionina sintasa requiere cobalamina como cofactor para metabolizar la homocisteína en metionina. A partir de ATP y metionina, la enzima metionina adenosiltransferasa (MAT) cataliza la formación de S-Adenosilmetionina (SAM/AdoMet) que actúa como principal donador de grupos metilo en múltiples reacciones celulares como la metilación residuos de citosina en las islas CpG del DNA, fosfolípidos e histonas, en el metabolismo de neurotransmisores o en la detoxificación de xenobióticos^{221,222}.

El cofactor de folato 5,10-metilen-THF también actúa como sustrato de la enzima 5,10-metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (MTHFD) del interior mitocondrial que cataliza su oxidación, en una reacción reversible dependiente de NAD(P)⁺-NAD(P)H, dando lugar a 10-formil-THF (10-CHO-THF). En el citoplasma, el 10-formil-THF interviene en la ruta biosintética de purinas actuando como sustrato de la enzima glicinamida ribonucleotido formiltransferasa (GARFT), para la formación del

anillo imidazol, y de 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido formiltransferasa (AICARFT o ATIC) que genera el intermediario de purinas inosina 5'-monofosfato (IMP). El 10-formil-THF puede ser, a su vez, reducido por MTHFD, junto con NADPH, para dar lugar a 5,10-metilen-THF y reutilizarse de manera cíclica ^{195,197}.

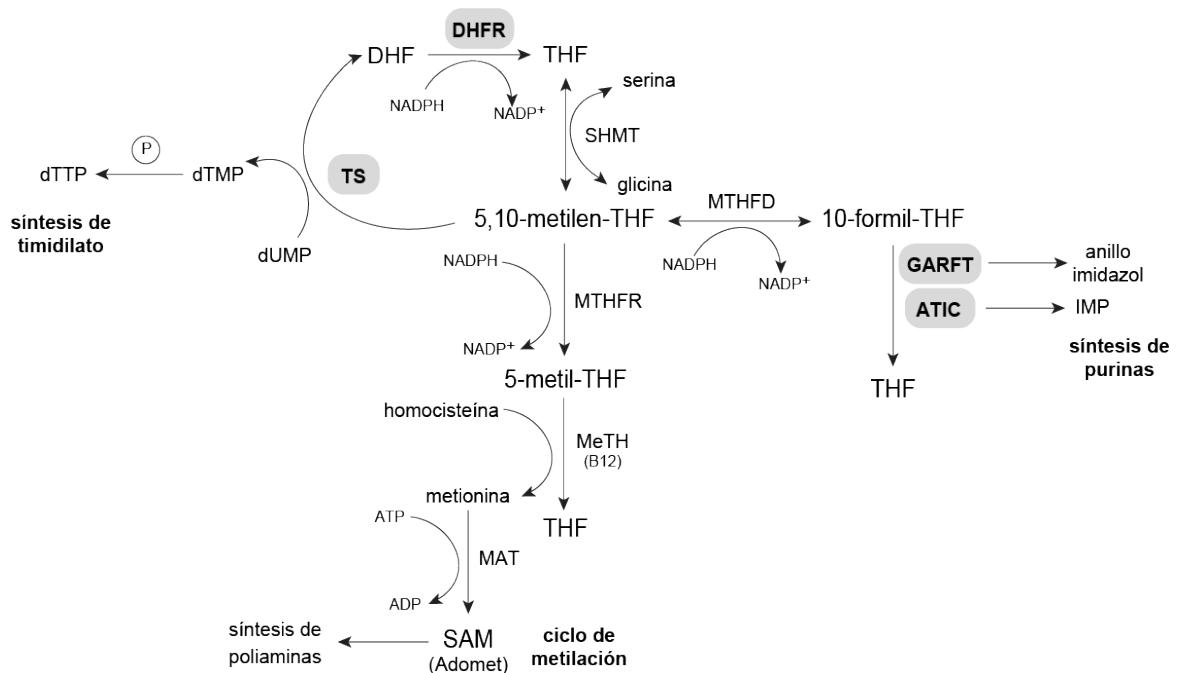


Figura 12. Metabolismo del folato simplificado. Adaptado de ^{195,197}.

Dada su implicación en la proliferación y supervivencia celular, la deficiencia en los niveles intracelulares de folato, metionina o vitamina B12 suponen consecuencias biológicas severas relacionadas con la hematopoyesis, la función cognitiva y el desarrollo embrionario ^{198,199,220}. En concreto, la deficiencia de folato se asocia con diferentes desórdenes como anemia megaloblástica, leucopenia, trombocitopenia y defectos congénitos en el tubo neural y formación de labio palatino ²²³⁻²²⁵.

4. Antifolatos: metotrexato y pemetrexed

4.1. Antifolatos

Los antifolatos son fármacos con capacidad citotóxica desarrollados como análogos estructurales del ácido fólico que actúan como antagonistas del mismo. Pertenecen al grupo de los *antimetabolitos*, fármacos empleados en quimioterapia que, debido a su similitud, compiten, inhiben o reemplazan a compuestos fundamentales del metabolismo intermediario celular (metabolitos), interfiriendo en la síntesis de ácidos nucleicos y frenando la replicación y proliferación celular. Los antifolatos se dividen generalmente en dos categorías: antifolatos con capacidad de poliglutamilación y antifolatos que no se poliglutamilan (Figura 13).

La concentración intracelular y el grado de poliglutamilación del antifolato es determinante para su actividad farmacológica y/o citotoxicidad. Tal y como ocurre con el THF, la poliglutamilación aumenta la retención intracelular y su afinidad, en este caso inhibición, por sus enzimas diana. Los derivados poliglutamilados de los antifolatos presentan una semivida intracelular más larga que se

traduce en una acción del fármaco prolongada y que, en muchos casos, acaba generando citotoxicidad^{194,226–229}. Alteraciones en los procesos de poliglutamilación y transporte intracelular de antifolatos (entrada deficiente y exceso salida) o en la expresión de enzimas diana son algunos de los mecanismos implicados en la generación de resistencia a antifolatos. Por ejemplo, la pérdida o disminución de la funcionalidad de FPGS, causada por mutaciones específicas y/o disminución de su expresión, resulta en una formación alterada y/o disminuía de antifolatos con capacidad de poliglutamilación^{230,231}. Los antifolatos no poliglutamilables son más estables que los anteriores al no ser hidrolizados por la GGH, evitan la toxicidad celular y la resistencia a antifolatos derivada de defectos en la FPGS¹⁹⁴.

Entre los antifolatos que se poliglutamilan encontramos el metotrexato (MTX) y el pemetrexed (PMX), empleados en el presente trabajo y descritos a continuación.

| Antifolato | Nombre comercial/sinónimo | Enzima diana |
|----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| <i>Poliglutamilados</i> | | |
| Metotrexato | MTX | DHFR, TS, GARFT, ATIC |
| Pemetrexed | Alimta/PMX/MTA/LY231514 | DHFR, TS, GARFT |
| Lometrexol | DDATHF | GARFT |
| Raltitrexed | Tormudex/ZD1694 | TS |
| <i>No poliglutamilados</i> | | |
| Plevitrexed | ZD9331/BGC9331 | TS |

Figura 13. Antifolatos poliglutamilados y no poliglutamilados. ATIC: 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido formiltransferasa; DHFR: dihidrofolato reductasa; GARFT: glicinamida ribonucleótido formiltransferasa; TS: timidilato sintasa. Adaptada de¹⁹⁴.

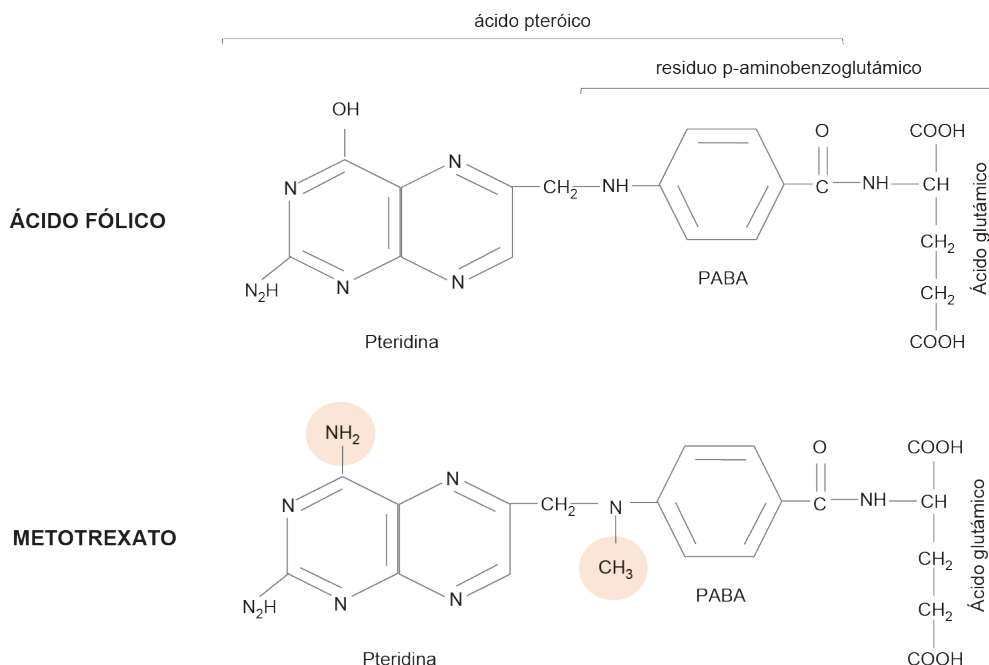
4.2. Metotrexato

El metotrexato (MTX) es un análogo estructural al ácido fólico con las siguientes modificaciones: el grupo 4 hidroxilo del anillo pteridínico del ácido fólico se ha reemplazado por un grupo amino y el N10 está metilado (**Figura 14**). Estas modificaciones fueron diseñadas inicialmente para permitir que el MTX presentase mayor afinidad por la DHFR que el ácido fólico^{194,232}.

4.2.1. Origen e historia del MTX

La aminopterina (AMT), derivado 4-amino del ácido fólico, fue el primer antifolato sintetizado con fines terapéuticos en 1947. Dado el papel que tienen los folatos en la proliferación celular, se propuso que este fenómeno podía revertirse empleando un compuesto capaz de bloquear el efecto del ácido fólico. El tratamiento con AMT resultó efectivo como terapia frente a la leucemia aguda infantil en 1948 y supuso el comienzo de la terapia oncológica²³³. Un año más tarde de la síntesis de la AMT se sintetiza el metotrexato (también conocido como amethopterina), homólogo a AMT pero de mejor índice terapéutico y menor toxicidad. Ambos fármacos se desarrollaron por *Yellapragada Subbarow* en la Universidad de Harvard. El MTX se emplea inicialmente como fármaco antitumoral en leucemias por sus efectos antiproliferativos. En la década 1960-70 se comienza a extender su uso como fármaco inmunosupresor en el tratamiento de psoriasis severa, pero no es hasta 1980 cuando se demuestra su eficacia antiinflamatoria tras el desarrollo del primer ensayo clínico con dosis bajas MTX en pacientes con artritis reumatoide (AR) severa²³⁴. A partir de entonces, se continúan realizando estudios rigurosos testando su eficacia como fármaco antiinflamatorio^{234,235} hasta que,

en 1988, la FDA (*US Food and Drug Administration*) aprueba su uso en pacientes con AR ²³⁶. Desde entonces el uso del MTX oral se ha ido incrementando progresivamente hasta llegar a implantarse como terapia de referencia en AR y extendiéndose a otros tipos de artropatías inflamatorias y enfermedades inflamatorias crónicas. En 2013 y 2014 la FDA aprueba dos fórmulas parenterales para su uso en AR, que permiten una mayor biodisponibilidad del fármaco que su administración oral ²³².



Nomenclatura IUPAC: Ácido (2S)-2-[[4-[(2,4-diaminopteridin-6-il)metil-metilamino]benzoil]amino]pentanodioico

Fórmula molecular: $C_{20}H_{22}N_8O_5$ Peso molecular: 454.4 kDa

Figura 14. Estructura química del ácido fólico y metotrexato. Se indican características químicas de la molécula de MTX. Adaptado de ²³².

4.2.2. Indicaciones terapéuticas del MTX

El MTX es el fármaco antirreumático de primera elección en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) de inicio y establecida y está incluido dentro del grupo de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, FAME (en inglés DMARD, *Disease Modifying Antirheumatic Drug*). La SER (Sociedad Española de Reumatología), ACR (*American College of Rheumatology*) y EULAR (*The European League Against Rheumatism*) recomiendan comenzar el tratamiento con una dosis de MTX oral de 7.5-10 mg/semana, escalando hasta alcanzar una respuesta terapéutica, sin que exceda la dosis de 25-30 mg/semana ²³². Según las recomendaciones EULAR para el manejo de la AR actualizadas en 2019 ²³⁷ (**Figura 15**), el MTX debe formar parte de la estrategia terapéutica inicial en pacientes con AR activa, en todos aquellos que no hayan sido tratados anteriormente con ningún FAME. Su amplio perfil de seguridad y eficacia frente a otros FAMES (FAME sintético; ver *Introducción*, apartado 5.2.6, **Figura 32**) lo convierte en el fármaco de primera línea ^{232,237,238}. Para la utilización óptima del MTX como agente inductor de remisión en AR de inicio, se recomienda una escalada rápida de la dosis hasta alcanzar los 20 o 25 mg semanales a los 3-4 meses de iniciar el tratamiento ²³⁷. El tratamiento con MTX disminuye el dolor articular y el número de articulaciones inflamadas, mejora los parámetros analíticos de evolución y actividad de la enfermedad como FR, PCR o DAS28 (ver *Introducción*, apartado 5.2.5) y se asocia con una disminución significativa de las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 en suero ^{236,239,240}.

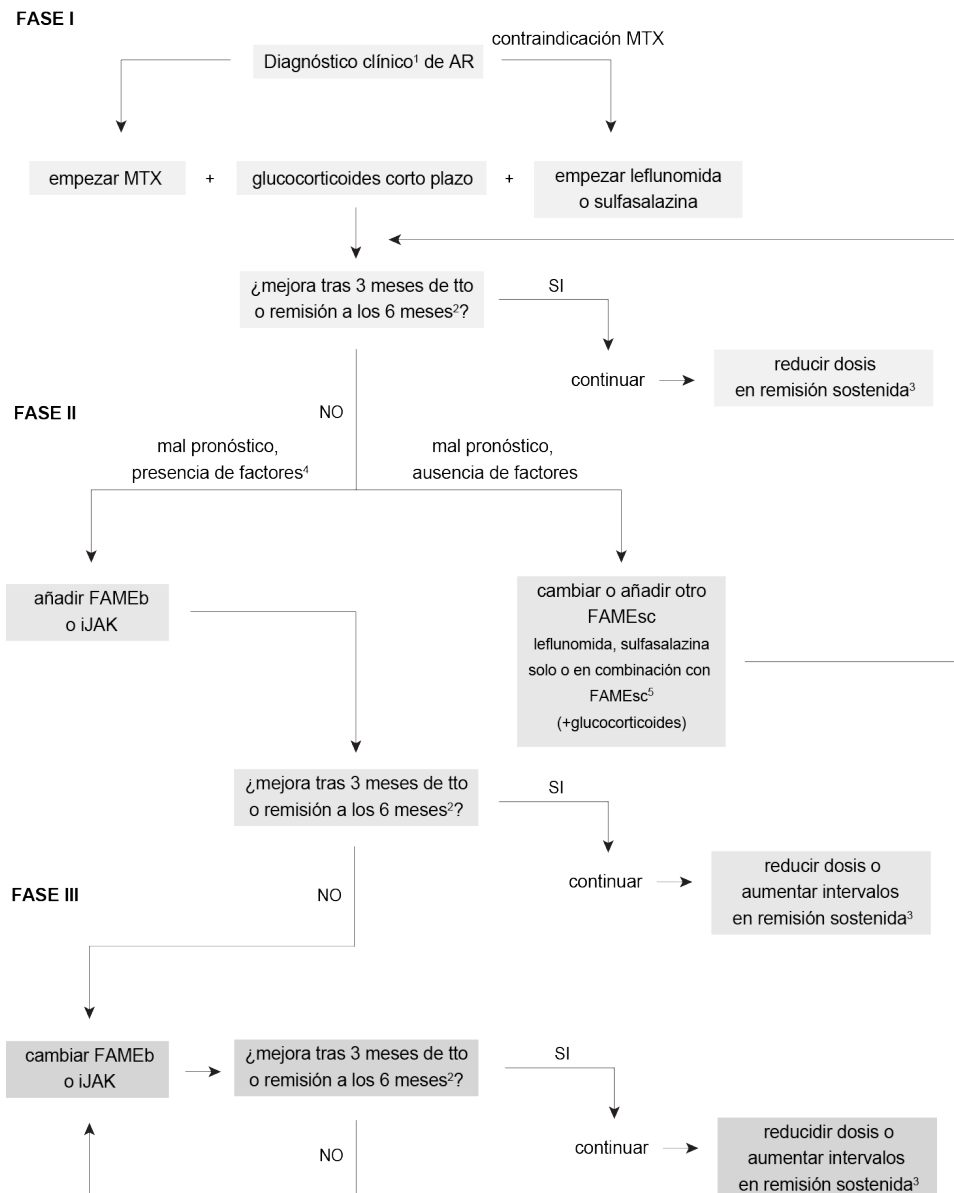


Figura 15. Recomendaciones EULAR para el manejo de la artritis reumatoide. Actualizadas en 2019. ¹Diagnóstico clínico según criterios de clasificación ACR (*American College of Rheumatology*) y EULAR (*The European League Against Rheumatism*) en 2010 ²⁴¹, se muestran en la **Figura 30**. ²Remisión de acuerdo con los criterios ACR-EULAR (criterios *Boolean* e índices de actividad). Si la remisión no se logra, al menos la actividad de la enfermedad tiene que disminuir. La terapia tiene que modificarse si a los 3 meses la actividad de la enfermedad no ha disminuido por lo menos un 50%. ³Remisión sostenida: duración de la remisión de la enfermedad (según criterios *Boolean* e índices de actividad) es igual o superior a 6 meses. ⁴Presencia de RF y/o ACPA, actividad de enfermedad alta, daño articular temprano, entre otros. ⁵La combinación más frecuente de FAMEsc son MTX, sulfasalazina e hidroxiquina. FAMEb: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad biológicos; FAMEsc: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos convencionales; iJAK: inhibidores JAK; tto: tratamiento. Adaptado de ²³⁷.

Aunque un 40% de los pacientes obtiene una respuesta ACR50, más de un tercio de los pacientes resultan refractarios a MTX ²³⁶ y alrededor de un 50% de los pacientes acaban generando resistencia al fármaco ²³¹. En caso de refractariedad (mala respuesta o intolerancia) al tratamiento, se debe asegurar su biodisponibilidad de forma subcutánea. Aunque el carácter teratogénico del MTX es dosis dependiente y a dosis menores de 15 mg semanales el riesgo de toxicidad es muy bajo, se utiliza de forma combinada con la administración oral de ácido fólico (5-10 mg) o ácido folínico (5 mg), 24 horas después, para reducir su toxicidad hepática y gastrointestinal, sin afectar su eficacia clínica. Cuando existen contraindicaciones o intolerancia al MTX, se consideran otros FAMEs como leflunomida o sulfasalazina ²³⁷. Aunque parámetros farmacocinéticos del MTX como los niveles de

poliglutamilación parecen asociarse a la actividad de la enfermedad, a excepción de los niveles de poliglutamatos de MTX (MTX-Pgl) en eritrocitos, se carece de biomarcadores de respuesta a MTX validados^{232,238}.

El MTX también se emplea en el tratamiento de otras enfermedades autoinmunes entre las que se incluyen la enfermedad de Crohn, psoriasis, artritis psoriásica, esclerosis múltiple, miastenia gravis o artritis idiopática juvenil poliarticular; y, forma parte de estrategias quimioterapéuticas que muestran eficacia frente a cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, leucemia linfoblástica aguda, osteosarcoma, cáncer de vejiga y coriocarcinoma^{229,230,234,242-244}. La dosis de MTX varía en función del tipo de enfermedad, mientras que la dosis de MTX en AR o APs, considerada como dosis baja (LDMTX, *low-dose MTX*), varía entre 7.5-30 mg/semana; como fármaco antineoplásico, se emplean > 500 mg/m² a la semana, considerada como dosis alta (HDMTX, *high-dose MTX*)^{229,232,245}. En ambos casos, para reducir sus efectos adversos de toxicidad a largo plazo sin afectar a su eficacia terapéutica se administra ácido folínico (10-15 mg/m²) 24 horas después. Aun así, al ser un fármaco teratogénico, no se puede emplear durante el embarazo y se desaconseja su administración durante el periodo de lactancia.^{239,246}

4.2.3. Farmacología y farmacocinética del MTX en artritis reumatoide

El MTX se absorbe a nivel de yeyuno proximal por lo que su biodisponibilidad depende de la capacidad de absorción intestinal de cada individuo y de la dosis administrada, siendo 25 mg la dosis de absorción máxima²⁴⁷. Una vez absorbido, el MTX puede ser transformado por las bacterias intestinales a DAMPA (ácido 2,4-diamino-N-metilpteroico), pero este metabolito representa menos del 5% de la dosis administrada y apenas se detecta en orina o sangre. En el hígado, además de sufrir poliglutamilación, alrededor del 10% se transforma a 7-hidroxi-metotrexato (7'-OH-MTX) por acción de las enzimas aldehidooxidasa y xantinaoxidasa,²⁴⁸.

La poliglutamilación de MTX y la formación de 7'-OH-MTX limitan la biodisponibilidad de MTX al entrar en la circulación enterohepática^{245,249}. Una vez absorbido en el intestino y transportado al torrente sanguíneo, se distribuye a lo largo del cuerpo, siendo mayor su distribución en articulaciones inflamadas que en las normales²³⁶. La máxima concentración (C_{max}) plasmática de MTX difiere entre 0.3-1.6 μmol/L y tiene lugar entre 0.75-2 horas después de su administración^{229,248} (**Figura 16**). El MTX tiene una vida media de 6 horas en sangre, siendo indetectable en suero después de 18 horas^{249,250}. Se excreta en orina en su forma nativa y en pequeñas dosis en forma de 7'-OH-MTX vía biliar^{245,248}. Los MTX-Pgl se detectan en tejidos durante semanas²⁵¹.

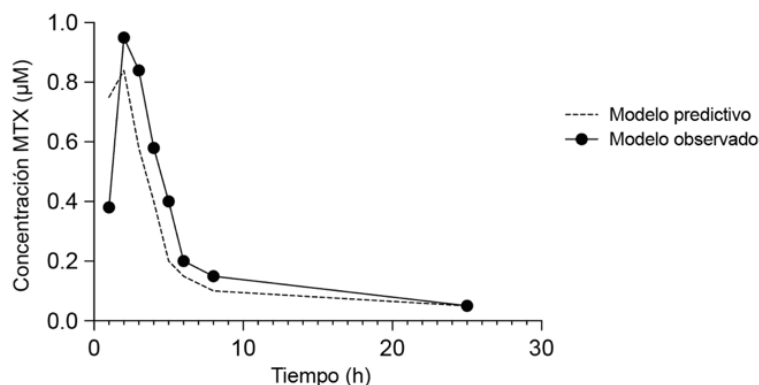


Figura 16. Farmacocinética de MTX en pacientes con artritis reumatoide. Modelo representativo predictivo (---) y observado (-) de la concentración de metotrexato (μM) en plasma respecto al tiempo (h). Adaptado de²⁴⁹.

4.2.4. Metabolismo celular del MTX

La mayor ruta de entrada del MTX al interior celular se produce vía RFC ^{252,253} y, dado que éste es ubicuo, todas las células son susceptibles de internalizar MTX. También puede ser transportado por PCFT ²⁰⁷ y, en mucha menor extensión, por FR- α y FR- β ²⁵⁴. Se han descrito diferentes polimorfismos genéticos en los transportadores de folato que provocan diferencias significativas en el proceso de absorción intracelular de MTX e interfieren en su eficacia farmacológica ^{230,231}. Una vez en el interior celular, al igual que ocurre de forma natural con los folatos, el MTX puede actuar como sustrato de la FPGS, lo que conlleva la formación de derivados de MTX con hasta 6 residuos glutamatos (**Figura 17**). Los MTX-Pgl de más de tres residuos de glutamatos no son sustratos de los exportadores ABCC. La poliglutamilación de MTX aumenta la carga negativa de la molécula, su retención intracelular y su eficacia farmacológica. El MTX en forma nativa o monoglutamato se considera una pro-droga que tras la bioactivación intracelular da lugar a la forma activa del fármaco, MTX-Pgl. La poliglutamilación de MTX es revertida por la enzima GGH, lo que facilita su salida del interior celular mediante los transportadores ABCC1-5 y ABCG2, además del RFC, al ser éste bidireccional ^{218,219}.

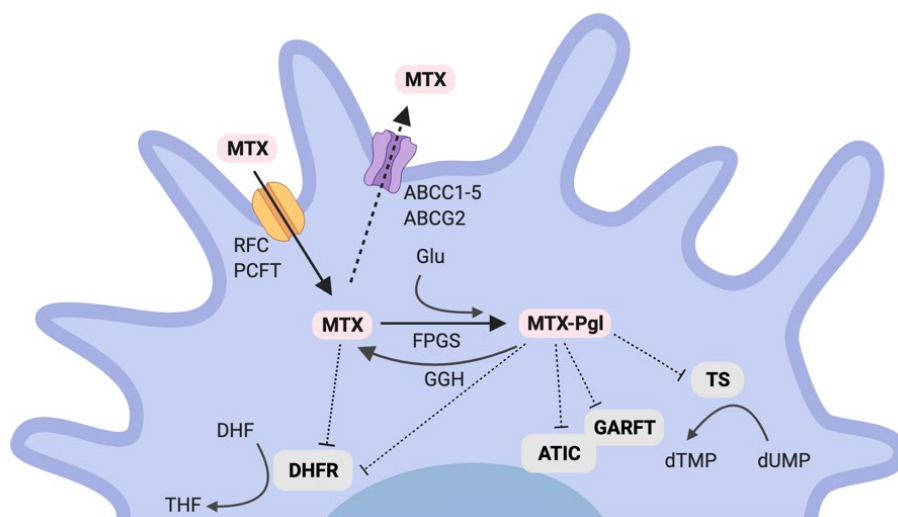


Figura 17. Metabolismo celular del MTX simplificado.

Farmacológicamente, como antagonista del ácido fólico, el MTX inhibe a la DHFR, lo que implica una acumulación de DHF y una disminución de THF y, como donador de unidades de carbono del OCM, esto se traduce en una disminución de las reacciones metabólicas dependientes de THF y sus derivados. La disminución del *pool* de THF intracelular afecta a la disponibilidad de 5,10-CH₂-THF, sustrato de MTHFR, por lo que esta enzima también se inhibe de forma indirecta. MTX-Pgl es un potente inhibidor de TS, ATIC y GARFT y, aunque la poliglutamilación del MTX aumenta su afinidad por estas enzimas, la especificidad por la DHFR es similar entre su forma nativa, en monoglutamato, y poliglutamilada ^{226,227,238,255}. La TS representa la única fuente intracelular de TMP de *novo*, por lo que la inhibición de esta enzima disminuye la producción de dTMP, generando una deficiencia en timidilato y un desbalance en el *pool* de nucleótidos. La inhibición de ATIC se traduce en una disminución de IMP y, secundariamente, ATP, ambos esenciales para la síntesis de purinas. Debido a estas actividades, el MTX inhibe la síntesis de *novo* de pirimidinas y purinas, síntesis de aminoácidos y metilación, impidiendo la replicación y reparación del DNA e induciendo la muerte celular por apoptosis ^{194,229,232}. Aunque dichos efectos, mediados por sus propiedades como antifolato, pueden contribuir a la disminución de la proliferación y al aumento de la apoptosis de las células responsables de la inflamación del sinovio de pacientes con artritis reumatoide, se han postulado otros mecanismos que explicarían la acción antiinflamatoria del fármaco como la restauración de la

expresión de genes del metabolismo del folato alterados en AR, liberación extracelular de adenosina, inhibición de la producción de poliaminas o el desacoplamiento de la enzima óxido nítrico sintasa^{229,232,238}, que se describen a continuación. Por otro lado, dado que la suplementación de ácido fólico o ácido folínico tras el tratamiento con MTX previene sus efectos tóxicos pero no modifica su efecto como fármaco antiinflamatorio, se sugiere que su mecanismo de acción en AR no está ligado a sus efectos antiproliferativos.

4.2.5. Mecanismo de acción del MTX en artritis reumatoide

A diferencia de su mecanismo de acción como fármaco antiproliferativo en células tumorales, el mecanismo de acción del MTX como fármaco antiinflamatorio en artritis reumatoide no está del todo caracterizado. En ese mismo sentido, se desconocen las razones de resistencia y falta de respuesta clínica a MTX en algunos pacientes y no se conocen marcadores de respuesta a MTX de utilidad clínica^{229,231}. A continuación, se describen los principales mecanismos de acción propuestos:

a) Aumento de los niveles extracelulares de adenosina

La inhibición de ATIC por MTX-Pgl induce la acumulación intracelular de 5-aminoimidazol-4-carboxiamida ribonucleótido (AICAR) y la disminución de 10-formil-AICAR (FAICAR) (**Figura 18**). AICAR inhibe las enzimas AMP desaminasa (AMPDA) y adenosina desaminasa (ADA), que induce la liberación al medio extracelular del nucleótido adenina que se convierte en adenosina por la acción de las enzimas ectonucleosido trifosfato disfosforilasa-1 (NTPDasa 1 o CD39) y ecto-5'-nucleotidasa (ecto-5'-NT o CD73) de la superficie celular. La adenosina se une a receptores específicos acoplados a proteínas G de superficie celular (ADORA: A_{1a}, A_{2a}, A_{2b} y A₃) de diversas poblaciones celulares actuando como un potente mediador endógeno antiinflamatorio y suprime reacciones inmunitarias e inflamatorias^{229,232,256}.

La hipótesis de que la adenosina media el efecto antiinflamatorio del MTX a través de estos receptores se apoya en modelos *in vitro* y modelos animales de enfermedad, donde dosis bajas de MTX, como las empleadas en AR, reducen los niveles intracelulares de glutatión y aumentan la adenosina liberada al tejido inflamado²³⁸. Estudios con ratones deficientes de A_{2a}, A₃ y CD37 describen como el MTX no disminuye la inflamación^{229,231,238}. En otros modelos de artritis *in vivo*, el efecto antiinflamatorio del MTX se revierte en presencia de antagonistas no selectivos de receptores de adenosina como cafeína y teofilina y en presencia de un antagonista selectivo del receptor A_{2a}^{232,238}.

La vida media de la adenosina en sangre es muy corta (medida en segundos) lo que dificulta la medición de su concentración en fluidos biológicos. El metabolismo rápido de la adenosina se debe a su rápida captación por los receptores celulares ADORA y su degradación a inosina por ADA presente en plasma. Por ello, demostrar la implicación de la adenosina en el efecto antiinflamatorio del MTX en pacientes con enfermedades inflamatorias resulta complejo y la medición se realiza de forma indirecta a través de sus receptores²³². En relación con la AR, está descrita la sobreexpresión de ADORA en células inmunes de pacientes^{257,258} y la expresión de A_{2a} y A_{2b} en células sinoviales es mayor en pacientes en tratamiento con MTX en comparación con pacientes sin tratar²⁵⁹. Además, los niveles de expresión de la enzima ADA en el líquido sinovial y suero son mayores en pacientes con AR en comparación con pacientes con osteoartritis²⁶⁰ y se sugiere la correlación de los niveles de ADA en suero con el grado de actividad de la enfermedad en AR²⁶¹. Sin embargo, también existen

datos contradictorios respecto a la hipótesis de la adenosina. Observaciones clínicas sugieren que la cafeína reduce la respuesta terapéutica a MTX en pacientes con AR pero en un amplio estudio retrospectivo, el consumo de diferentes dosis de cafeína no se asocia con una menor eficacia del tratamiento con MTX ^{229,232}.

La producción y liberación de adenosina se ha propuesto como uno de los mecanismos implicados en la disminución de la inmunidad celular e inflamación por células Treg. Menores niveles de expresión de CD39 se asocian con peor una respuesta a MTX en pacientes con AR y tras el tratamiento con MTX se ha descrito un aumento de expresión de CD39, potenciando la generación de adenosina por Treg ^{232,238}. También se ha descrito que la acción antiinflamatoria de MTX podría estar relacionada con su capacidad de inhibir el factor de transcripción NFκB en fibroblastos de forma adenosina-dependiente, dado que NFκB es el regulador central de la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias ^{229,262}, y, con la capacidad de la adenosina de promover la transición de macrófagos con fenotipo proinflamatorio o M1 hacia un fenotipo antiinflamatorio o M2 e inhibir la expresión de citoquinas ^{232,256}. Aun así, los datos con respecto a la hipótesis de adenosina son contradictorios y no pueden explicar todos los efectos beneficiosos del MTX como fármaco inmunomodulador y antiinflamatorio en AR.

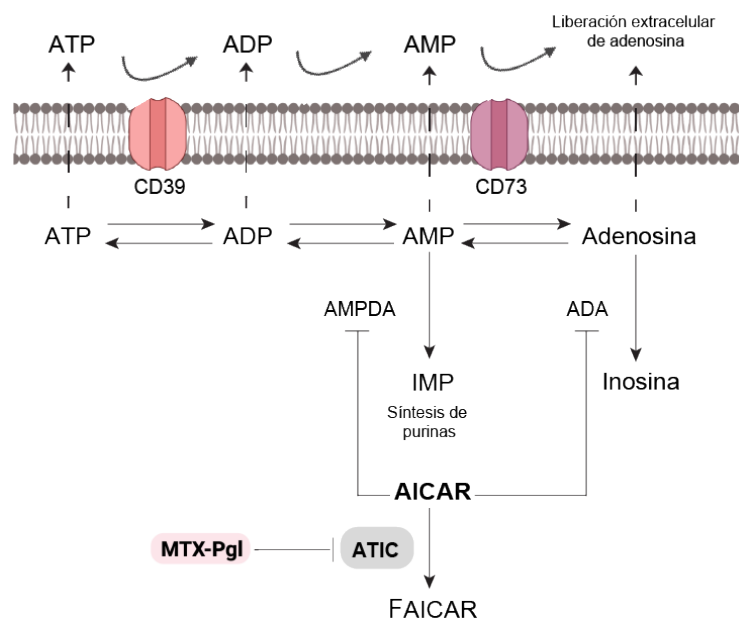


Figura 18. MTX induce la liberación de adenosina extracelular. Esquema simplificado adaptado de ^{232,238}

b) Desacoplamiento de la enzima óxido nítrico sintasa y producción de ROS

En linfocitos T, la DHFR, además de la reducción del DHF, también cataliza la reducción de dihidrobiopterina (BH₂) a tetrahidrobiopterina (BH₄), que actúa como cofactor de un gran número de enzimas entre las que se encuentra la óxido nítrico sintasa (NOS). La inhibición de la DHFR por parte del MTX implica la inhibición de formación de BH₄, cuya consecuencia es una disminución en la producción de óxido nítrico y un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ^{229,232}. Elevadas concentraciones de ROS se asocian con una activación de JNK y del factor de transcripción AP-1 que induce la apoptosis celular (Figura 19) ^{232,238}.

c) Aumento de la expresión de *lincRNA-p21*

Recientemente se ha descrito como el MTX es capaz de regular la expresión de algunos RNAs largos intergénicos no codificantes (*lincRNA*, *long intergenic non-coding*), entre ellos *lincRNA-p21*, codificado por un gen adyacente a *CDKN1A* (codifica para la proteína p21) que regula una gran variedad de procesos inmunitarios críticos e inflamatorio^{229,232}. *LincRNA-p21* se induce por p53, como respuesta al daño al DNA, y el MTX induce p53²³². Además, mientras que los niveles de p53 y *lincRNA-p21* están disminuidos en pacientes con AR, éstos se reestablecen durante la terapia con MTX²⁶³.

En linfocitos T, MTX activa proteínas quinasas dependientes del DNA (DNA-PK) que inducen un aumento de *lincRNA-p21*. *lincRNA-p21* inhibe la expresión de *RELA* (que codifica la subunidad p65 de NFκB) y disminuye los niveles de NFκB (**Figura 19**)^{229,232}. La inducción *lincRNA-p21* podría contribuir a la eficacia antiinflamatoria del MTX en linfocitos T de pacientes con AR, donde se ha descrito que NFκB se encuentra constitutivamente activo²⁶².

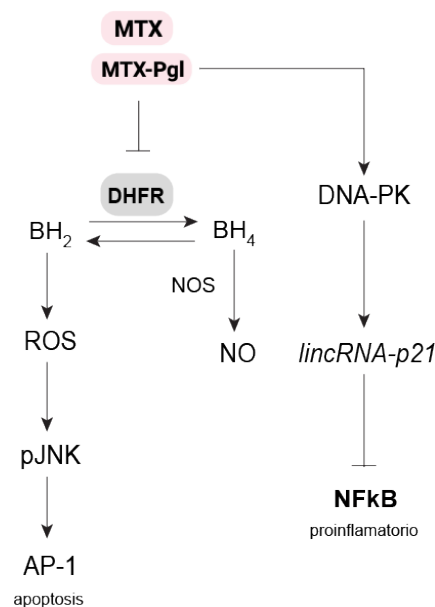


Figura 19. Mecanismo de acción del MTX en linfocitos T en artritis reumatoide. El desacoplamiento de la enzima óxido nítrico sintasa, la producción de ROS y el aumento de expresión de *lincRNA-p21* subyacen la acción antiinflamatoria del MTX en linfocitos T en AR. Adaptado de²³².

d) Interferencia con la donación de grupos metilo: disminución de acumulación de poliaminas

La inhibición de DHFR por MTX resulta en una disminución del *pool* de folato intracelular y de las reacciones de metilación que afecta a la ruta de síntesis de poliaminas, como espermina y espermidina, moléculas implicadas en crecimiento y proliferación celular. Las poliaminas se acumulan en células mononucleares, orina y tejido y líquido sinovial de pacientes con AR y su hidrólisis por monocitos resulta en la producción de amonio y H₂O₂ que contribuyen al daño articular. Por ello, la inhibición de la síntesis de poliaminas se relaciona con un menor daño del tejido sinovial de AR^{229,231,232}. Sin embargo, el uso de 3-deaza-adenosina, un inhibidor directo de la transmetilación, como terapia para AR, no resulta efectivo en la enfermedad^{232,238}. Esto sugiere que la disminución

de las reacciones de metilación y síntesis de poliaminas presenta un papel poco relevante en el mecanismo de acción de MTX como fármaco antiinflamatorio.

4.2.6. Mecanismo de acción de MTX en macrófagos

Estudios previos de nuestro grupo de investigación han descrito como los macrófagos presentes en el líquido y tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide presentan un perfil de polarización proinflamatorio e inmunostimulador semejante al de macrófagos *in vitro* diferenciados en presencia de GM-CSF (GM-M \emptyset)⁹⁹. La respuesta a MTX en macrófagos *in vitro* depende del estado de polarización del macrófago, está mediada por p53 y correlaciona con el nivel de expresión de la enzima timidilato sintasa (TS). En concreto, los macrófagos polarizados con GM-CSF que expresan la TS (GM-M \emptyset TS⁺) son susceptibles a MTX, mientras que macrófagos diferenciados en presencia de M-CSF que expresan bajos niveles de TS (M-M \emptyset TS⁻) y monocitos son refractarios a MTX. La inhibición de TS por MTX en GM-M \emptyset resulta en la disminución de deoxitimidina que deriva a la activación de p53 e induce la expresión de *CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15*¹⁹¹, genes diana de p53^{264,265}. La determinación del perfil de expresión génica inducido por MTX en GM-M \emptyset indica que el fármaco es capaz de inducir cambios génicos parcialmente similares a los inducidos por LPS en este tipo de macrófagos¹⁹¹.

Estos datos han permitido diseccionar el mecanismo de acción *in vitro* de MTX: el MTX es capaz de condicionar a GM-M \emptyset a la adquisición de un estado de tolerancia inmunológica frente a estímulos proinflamatorios. En consecuencia, macrófagos preestimulados con MTX responden de forma atenuada a patógenos (LPS, LTA), TNF- α e incluso al líquido sinovial de pacientes con AR, disminuyendo la producción de citoquinas proinflamatorias, lo que contribuye a la acción antiinflamatoria del fármaco (Figura 20)¹⁸⁶.

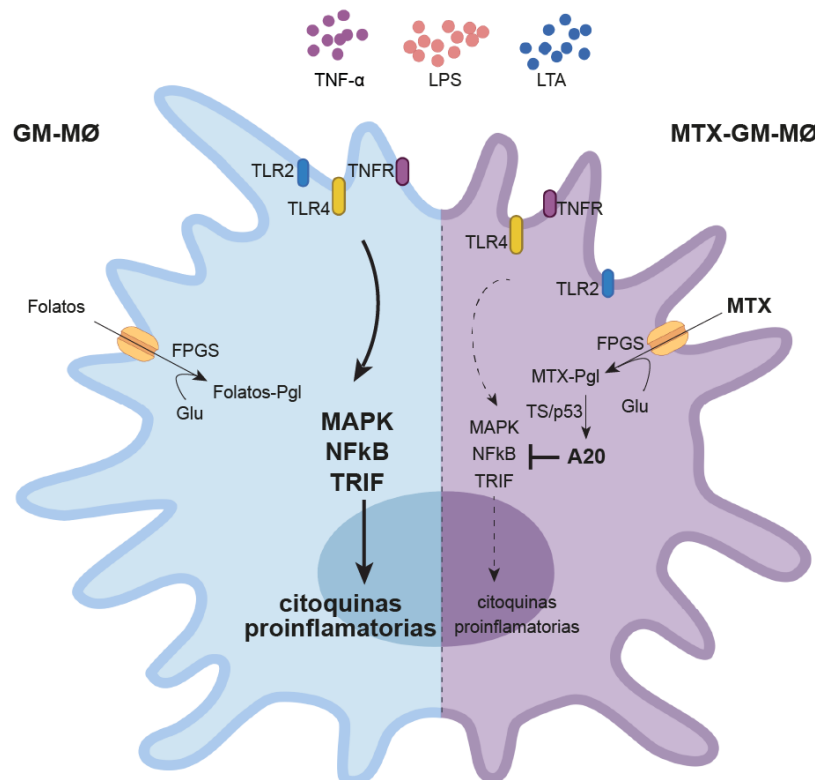


Figura 20. Mecanismo de acción de MTX en GM-M \emptyset *in vitro*. La acción antiinflamatoria del MTX es consecuencia de su capacidad para inducir un estado de *tolerancia cruzada* a estímulos proinflamatorios como LPS, LTA y TNF- α en GM-M \emptyset ¹⁸⁶.

Mecanísticamente, el MTX aumenta la expresión de *TNFAIP3*, gen que codifica para la proteína A20, regulador negativo de la señalización de NFκB y descrito como gen de susceptibilidad en AR^{266,267}. La relevancia fisiológica de estos resultados se apoya en muestras de pacientes con AR, donde la expresión de *TNFAIP3* en PBMCs es mayor en pacientes que responden a la terapia con MTX¹⁸⁶.

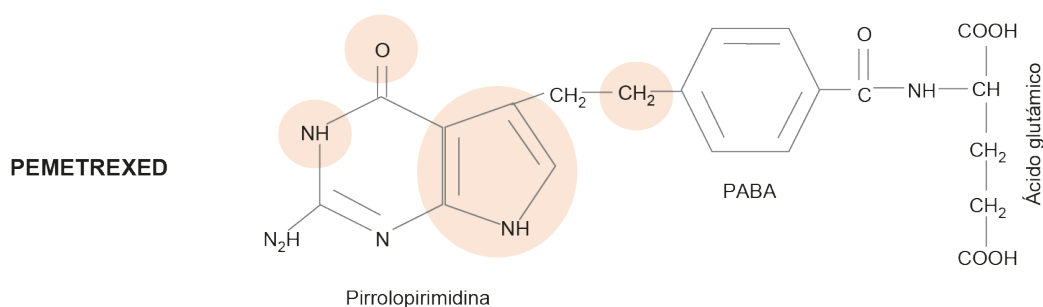
Estos resultados dan pie al desarrollo del primer objetivo de la tesis doctoral que ha consistido en verificar *ex vivo* la hipótesis de que la acción antiinflamatoria de MTX deriva de su capacidad de inducir un estado inmune de tolerancia, ya observada *in vitro* en GM-MØ, en sujetos sanos y determinar la cinética de los efectos de memoria inmune innata inducidos por MTX. Para ello, se ha realizado el Ensayo Clínico en Fase I “*Estudio de la acción tolerogénica de metotrexato sobre macrófagos como mecanismo de acción en enfermedades mediadas por mecanismos inmunes*” (número EudraCT: 2017-002902-11; código METOMAC).

4.3. Pemetrexed

El pemetrexed (PMX) es un antifolato multidiana que ejerce su acción mediante la interrupción de procesos metabólicos dependientes del folato^{228,268,269} y se emplea como fármaco antineoplásico en cáncer de pulmón no microcítico, también conocido como cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), y mesotelioma pleural maligno^{270,271}.

4.3.1. Origen e historia del PMX

El pemetrexed se sintetizó en base al Lometrexol, un antifolato específico frente a enzima GARFT, modificando el anillo 5-deazapteridina por un anillo de pirrolopirimidina²⁷². Esta sustitución le permitió ser un inhibidor específico de la TS, mientras que disminuyó su capacidad inhibitoria hacia GARFT. Desarrollado por la farmacéutica *Eli Lilly and Company*, su nombre original fue *LY231514*, que más tarde se sustituyó por *pemetrexed* (**Figura 21**)^{228,272}.



PEMETREXED

Nomenclatura IUPAC: Ácido (2S)-2-[4-[2-(2-amino-4,7-dihidro-4-oxo-1H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il) etil]benzoil]amino]pentanodiaco

Fórmula molecular: C₂₀H₁₂N₅O₆ Peso molecular: 427.4 kDa

PEMETREXED DISÓDICO

Nomenclatura IUPAC: Sal disódica del Ácido N-[4-[2-(2-amino-4,7-dihidro-4-oxo-1H-pirrol[2,3-d]pirimidin-5-il) etil]benzoil]-L-glutámico heptahidratado

Fórmula molecular: C₂₀H₁₉N₅Na₂O₆ Peso molecular: 597.49 kDa Sinónimos del fármaco: *ALIMTA*, *MTA*, *LY231514*

Figura 21. Estructura y características químicas de la molécula de PMX y de su fórmula comercial, pemetrexed disódico. Adaptado de *Pubchem*.

En 2004, la FDA aprueba el PMX para el tratamiento de mesotelioma pleural maligno en aquellos pacientes en estados muy avanzados o en pacientes no candidatos para cirugía curativa o primaria ^{273,274}. En 2008, se aprueba su uso como fármaco de primera línea frente al NSCLC de histología no escamosa localmente avanzado o metastásico ²⁷⁰, y, un año después, se establece como terapia de mantenimiento en aquellos pacientes cuya enfermedad no ha progresado después de recibir cuatro ciclos de quimioterapia con platino (cisplatino o carboplatino) ²⁷⁰. Recientemente se ha descrito la combinación de PMX, platino y *pembrolizumab*, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-PD-1 que impide la unión de sus ligandos PD-L1 y PD-L2, en aquellos pacientes sin mutaciones tumorales positivas de EGFR o ALK con alta expresión de PD-L1. El PMX promueve la eficacia de la terapia dirigida contra anti-PD(L)1 y anti-PD(L)1 restaura la sensibilidad del tumor a PMX ^{275–277}.

4.3.2. Indicaciones terapéuticas del PMX

En la actualidad, las indicaciones terapéuticas aprobadas por la EMA (Agencia Europea del Medicamento) para el uso del PMX describen su uso como fármaco de primera línea en mesotelioma pleural maligno y cáncer de pulmón no micrócítico (NSCLC) de tipología no escamosa y como terapia de mantenimiento en NSCLC (Figura 22).

| Patología | Características | Régimen | Uso |
|------------------------------------|---|-------------------------|---------------|
| Mesotelioma pleural maligno | | | |
| | no resecable | combinación con platino | primera línea |
| NSCLC | | | |
| histología no escamosa | localmente avanzado o metastásico | combinación con platino | primera línea |
| histología no escamosa | sin progresión tras quimioterapia con platino | monoterapia | mantenimiento |

Figura 22. Indicaciones terapéuticas del PMX aprobadas por la EMA.

En ambos tipos de patologías, la dosis recomendada de PMX es de 500 mg/m², considerada como dosis alta, y se administra por infusión intravenosa el primer día de cada ciclo de quimioterapia (21 días) en combinación o no con platino (cisplatino o carboplatino). Para reducir la toxicidad de ambos agentes quimioterapéuticos se suplementa a los pacientes con ácido fólico y vitamina B12 ^{271,273,274}.

4.3.3. Metabolismo celular y mecanismo de acción del PMX

La entrada del PMX al interior celular es vía RFC y PCFT ²⁰⁷. El PMX es el antifolato con mayor afinidad por PCFT ^{207,228}. Una vez en el interior celular es sustrato de la FPGS y los derivados poliglutamilados de PMX (PMX-Pgl) presentan mayor retención intracelular y actividad inhibitoria frente a las enzimas del metabolismo del folato que en forma de monoglutamato (PMX) (Figura 23). La FPGS presenta una alta afinidad por PMX, lo que se traduce en una rápida poliglutamilación que comienza aun cuando el PMX está presente a concentraciones intracelulares muy bajas ²⁷⁸. La rapidez de acumulación de PMX-Pgl en el interior celular representa una ventaja farmacológica del PMX frente a otros antifolatos como el MTX, ya que prolonga el tiempo de inhibición de sus enzimas diana. En concreto, PMX compite con el folato inhibiendo la actividad de las enzimas TS, DHFR, GARFT ²²⁸, siendo su diana farmacológica principal la TS. Aunque existen pocos estudios, también se ha demostrado la capacidad inhibitoria de PMX por ATIC ²⁷⁹. La acción del PMX sobre estas enzimas, al igual que ocurre con el MTX, deriva en un desequilibrio en el *pool* de nucleótidos de timina y purina

celular, impidiendo la síntesis y reparación del DNA e induciendo muerte celular. Aunque no se han descrito diferencias en cuanto a su capacidad de inhibición de DHFR entre su forma nativa o PMX-Pgl₅ (pentaglutamatos de pemetrexed). PMX-Pgl₅ presentan mayor capacidad inhibitoria de la TS, GARFT y ATIC que su forma en monoglutamato ^{228,268,269}.

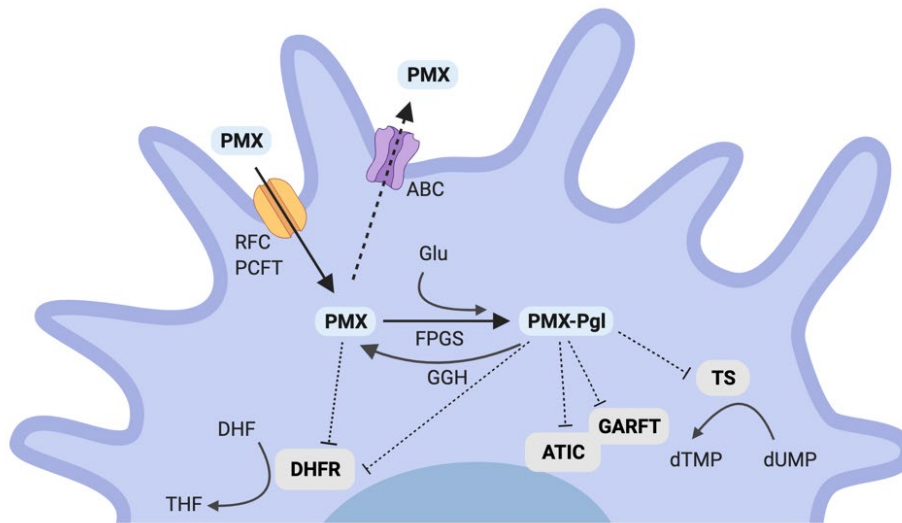


Figura 23. Metabolismo celular del PMX simplificado.

4.4. Comparación entre los antifolatos MTX y PMX

Aunque MTX y PMX forman parte del grupo de antifolatos que se poliglutamilan y ejercen una función similar en el OCM ¹⁹⁴, MTX y PMX difieren en varios parámetros (**Figura 24**) entre los que destacan los que se describen a continuación.

El primer parámetro que diferencia al PMX del MTX es su entrada al interior celular. La afinidad del RFC por PMX es superior a la afinidad por MTX ($K_m = 1.1 \mu\text{M}$ vs. $2\text{-}26 \mu\text{M}$) aunque la velocidad máxima (V_{max}) es comparable ²⁸⁰ y, a diferencia del MTX ($K_m = 2 \mu\text{M}$), el PMX es un excelente sustrato del PCFT ($K_m = 50 \text{ nM}$). La cinética de poliglutamilación de ambos antifolatos también es diferente. Esto se debe a que la afinidad de la FPGS por PMX es casi 100 superior a la afinidad de FPGS por MTX ($K_m = 0.8 \mu\text{M}$ vs. $166 \mu\text{M}$), lo que se traduce en una mayor capacidad y tiempo de inhibición de sus enzimas diana. Por último, el PMX tiene mayor capacidad inhibitoria de la TS que el MTX (PMX-Pgl₅ $K_i = 1.3 \text{ nM}$ vs. MTX-Pgl₅ $K_i = 47 \text{ nM}$). Aunque ambos antifolatos resultan en la inhibición de reacciones dependientes de THF, los efectos del MTX se logran principalmente por una depleción de cofactores celulares de THF al ser la DHFR su diana principal, mientras que el PMX actúa mediante un bloqueo directo de enzimas biosintéticas que dependen de cofactores del THF (como la TS) sin un efecto directo en el *pool* de THF intracelular ^{197,228,268,278-280}. Además, como se ha comentado anteriormente, las indicaciones terapéuticas de cada fármaco son diferentes. Aunque ambos antifolatos se emplean como agentes quimioterapéuticos en tumores de diferente etología, el MTX tiene uso exclusivo en AR.

En relación con todos estos datos, el segundo objetivo de la tesis doctoral consiste en evaluar la capacidad del antifolato PMX de promover un efecto antiinflamatorio en macrófagos. Hipotetizamos que, por analogía al mecanismo de tolerancia a endotoxina, y en comparación con macrófagos no expuestos a PMX, los macrófagos expuestos a PMX responderían de manera subóptima a una estimulación proinflamatoria subsecuente. Por ello, el segundo capítulo de este trabajo ha consistido en evaluar la capacidad de PMX de promover un estado de *tolerancia cruzada*

a LPS mediante el análisis del perfil transcripcional y funcional inducido por PMX en GM-MØ y determinar los mecanismos moleculares subyacentes.

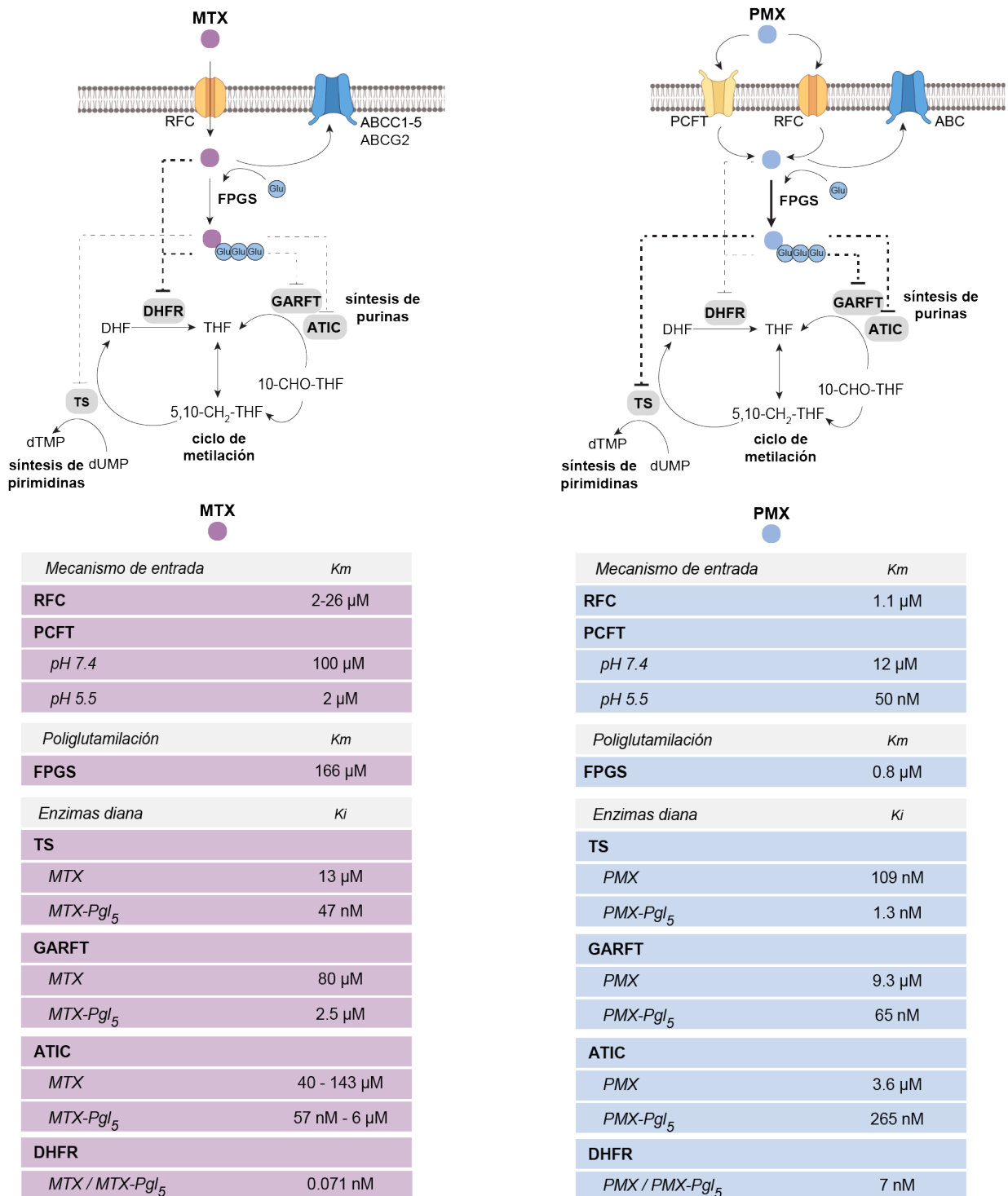


Figura 24. Comparación entre los antifolatos metotrexato y pemetrexed. Esquema representativo (arriba) de la entrada y salida intracelular, poliglutamilación e inhibición de enzimas diana dependientes de folato del metotrexato (MTX) y pemetrexed (PMX). Tabla comparativa (abajo) de las constantes de afinidad e inhibición de MTX y PMX en sus formas nativas (MTX, PMX) o en forma de pentaglutamatos (MTX-Pgl₅, PMX-Pgl₅) ^{197,228,268,278-280}.

5. Artritis

El término *artritis* hace referencia a la inflamación de una o más articulaciones e implica la degradación y destrucción de estructuras articulares como sinovio, cartílago y bursa, entre otros. La artritis comprende a numerosas enfermedades y afecciones reumáticas donde los síntomas comunes son dolor, rigidez e inflamación de la articulación y alrededores. La artritis se produce como consecuencia de una enfermedad autoinmune (artritis inflamatorias), fractura ósea, desgaste de articulaciones o infección por patógenos.

Las artritis inflamatorias, entre las que se incluyen la artritis indiferenciada (AI), artritis reumatoide (AR) y artritis psoriásica (APs), son un grupo de enfermedades reumáticas inflamatorias de carácter autoinmune que se inician por una pérdida de tolerancia inmunológica a antígenos propios. Esta desregulación implica que la inmunidad protectora se vuelva patogénica y ataque a las articulaciones. El desarrollo de la artritis inflamatoria implica tanto a células del sistema inmunitario adaptativo como a células del sistema innato. En la actualidad no existe un tratamiento que suponga la cura efectiva para la artritis inflamatoria, los tratamientos disminuyen el dolor y la rigidez y mejoran la movilidad articular.

5.1. Artritis indiferenciada

El término *artritis indiferenciada* (AI) se aplica a pacientes con artritis inflamatoria que no pueden clasificarse dentro de un diagnóstico específico de acuerdo con los criterios de clasificación de la AR^{241,281} o de la espondiloartritis (EA)²⁸², incluyendo la APs²⁸³. La AI se encuentra en la práctica clínica de la artritis de reciente comienzo con una prevalencia del 30-50% de los casos²⁸⁴ y esta variabilidad se explica por la ausencia de un consenso homogéneo en cuanto al tiempo de evolución. Aunque la mayoría de los autores limitan el término *artritis de reciente comienzo* a pacientes con menos de un año del primer cuadro de inflamación articular, hay estudios que incluyen pacientes con sintomatología de hasta 3 años^{284,285}.

La AI puede evolucionar a una enfermedad articular inflamatoria bien definida, resolverse espontáneamente o persistir indiferenciada. Tras un año de seguimiento, alrededor del 30% de pacientes progresan a AR; entre el 7-15% progresan a un tipo de EA periférica, principalmente APs²⁸⁶; y entre el 20-60% de pacientes se mantienen con una actividad persistente pero limitada de la enfermedad (AI persistente)²⁸⁴. Esta variabilidad en su evolución justifica la necesidad de búsqueda de biomarcadores de diagnóstico y clasificación temprana de pacientes con AI para discriminar entre aquellos que desarrollarán una artritis persistente como AR o APs y los que tendrán una patología autolimitada.

5.1.1. Presentación clínica y características generales de la artritis indiferenciada

El daño articular y el grado de actividad de la enfermedad resultan similares entre pacientes con AI y pacientes con AR de reciente comienzo con una duración de la enfermedad similar. La AI suele presentar menor deterioro de articulaciones de las manos, grado afectación articular simétrica y número de articulaciones tumefactas (NAT) global, así como, una duración de la rigidez matutina menor que AR. La respuesta de fase aguda medida a partir de velocidad de sedimentación globular (VSG) y proteína C reactiva (PCR) en pacientes con AI suele ser igual o menor que en AR, y la capacidad funcional, evaluada mediante el cuestionario de discapacidad (HAQ), mayor que pacientes con AR

^{285,287}. La presentación clínica más frecuente en los pacientes con AI que evoluciona a AR (AI-AR) es la poliartritis (inflamación de más de cuatro articulaciones); mientras que en aquéllos con afección oligoarticular (inflamación de cuatro o menos articulaciones) el diagnóstico más frecuente es el de una espondiloartropatía ²⁸⁵. A excepción de un estudio reciente que sugiere la expresión de genes inducibles por interferón MxA como biomarcador de progresión de AI a AR y un aumento en la densidad de fibroblastos y mastocitos en la progresión hacia APs ²⁸⁸, no existen marcadores de transición entre AI y las formas definidas de artritis, AR y APs.

En este sentido, el tercer capítulo de este trabajo aborda el análisis de la expresión y la fuente celular de producción de GM-CSF junto con el estado de polarización y la densidad de macrófagos en la cavidad sinovial de pacientes con artritis indiferenciada persistente y en diferentes fases de evolución (artritis indiferenciada con evolución a artritis reumatoide, AI-AR; y, artritis indiferenciada con evolución a artritis psoriásica, AI-APs) y en pacientes con las artritis inflamatorias establecidas más prevalentes (AR y APs) con el objetivo de identificar posibles biomarcadores distintivos de transición entre AI y artritis establecidas (AR y APs).

5.1.2. Diagnóstico y tratamiento de la artritis indiferenciada

El manejo de la artritis de reciente comienzo ha variado en los últimos años debido al desarrollo de nuevas terapias eficaces y nuevos conceptos en el diagnóstico. Las recomendaciones EULAR para el manejo de la artritis de reciente comienzo se publicaron en 2007 ²⁸⁹ y se han actualizado en 2016 ²⁹⁰ (**Figura 25**). El objetivo del tratamiento de la artritis de reciente comienzo es la remisión de la enfermedad y la prevención de la destrucción articular. Y en lo que compete a la AI, resulta clave para la estrategia terapéutica determinar si el paciente desarrollará un tipo de artritis erosiva y/o persistente o se mantendrá con una actividad limitada de la enfermedad que, incluso, pueda entrar en remisión de forma espontánea. Desde los primeros meses de evolución de la artritis se produce erosión y daño articular, por lo que si se espera a que un paciente cumpla los criterios de clasificación para comenzar con el tratamiento, en muchos casos, el daño resulta irreversible ²⁹¹. Por ello, en la valoración clínica de la AI resulta clave la determinación del pronóstico del paciente, si la artritis remitirá o persistirá, más que si cumple o no criterios de una determinada artritis.

Según las recomendaciones EULAR para el manejo de la artritis de reciente comienzo ^{289,290} tras determinar la presencia de artritis (inflamación articular con rigidez y/o dolor), evaluada por un reumatólogo en un plazo de 6 semanas desde el inicio de los síntomas, y tras descartar la presencia de una artritis definida, se consideran factores predictivos de la actividad persistente ²⁸⁵. Se han identificado varios parámetros clínicos y analíticos entre los que se encuentra la presencia de autoanticuerpos específicos de AR (FR y/o ACPA, ver *Introducción*, apartado 5.2.1) en serología, el grado de afectación articular (recuento de NAT y del número de articulaciones dolorosas, NAD), la duración de la sintomatología antes del diagnóstico inicial y presencia de reactantes de fase aguda (VSG y PCR), entre otros, que resultan claves para determinar el riesgo de desarrollar una forma de artritis persistente y/o desarrollar AR u otra artropatía definida ²⁹².

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son terapias sintomáticas eficaces que no modifican la patogenia, pero disminuyen la inflamación con mayor eficacia que los analgésicos comunes. Deben emplearse a la dosis mínima eficaz durante el menor tiempo posible y después de la evaluación de riesgos gastrointestinales, renales y cardiovasculares. Aunque no cumplan criterios de clasificación para una determinada enfermedad reumática inflamatoria, aquellos pacientes con

riesgo de desarrollar una forma persistente y/o erosiva de artritis deben comenzar el tratamiento con FAME, lo más pronto posible (idealmente en un plazo de 3 meses). El objetivo principal del tratamiento con FAMEs es lograr la remisión clínica y el control de la actividad de la enfermedad y eventos adversos. El MTX debe formar parte de la primera estrategia de tratamiento, a menos que exista contraindicación. Las inyecciones intraarticulares de glucocorticoides deben considerarse para el alivio de los síntomas locales de inflamación y aunque los glucocorticoides sistémicos reducen el dolor, hinchazón y progresión del daño articular, debido a la toxicidad y efectos secundarios acumulativos, deben ser utilizados a la dosis más baja necesaria como tratamiento adyuvante temporal (menor a 6 meses) ²⁹⁰.

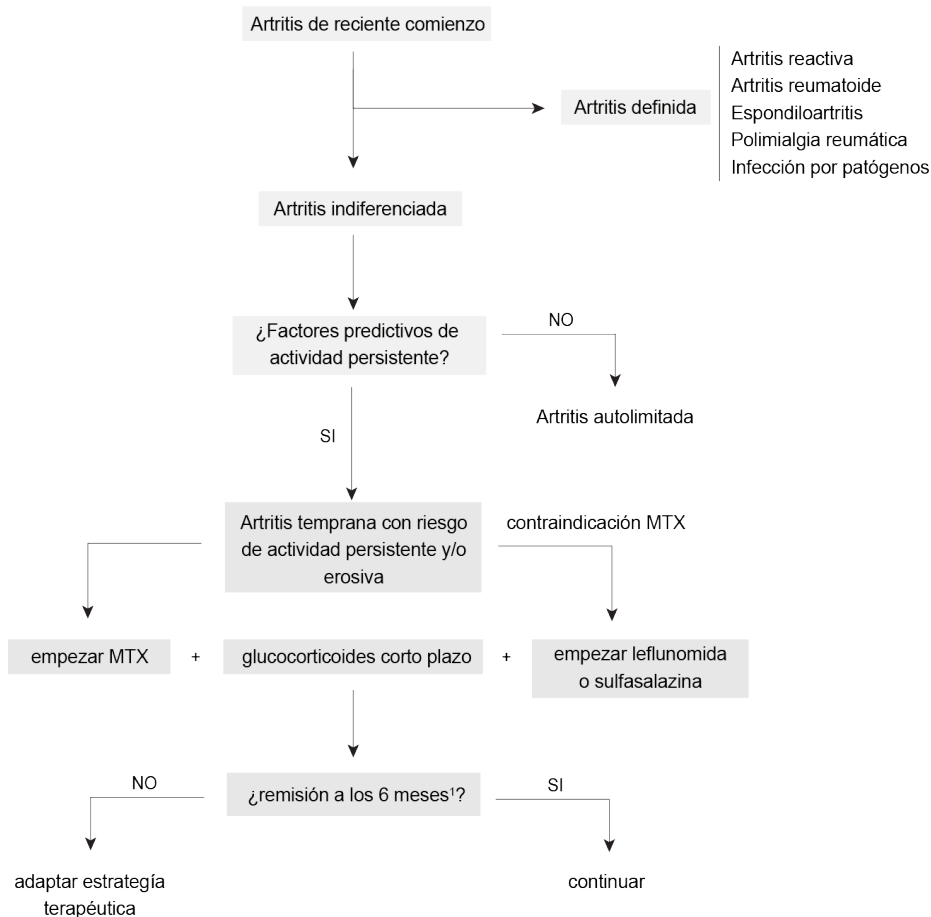


Figura 25. Recomendaciones EULAR para el manejo de artritis de reciente comienzo. Actualizadas en 2016. Una vez implantado el tratamiento, la monitorización de la actividad de la enfermedad debe hacerse cada 1-3 meses. ¹Remisión de acuerdo con los criterios ACR-EULAR ²⁹³. Si la remisión no se logra, al menos la actividad de la enfermedad tiene que disminuir. Adaptado de ²⁹⁰.

5.2. Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de curso lento y carácter autoinmune que actúa inicialmente a nivel articular con posible compromiso sistémico en su evolución ²⁹⁴. La alteración característica de la AR es una sinovitis (inflamación del tejido sinovial) poliarticular que afecta principalmente a las articulaciones periféricas de forma simétrica que acaba provocando la destrucción y deformidad de la estructura articular, osteoporosis yuxtaarticular y severa discapacidad funcional. La sintomatología inicial, además de la sinovitis persistente con dolor,

hinchazón y rigidez, incluye cansancio, fatiga, fiebre, astenia, pleuresía, rigidez matutina y dificultad para dormir ^{294,295}.

La AR es la enfermedad inflamatoria más frecuente de las enfermedades crónicas, autoinmunes y sistémicas, afecta casi al 1% de la población mundial y, según la Sociedad Española de Reumatología, tiene una prevalencia en España entre el 0.5-0.8% y una incidencia mayor en mujeres (3:1, mujeres-hombres) ^{291,295}. Se trata de una enfermedad con presentación clínica heterogénea. Los pacientes con artritis reumatoide pueden subdividirse conforme a diferentes criterios, uno de ellos es la presencia (AR seropositiva) o ausencia (AR seronegativa) de autoanticuerpos como factor reumatoide (FR) o anticuerpos anti-modificaciones postraduccionales de proteínas (AMPA) como anticuerpos antipeptido cíclico citrulinado (ACPA) ²⁹⁴.

5.2.1. Etiología, patofisiología y desarrollo de la artritis reumatoide

La etiología de la artritis reumatoide es compleja, multifactorial y parcialmente conocida. Incluye factores genéticos (genes susceptibles y modificaciones epigenéticas), ambientales, endocrinos (como el inicio de la menopausia o factores hormonales), factores derivados del sistema inmunitario (FR, AMPA) y agentes infecciosos (micoplasma, virus de Epstein Barr, citomegalovirus, parvovirus B19, virus de la rubeola y herpes), entre otros, que contribuyen a la patogenia y gravedad clínica ^{294,296}. Algunos de ellos se describen a continuación.

Los autoanticuerpos FR y los AMPA son los principales factores de la patogenia derivada por la respuesta inmune adaptativa. La citrulinación es una modificación postraduccional de proteínas caracterizada por la conversión de un residuo de arginina a citrulina. Esta reacción está catalizada por la enzima *PAD* o *PAID* (peptidil arginina deiminasa) en proteínas intracelulares (histonas) o proteínas de la matriz extracelular (vimentina, fibronectina, fibrinógeno, vimentina, enolasa y colágeno de tipo II). Los ACPA se generan en AR como respuesta autoinmune al péptido cíclico citrulinado. Los AMPA también incluyen anticuerpos contra modificaciones postraduccionales como carbamilación (ACarP) y acetilación (AAPA) ^{291,294}. El factor reumatoide o FR es un autoanticuerpo de tipo inmunoglobulina M (IgM) dirigido contra la región constante (Fc) de la inmunoglobulina G (IgG) humana. Aunque no es específico de AR y ocurre en el contexto de otras condiciones inflamatorias como la respuesta inmune frente a los complejos que contienen IgGs, la presencia de FR en sangre es la característica inmune clásica asociada a la AR y se detecta en el 60-80% de los pacientes ²⁹⁷. Tal y como se comentó anteriormente, los pacientes con AR pueden subdividirse conforme a la presencia (AR seropositiva) o no (AR seronegativa) de autoanticuerpos. La AR seropositiva constituye aproximadamente 2 de cada 3 casos de la enfermedad (70-80% de los pacientes con AR) y cursa con un desarrollo de la enfermedad más severo con mayor destrucción ósea y articular ²⁹⁸. Los autoanticuerpos ACPA y FR se emplean habitualmente para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad ^{237,241}. Por su parte, las AR seronegativas, se caracterizan por la ausencia de autoanticuerpos AMPA y/o FR pero pueden presentar otros anticuerpos. Aunque el grado de actividad de la enfermedad y la destrucción articular suele ser menor que en AR seropositivas, pueden desarrollar ACPA y FR con la evolución de la enfermedad y su diagnóstico cambiar a AR seropositiva ²⁹⁴.

Estudios genéticos han demostrado la existencia de más de 100 polimorfismos asociados al desarrollo y susceptibilidad de la enfermedad. La mayoría de los genes implicados en la predisposición al desarrollo de AR son los genes que codifican para las moléculas de

histocompatibilidad (MHC), específicamente polimorfismos en *HLA-DRB1*, loci del gen *HLA-DR* presente en células APC²⁹⁹. Los alelos de epítipo compartido *HLA-DRB1* positivos y variantes en el gen *PTPN22* se han asociado con un aumento de producción de FR y ACPA. También se han identificado otros genes susceptibles de polimorfismos asociados con la enfermedad como *STAT4*, *CTLA4*, *TNFAIP3* y *PADI4*^{266,294,299–301}. A su vez, la principal modificación epigenética que se ha relacionado con la enfermedad es la metilación en la región génica del MHC. También se han descrito acetilaciones y fosforilaciones en el genoma provocando una alta susceptibilidad a la enfermedad³⁰².

Respecto a los factores ambientales que contribuyen a la enfermedad se está estudiando activamente el papel del tabaquismo, la alteración en la microbiota intestinal y la gingivitis (*Porphyromonas gingivalis* que expresa *PADI4*). Estos factores pueden actuar como estresores y promover modificaciones epigenéticas y postraduccionales que inducen la transcripción de citoquinas proinflamatorias^{291,294,296,303}. Por ejemplo, se ha descrito que el tabaco y otras formas de estrés bronquial aumentan el riesgo de AR en personas con alelos *HLA-DR4* susceptibles³⁰⁴.

Actualmente, no se ha identificado ningún factor único y específico responsable de la enfermedad. Se entiende que la interacción de alguno de estos determinantes desencadena el escenario inflamatorio sinovial y contribuyen al desarrollo de la enfermedad en el individuo con predisposición. La interacción entre factores genéticos y ambientales junto con modificaciones epigenéticas y postraduccionales desencadenan una pérdida de tolerancia inmune que induce autoinmunidad (**Figura 26**)^{294,295}.

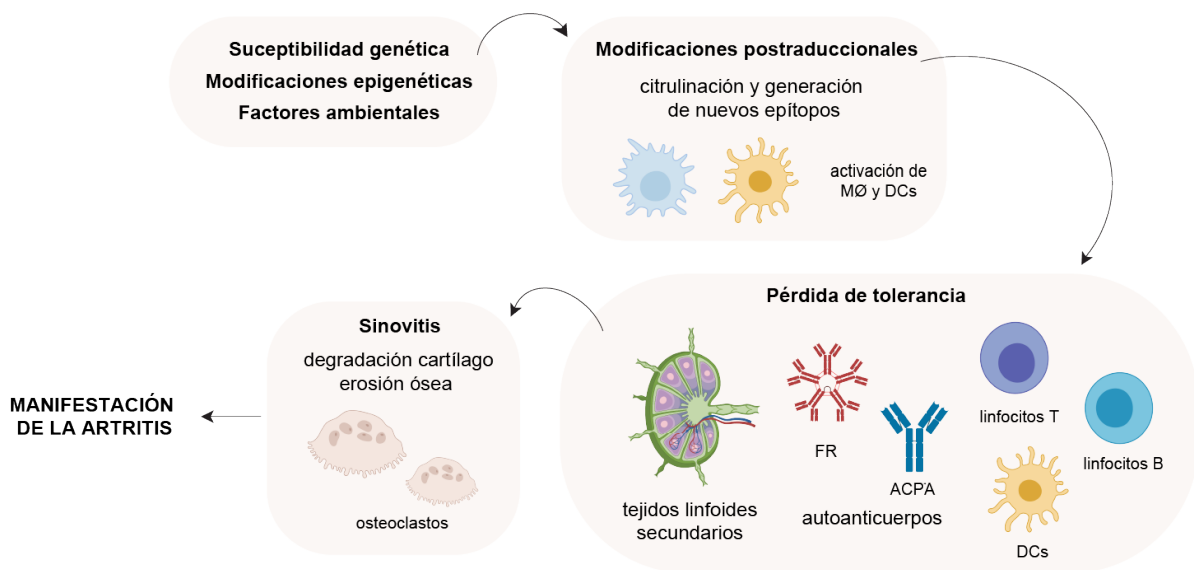


Figura 26. Factores implicados en el inicio y progresión de la artritis reumatoide. ACPA: anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados; DCs: células dendríticas; FR: factor reumatoide; MØ: macrófagos. Adaptado de^{291,294,303}.

Las modificaciones postraduccionales como acetilación, carbamilación o citrulinación en la mucosa del pulmón, boca o estómago pueden producir alteraciones en los péptidos de unión al heterodímero MHC, especialmente aquellos que contienen el epítipo compartido y permiten la presentación de antígenos a células T. Estos nuevos epítomos, generados a partir de la conversión de peptidil arginina a peptidil citrulina, son reconocidos y presentados por APC a linfocitos T y B, lo que activa la respuesta inmune adaptativa en tejidos linfoides y, en el caso de AR seropositivas, generan la producción de los autoanticuerpos FR y ACPA²⁹⁴.

La inflamación sinovial comienza con la infiltración de células mononucleares, sobre todo linfocitos T y macrófagos, junto con la activación de células residentes de la membrana sinovial. Los inmunocomplejos, citoquinas y/o el complemento activan a macrófagos y fibroblastos que producen mediadores de inflamación^{295,303,305}. Los sinoviocitos FLS activados producen citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-15, IL-18 e IL-22), prostaglandinas, leucotrienos, grandes cantidades de proteasas de matriz extracelular (MMP1, MMP3, MMP13), captasinas y agregasas (ADAMTS-4 y 5) que promueven la degeneración del cartílago y hueso^{291,306}. Los linfocitos B, además de presentar los inmunocomplejos a los linfocitos T y producir autoanticuerpos y quimioquinas, están implicados en la formación de nuevos vasos que fomentan la angiogénesis e infiltración celular. De la misma forma, los linfocitos T tienen una amplia participación en la patogénesis de la enfermedad al producir IL-2, IL-17, IFN- γ , GM-CSF y TNF- α y activar a macrófagos. El aumento de líquido sinovial aumenta la presión e hipoxia tisular y se induce la transcripción de HIF1- α y VEGF que deriva en un incremento de la angiogénesis. También se activan y expresan moléculas de adhesión extracelular como E-selectina y moléculas de adhesión intracelular endotelial y vascular como ICAM o VCAM que permiten la diapedésis y una mayor infiltración de linfocitos Th17, células dendríticas, macrófagos y linfocitos B a la membrana sinovial^{291,294,295,307}. Por último, fibroblastos activados, linfocitos T y linfocitos B desencadenan la generación de osteoclastos y reabsorción ósea a partir de la producción de RANKL que se une a su receptor RANK en macrófagos, células dendríticas y pre-osteoclastos^{308,309}. Así, la acción autocrina y paracrina de los mediadores de inflamación junto con la respuesta inmune adaptativa persistente pueden perpetuar la enfermedad y acabar produciendo la destrucción del cartílago y hueso articular^{294,295,307}.

5.2.2. Membrana sinovial de articulación sana y de pacientes con artritis reumatoide

La articulación está compuesta por la cápsula articular, formada por tejido conjuntivo denso, y por la cavidad sinovial, que engloba a la membrana y al líquido sinovial. La membrana sinovial tapiza la cara interna de la cápsula articular y es la encargada de producir el líquido sinovial, que rellena toda la cavidad o espacio articular y actúa como lubricante permitiendo el movimiento de la articulación. En una articulación sana, el líquido sinovial es un trasudado acelular y viscoso del plasma sanguíneo enriquecido en ácido hialurónico. La membrana sinovial se divide anatómicamente y funcionalmente en dos capas: capa íntima o *lining* y capa subíntima o *sublining*. La capa íntima o *lining* es la capa que está en contacto con la cavidad articular, y en la articulación sana, está constituida por una fina capa (2 o 3 células de espesor) de sinoviocitos estructurado con uniones celulares pero carente de lámina basal y uniones estrechas³¹⁰. Los sinoviocitos son de tipo sinoviocitos macrófágicos (macrófagos; ver *Introducción*, apartado 5.2.3.) y de tipo sinoviocitos fibroblásticos (fibroblastos, FLS). Los macrófagos residentes expresan CD11b, CD14, CD16 y CD68³¹¹. Los sinoviocitos fibroblásticos son células mesenquimales con apariencia y características similares a fibroblastos que expresan CD90, vimentina y colágeno tipo IV y V^{306,307,312}. La capa subíntima o *sublining* se encuentra por debajo del *lining* y está constituida por tejido conectivo innervado y vascularizado por arteriolas y capilares aislados con la presencia de algunos adipocitos y fibroblastos y, en ocasiones, puede producirse la infiltración de un pequeño número de macrófagos y linfocitos³¹⁰.

El tejido sinovial de los pacientes con AR presenta una estructura y características diferentes al tejido sinovial normal (**Figura 27**). El líquido sinovial se infiltra de neutrófilos, y, en menor proporción, de células dendríticas, linfocitos y macrófagos. Se produce una hiperplasia del *lining* debida a la proliferación y activación de los sinoviocitos y macrófagos y a su producción de citoquinas, quimioquinas y proteasas que promueven la inflamación y el daño articular. Los fibroblastos

producen quimioquinas que atraen a linfocitos y pueden desarrollar un fenotipo que constituye el frente invasivo de la sinovial en el hueso articular, denominado *pannus*. El tejido *pannus* invade y erosiona el cartílago y el hueso contiguo. El *sublining* sufre también un proceso de hiperplasia y angiogénesis e invade el tejido conectivo perdiendo su funcionalidad. Se produce, además, la infiltración masiva de macrófagos, linfocitos y fibroblastos, debido a los vasos de nueva formación, que exacerba aún más la inflamación y erosión del cartílago y hueso articular por osteoclastos

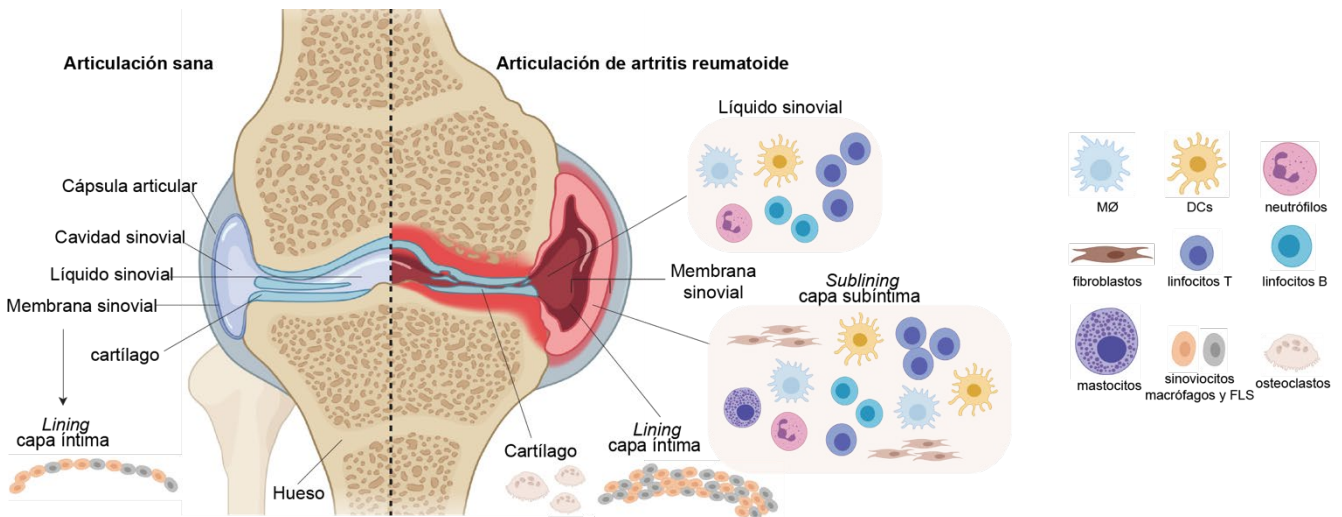


Figura 27. Representación esquemática de una articulación sana y una articulación de artritis reumatoide con sinovitis. Se muestran los tipos celulares implicados en la patogenia de la artritis reumatoide (AR). La composición celular de la sinovitis en AR incluye células inmunes innatas (células dendríticas, macrófagos, mastocitos y neutrófilos) y células inmunes adaptativas (linfocitos B y T). DCs: células dendríticas; FLS: sinoviocitos fibroblastos; MØ: macrófagos. Adaptado de ³⁰³.

Aunque la composición celular de la sinovitis incluye tanto a células inmunes innatas y adaptativas como a células del estroma sinovial, la heterogeneidad de la AR también se manifiesta en el tipo celular predominante del tejido sinovial. Así, el análisis celular y molecular del tejido sinovial ha permitido categorizar a los pacientes con artritis de reciente comienzo en tres categorías histológicas o patotipos antes del inicio de la terapia inmunomoduladora ³¹⁴:

- Patotipo *linfo-mieloide*: caracterizado por la presencia de linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas y enriquecida en macrófagos.
- Patotipo *mieloide-difuso*: caracterizado por la presencia de células del linaje mieloide pero pocos linfocitos B.
- Patotipo *pauci-inmune*: caracterizado por la presencia de células estromales como fibroblastos y pocas células inmunes.

5.2.3. Macrófagos en artritis reumatoide

Los macrófagos son uno de los tipos celulares más abundantes en el sinovio de pacientes con AR y numerosos datos experimentales corroboran su implicación en la patogenia de la enfermedad ^{46,313,315}. El número de macrófagos en el tejido sinovial correlaciona con el grado de erosión articular ^{316,317} y el incremento del número de macrófagos se considera un marcador de inicio de actividad de la enfermedad ^{318,319}. En comparación con la membrana sinovial sana, se ha descrito como el número de macrófagos CD68⁺ y CD163⁺ en la MS se encuentra aumentado en AR ^{99,312}, contribuye a la hiperplasia del *sublining* y se correlaciona con indicadores de actividad de la enfermedad como PCR, VSG y NAT ^{319,320}. Además, el número de macrófagos CD68⁺ del *sublining* difiere entre

tratamiento efectivo o no ³²¹ y sugiere que los macrófagos del *sublining* constituyen un biomarcador de la respuesta al tratamiento con anti-TNF ³²² y con corticoides intraarticulares ³²³.

Diversos estudios recientes abordan la caracterización funcional de macrófagos en la inflamación articular en comparación con condiciones homeostáticas mediante tecnología *single cell*. Por ejemplo, la población de macrófagos CX₃CR1⁺TREM⁺ del *lining* forma una barrera inmunológica protectora similar a un epitelio que se repuebla constantemente a partir de la proliferación de macrófagos residentes CX₃CR1⁻. Se ha descrito la actividad antiinflamatoria y reparativa de los macrófagos CX₃CR1⁺TREM⁺ durante la remisión de AR ³²⁴. Los macrófagos inflamatorios HBEGF⁺ del *sublining* promueven la invasión de fibroblastos de forma dependiente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y contribuyen a la destrucción de la inflamación mediada por fibroblastos ³²⁵.

La implicación de los macrófagos en la patogénesis de la AR (**Figura 28**) se puede englobar en cuatro aspectos:

1) Proliferación y activación de FLS mediante la producción de TNF- α e IL-1 β .

2) Osteoclastogénesis:

La producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α por macrófagos junto M-CSF y RANKL, producido por FLS activados, inducen la formación y activación de osteoclastos ^{46,313,326}.

3) Reclutación de monocitos:

La producción de IL-1 β , TNF- α y CCL2 por macrófagos induce la extravasación de monocitos desde la sangre a la cavidad sinovial y la secreción de IL-18 induce, a su vez, un aumento de la producción de CCL2 ^{41,46,327}.

4) Activación de células T:

Los macrófagos secretan las citoquinas TNF- α , IL-12, IL-15 e IL-18, que contribuyen a la diferenciación de linfocitos Th1 ³²⁷; IL-23, que induce la proliferación de los linfocitos Th17 ³²⁸; e IL-26, que induce la producción de IL-1 β , IL-6 y TNF- α por monocitos y la diferenciación de Th17 vía IL-1 β ³²⁹.

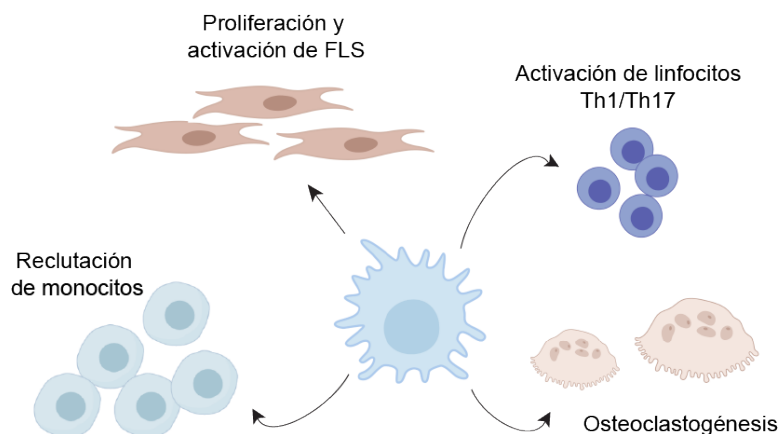


Figura 28. Esquema representativo de la implicación de macrófagos en la patogénesis de la artritis reumatoide. FLS: sinoviocitos fibroblastos. Adaptado de ⁴¹.

También hay que destacar el papel de las citoquinas IL-22 e IL-29, ambas producidas tanto por macrófagos como por FLS. La IL-22 promueve respuestas inflamatorias en la cavidad sinovial de AR e induce la proliferación de FLS y producción de citoquinas proinflamatorias ³³⁰. La IL-29, además

de aumentar la inflamación sinovial, promueve la degradación del cartílago³³¹. Algunas citoquinas como GM-CSF son capaces de inducir la síntesis de IL-1- β y TNF- α y contribuir a la perpetuación del proceso inflamatorio en ausencia de la acción persistente de células T¹¹⁰.

Los macrófagos producen gran cantidad de quimioquinas del tipo CXCL (*C-X-C motif ligand*) como CXCL1-10 que promueven la inflamación y angiogénesis³³². Además de mediar el reclutamiento de neutrófilos y monocitos, la expresión de CXCL8 en líquido sinovial se asocia con manifestaciones clínicas de pacientes con AR³³² y la alta expresión de CXCL16 está implicada en el reclutamiento de monocitos al tejido sinovial³²⁷. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), secretado por macrófagos y monocitos, promueve el crecimiento y la supervivencia celular y sus niveles en suero están correlacionados positivamente con la severidad de la enfermedad. A su vez, MIF puede aumentar la producción de CXCL8, IL-1, IL-6 TNF- α y MMP2 en la sinovial de AR³³³.

Los macrófagos también producen otros mediadores de la inflamación como la prostaglandina PGE₂, que interviene en la respuesta inflamatoria favoreciendo la vasodilatación y aumentando la permeabilidad e infiltración de células a la membrana sinovial³³⁴, y gran cantidad de metaloproteinasas como MMP1, MMP2, MMP9, MMP12 y MMP13 y ROS mitocondriales que contribuyen a la destrucción del cartílago articular^{41,46,313}.

Polarización de macrófagos en artritis reumatoide

Debido a la amplia participación de los macrófagos en el desarrollo de la enfermedad, algunos estudios constatan la importancia de la polarización de macrófagos en la etiopatogenia de la AR (**Figura 29**)^{41,313}. La caracterización molecular de macrófagos derivados de monocitos *in vitro* GM-CSF dependientes (GM-M \emptyset) o M-CSF dependientes (M-M \emptyset)^{91,99} ha permitido definir el estado de polarización de los macrófagos en AR, donde macrófagos CD14⁺ del líquido sinovial (LS) y de la membrana sinovial (MS) de pacientes con AR muestran un perfil transcriptómico y proteico proinflamatorio compatible con la polarización de macrófagos por GM-CSF⁹⁹.

El perfil de expresión génica de macrófagos CD14⁺ del LS presenta una alta expresión de *CCR2*, *EGLN3*, *FACER1A*, *INHBA*, *MMP12* y *SLC2A1*, y una baja expresión de genes antiinflamatorios como *CD36*, *FOLR2*, *HTR2B*, *IGF1*, *SLC40A1* y *STAB1*⁹⁹, característicos de la polarización M-CSF dependiente^{90,91}. Este perfil transcripcional se valida a nivel de expresión de proteína en macrófagos CD163⁺ del *sublining* de la MS, que expresan mayores niveles de activina A, CCR2, MMP12, PHD3y TNF- α y menores niveles de CD209 que macrófagos CD163⁺ de MS sana⁹⁹. A su vez, macrófagos del *lining* y *sublining* expresan de CD163 y CD32, mientras que la expresión CD64, marcador asociado al perfil proinflamatorio o polarización M1, se restringe a macrófagos del *lining*³³⁶.

La caracterización fenotípica de macrófagos CD14⁺ del LS de pacientes con AR muestra una alta expresión de CD50 (ICAM3) y CD36 en membrana, baja expresión de CD163 y FR β y ausencia de CD209 (DC-SIGN), marcadores característico de M-M \emptyset ^{99,104}. También se ha confirmado la presencia HLA-DR, CD40, CD80, CD86 y CD276, asociados con la polarización M1 proinflamatoria, en el LS de pacientes con AR³³⁵. A su vez, monocitos CD14⁺ de sangre periférica de pacientes con AR expresan los marcadores proinflamatorios CCR5, CD64, CD68 y HLA-DR, mientras que presentan una baja expresión de CD163³³⁶. La expresión de estos marcadores en monocitos contribuye a su diferenciación a macrófagos proinflamatorios durante la migración desde la sangre a los tejidos sinoviales en inflamación y refuerza nuevamente el perfil proinflamatorio de macrófagos localizados en la membrana sinovial de AR.

En el *Capítulo III* de este trabajo, con el objetivo de evaluar el estado de polarización de macrófagos en la membrana sinovial de pacientes con artritis indiferenciada persistente (AI) y en diferentes fases de evolución (AI-AR y AI-APs), así como, en las artritis establecidas AR y APs, se ha determinado la expresión de los marcadores MMP12, activina A y TNF- α , asociados con la polarización de macrófagos por GM-CSF, característicos de un perfil proinflamatorio, y el marcador CD209, asociado con la polarización de macrófagos por M-CSF, característico de un perfil antiinflamatorio.

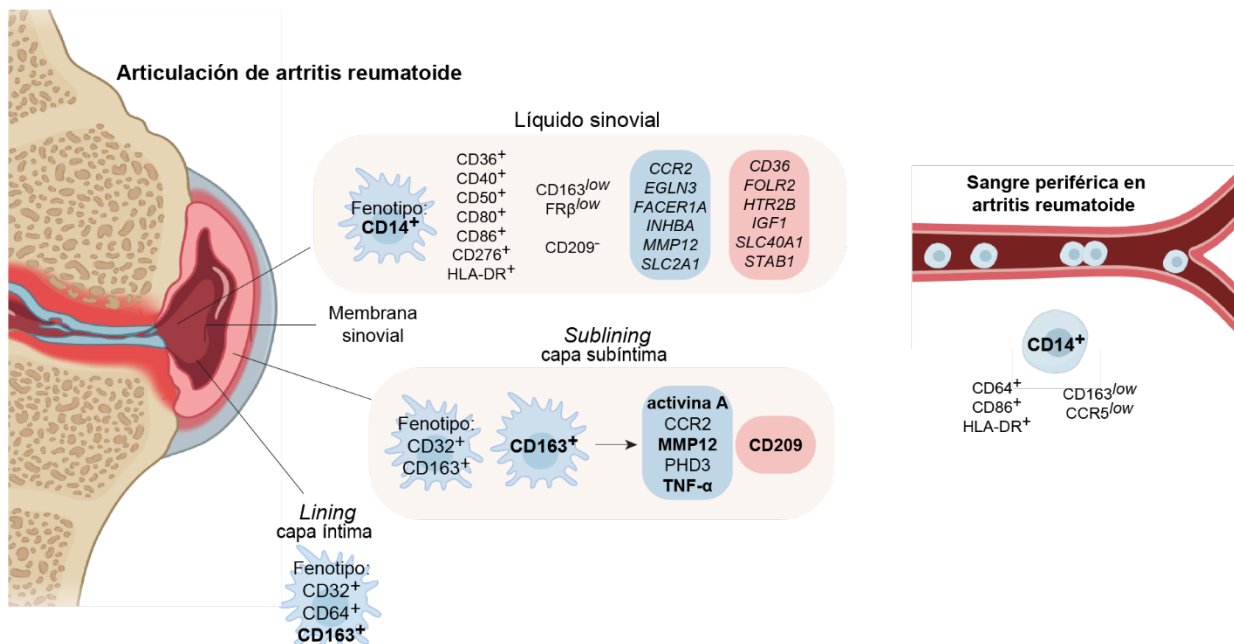


Figura 29. Representación esquemática de la polarización de macrófagos en artritis reumatoide. Se representa en azul los genes y proteínas diferencialmente expresados y en rojo, disminuidos ^{41,99,335,336}.

5.2.4. Manifestación extraarticular y comorbilidad de la artritis reumatoide

Dado que mediadores de inflamación, complejos inmunes y derivados del metabolismo alterado de lípidos circulan a nivel sistémico, los pacientes con AR en tratamiento pueden presentar manifestaciones extraarticulares de la enfermedad como vasculitis o enfermedad intersticial pulmonar y otros rasgos de comorbilidad asociada. Las afectaciones más comunes pueden ser a nivel de cerebro (fatiga y reducción de la actividad cognitiva), hígado (respuesta elevada de fase aguda y anemia de enfermedad crónica), pulmones (enfermedad inflamatoria y fibrótica, cáncer de pulmón), músculos (sarcopenia), huesos (osteoporosis) y glándulas exocrinas (Síndrome de *Sjögren*). Además, el riesgo de sufrir linfoma, infarto de miocardio o síndrome metabólico inflamatorio (tejido adiposo y muscular resistente a la insulina) está aumentado en estos pacientes ³⁰³.

5.2.5. Diagnóstico de la artritis reumatoide

El diagnóstico de la enfermedad se basa en criterios clínicos, radiológicos e inmunológicos establecidos por la ACR y EULAR en 1987 ²⁸¹ y actualizados en 2010 (**Figura 30**) ²⁴¹. Los criterios de clasificación están restringidos a individuos con presencia de sinovitis en, al menos, una articulación y una puntuación de 6 o más se requiere para la clasificación definitiva de la enfermedad. Los cuatro parámetros que se consideran son: el grado de afectación articular, la presencia o ausencia de FR y/o

ACPA en serología, los valores de reactantes de fase aguda (VSG y PCR) y la duración de la enfermedad.

| Criterio | Variable | Puntos |
|----------------------------------|---|--------|
| Afectación articular | | |
| | 1 articulación tamaño medio-grande | 0 |
| | 2-10 articulaciones grande | 1 |
| | 1-3 articulaciones pequeñas | 2 |
| | 4-10 articulaciones pequeñas | 3 |
| | más de 10 articulaciones (al menos 1 de tamaño pequeño) | 5 |
| Serología | | |
| | FR ⁻ ACPA ⁻ | 0 |
| | FR ⁺ bajo o ACPA ⁺ bajo | 2 |
| | FR ⁺ alto o ACPA ⁺ alto | 5 |
| Reactantes de fase aguda | | |
| | PCR normal VSG normal | 0 |
| | PCR anormal VSG anormal | 1 |
| Duración de la enfermedad | | |
| | menos de 6 semanas | 0 |
| | 6 semanas o más | 1 |

Figura 30. Criterios EULAR 2010 para el diagnóstico de la artritis reumatoide. ACPA: anticuerpos antipéptido cíclicos citrulinado; FR: factor reumatoide; PCR: proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular. Adaptado de ²⁴¹.

Para valorar el grado global de actividad de la enfermedad en el paciente se emplean los índices de actividad compuestos o DAS. Este procedimiento útil y validado permite resumir la información de varios parámetros de la enfermedad en un solo indicador. Actualmente para valorar el grado de actividad de la enfermedad se emplea el DAS28 (*Disease Activity Score 28*), que tiene en cuenta 28 articulaciones (**Figura 31**). Los valores del DAS y DAS28 varían entre 0 y 10 y son la base de los criterios de mejoría de la EULAR ^{291,337}. La evaluación de grado de discapacidad funcional se realiza mediante cuestionarios específicos validados. El más extendido actualmente es el cuestionario de discapacidad funcional HAQ ²⁹¹.

$$\text{DAS28} = 0.56 \sqrt{(\text{NAD28})} + 0.28 \sqrt{(\text{NAT28})} + 0.70 \ln(\text{VSG}) + 0.014 (\text{VGP})$$

NAD: número de articulaciones dolorosas
 NAT: número de articulaciones tumefactas
 VSG: velocidad de sedimentación globular
 VGP: valoración global del paciente

DAS28 > 5.1 Actividad de la enfermedad alta
 DAS28 3.2 - 5.1 Actividad de la enfermedad moderada
 DAS28 2.6 - 3.2 Actividad de la enfermedad baja
 DAS28 < 2.6 Remisión

Figura 31: Fórmula y valores DAS28 para valorar el grado de actividad de la enfermedad.

5.2.6. Tratamiento de la artritis reumatoide

El objetivo del tratamiento de la artritis reumatoide es la remisión de la enfermedad, o en su defecto, en pacientes con AR de larga evolución, reducir al mínimo la actividad inflamatoria para alcanzar una mejoría significativa de los síntomas y signos, preservar la capacidad funcional y controlar el daño

estructural para mantener una buena calidad de vida. No existe un tratamiento específico que suponga la cura efectiva para la artritis reumatoide ^{291,303}.

El tratamiento consiste en la utilización inicial de AINEs, inhibidores selectivos o no selectivos de la COX-2, que no modifican la patogenia de la AR pero disminuyen la inflamación con mayor eficacia que los analgésicos comunes; seguido de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME) que controlan el proceso de la enfermedad a largo plazo. Los FAME pueden ser sintéticos (FAMEs), dirigidos contra una diana específica o convencionales (FAMEsc), o biológicos (FAMEb), originalmente biológicos o biosimilares (**Figura 32**). Cuando los pacientes no responden a los AINEs, se suelen emplear fármacos esteroideos como glucocorticoides, potentes supresores de la respuesta inflamatoria. Aunque su uso prolongado es controvertido debido a la toxicidad y a sus efectos secundarios.

Los FAMEs no solo interfieren en los síntomas, al controlar el dolor y daño articular, sino también en la progresión del daño evitando el deterioro funcional. Los FAMEsc, como el metotrexato o la hidroxicloroquina, son pequeñas moléculas cuyo mecanismo de acción no está del todo descrito y, al contrario que los FAMEs dirigidos contra moléculas específicas del interior celular, no actúan contra una diana terapéutica específica del proceso patogénico de la respuesta inmune, sino de forma global. Entre los FAMEs dirigidos empleados se encuentran inhibidores de proteínas JAK (iJAK) como anti-JAK1/JAK3 (tofacitinib) o anti-JAK1/JAK2 (baricitinib). Los FAMEb son la mayoría anticuerpos monoclonales que actúan directamente contra los mecanismos causantes de la inflamación y la destrucción articular como anti-TNF (infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab), anti-IL6R (tocilizumab, sarilumab), anti-CD20 (rituximab) e inhibidores de la coestimulación de células T como anti-CTLA-4 (abatacept). Al ser más específicos, son más eficaces y menos tóxicos que los FAMEs ²³⁷.

| FAME sintéticos (FAMEs) | |
|-------------------------|-----------------|
| FAMEsc | FAMEs dirigidos |
| metotrexato | baricitinib |
| leflunomida | tofacitinib |
| sulfasalazina | upadacitinib |
| hidroxicloroquina | |

| FAME biológicos (FAMEb) | |
|---|--|
| FAME originalmente biológicos | FAMEb biosimilares |
| iTNF: adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab | actualmente para adalimumav, etanercept, infliximab, rituximab |
| iIL-6R: sarilumab, tocilimumab | |
| iCoestimulación: abatacept | |
| anti-células B (CD20): rituximab | |

Figura 32. Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad para el tratamiento de la artritis reumatoide. FAMEb: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad biológicos; FAMEs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos; FAMEsc: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad sintéticos convencionales; iCoestimulación: inhibidores de la coestimulación de células T; iIL-6R: inhibidores del receptor de la IL-6; iTNF: inhibidores de TNF. Adaptado de ²³⁷.

Según las recomendaciones EULAR 2019 para el tratamiento de pacientes con AR (**Figura 15**), todos los pacientes han de ser tratados con FAMEs tan pronto como se establezca el diagnóstico clínico de la enfermedad, independientemente del cumplimiento de los criterios de clasificación. La

probabilidad de obtener una respuesta favorable al tratamiento con FAMEs y una menor progresión de la enfermedad es mayor cuanto menor sea el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el inicio del tratamiento, lo que se conoce como *ventana de oportunidad* ²³⁷.

5.2.7. Remisión clínica de la artritis reumatoide y criterios de mejoría

La remisión clínica de la artritis reumatoide es el objetivo terapéutico ideal y se evalúa mediante criterios establecidos por la ACR y EULAR basados en una clasificación categórica como los criterios *Booleanos (Boolean)* y el uso de índices de actividad como el DAS28 y SDAI (*Simplified Disease Activity Index*), CDAI (*Clinical Disease Activity Index*) y RAPID3. Respecto al DAS28, se cumplen criterios de remisión con DAS28 <2.6 (**Figura 31**). Se considera remisión sostenida cuando la duración de la remisión de la enfermedad es igual o superior a seis meses ^{291,338}.

Los criterios de mejoría tienen en cuenta los parámetros anteriormente expuestos que permiten evaluar el grado de actividad inflamatoria y la discapacidad funcional y daño estructural residual. Se han descrito tres niveles de mejoría de acuerdo con el cambio de porcentaje experimentado respecto al valor basal de los parámetros: 20 (ACR20), 50 (ACR50) y 70% (ACR70) ²⁹¹.

5.3. Artritis psoriásica

La artritis psoriásica (APs) es una enfermedad inflamatoria crónica de carácter autoinmunitario que afecta al sistema musculoesquelético, pudiendo producir lesiones en el cartílago y hueso a nivel articular. La APs pertenece al grupo de las espondiloartritis o espondiloartropatías, un grupo de enfermedades autoinmunitarios musculoesqueléticas que comparten características inmunogenéticas, patofisiológicas, clínicas y radiológicas entre las que se encuentran, además de APs, la espondilitis anquilosante, espondiloartritis indiferenciadas, artritis reactivas o artritis asociadas con la enfermedad inflamatoria intestinal ^{339,340}.

Clínicamente, la APs es muy heterogénea y de curso variable. Las manifestaciones musculoesqueléticas más frecuentes son la entesitis (inflamación de la entesis, zona de inserción de los ligamentos y tendones a los huesos) y dactilitis (tumefacción de dedos de pie o mano). Los pacientes pueden manifestar poliartritis u oligoartritis combinadas o no con espondiloartritis axial, artritis interfalángicas distales o artritis mutilante y suelen estar también afectados con psoriasis, omnicopatía psoriásica, uveítis e inflamación intestinal. La APs afecta en torno al 0.25-0.5 % de la población mundial y según la Sociedad Española de Reumatología tiene una prevalencia en España entre el 0.5-0.6 % y la incidencia es similar en ambos sexos ³³⁹⁻³⁴¹.

5.3.1. Membrana sinovial de pacientes con artritis psoriásica

A pesar de las diferencias en la sintomatología entre AR y APs, la sinovitis en ambas cursa de forma similar y la composición y distribución estructural de sus infiltrados celulares resulta muy semejante ^{340,342}. Se produce una hiperplasia del *lining* con la proliferación de fibroblastos y acumulación de macrófagos, la infiltración masiva de células inmunes y neoangiogénesis en el *sublining*, donde macrófagos, células dendríticas y mastocitos producen citoquinas proinflamatorias y proangiogénicas, factores de crecimiento y metaloproteasas que contribuyen a la sinovitis persistente y destrucción articular ³⁴⁰. Aunque la linfoneogénesis ectópica resulta muy similar a la descrita en AR, el patrón vascular de neoangiogénesis difiere entre ambas patologías ³⁴⁰. La APs se

caracteriza por una hipervascularización con vasos densos y de morfología tortuosa, además de una mayor expresión de Ang-2, MMP2, MMP9 y VEGF³⁴³⁻³⁴⁵. También se ha descrito un mayor número de mastocitos sinoviales, principales productores de IL-17³⁴⁶. Por otro lado, aunque no hay diferencias en cuanto a la expresión de RANKL y OPG y el mecanismo de destrucción ósea no difiere entre sinovitis de AR y APs, la afectación del hueso es más compleja en APs y combina erosión y neoformación ósea³⁴⁶.

5.3.2. Etiología y patofisiología de la artritis psoriásica

La etiología de la artritis psoriásica también es multifactorial en la que factores genéticos, inmunológicos y ambientales contribuyen a su desarrollo y gravedad clínica. Estudios genéticos han revelado la asociación del desarrollo de APs con diferentes polimorfismos en genes que codifican para MHCII, como en *HLA-C* y *HLAB27*, junto con el gen *IL23R*^{347,348}. También se han descrito condicionantes inmunológicos que promueven el desarrollo de la enfermedad como la participación de las vías Th1/Th17, así como IL-9, IL-12/23 e IL-17^{339,347}.

5.3.3. Macrófagos en artritis psoriásica

De forma similar a su participación en AR, los macrófagos representan uno de los tipos celulares más abundantes localizados en el sinovio de pacientes con APs, y, en comparación con la membrana sinovial sana, el número de macrófagos CD68⁺ en la membrana sinovial se encuentra aumentado y contribuye significativamente al daño y destrucción articular^{316,349}. También se ha descrito como el número de macrófagos CD163⁺ del *sublining* refleja el grado de actividad global y correlaciona con parámetros como NAT, PCR y VSG³⁵⁰. Al igual que en AR, el tratamiento efectivo con anti-TNF en pacientes con APs reduce el número de macrófagos^{351,352}. Respecto a la densidad de macrófagos existen datos contradictorios, algunos estudios sugieren que la sinovitis de APs presenta mayor número de macrófagos CD163⁺ que en AR^{353,354} y otros, que la densidad de macrófagos CD68⁺ del *sublining* es muy similar entre ambas patologías³⁵⁵.

Los macrófagos del sinovio de APs expresan IL-10 y CD163 y su expresión se correlaciona con una baja expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-12p70 y TNF- α) en el líquido sinovial de pacientes con APs³³⁵. En general, no existen muchos estudios sobre el perfil de polarización de macrófagos en APs. En este sentido, el tercer objetivo de este trabajo amplía este conocimiento y aborda el análisis de la expresión y cuantificación de proteínas asociadas con la polarización de macrófagos por GM-CSF (Activina A, TNF- α , MMP12) y M-CSF (CD209) en la membrana sinovial de pacientes con APs.

5.3.4. Diagnóstico de la artritis psoriásica

La amplia variedad de sintomatología y características clínicas hace que el diagnóstico clínico de la APs resulte algo complejo, siendo a veces necesario realizar un diagnóstico diferencial de otras patologías articulares como artrosis o gota. El diagnóstico de la enfermedad más extendido se basa en los criterios CASPAR (*Classification criteria for Psoriatic Arthritis*)^{283,356} junto con el apoyo de técnicas radiológicas (**Figura 33**). No existen pruebas clínicas para el diagnóstico. Los criterios de clasificación CASPAR están restringidos a individuos con psoriasis y síntomas musculoesqueléticos como artritis, entesitis y/o espondilitis, y se requiere una puntuación de 3 o más para la clasificación definitiva de la enfermedad. Los cinco parámetros que se consideran son la presencia actual de

psoriasis, la historia personal o familiar de psoriasis, la presencia de dactilitis y/o antecedente personal, la ausencia de FR en la serología, la presencia de distrofia ungueal y la evidencia radiológica de neoformación ósea yuxtaarticular cerca de los márgenes de la articulación.

| Criterio | Variable | Puntos |
|-----------------------|---|--------|
| Psoriasis | | |
| | actual | 2 |
| | antecedente personal | 1 |
| | antecedentes familiares | 1 |
| Dactilitis | | |
| | actual | 1 |
| | antecedente personal | 1 |
| Distrofia ungueal | | |
| | onicolisis, pitting y/o hiperqueratosis | 1 |
| Serología | | |
| | FR ⁻ | 1 |
| Evidencia radiológica | | |
| | neoformación ósea yuxtaarticular | 1 |

Figura 33. Criterios CASPAR para el diagnóstico de artritis psoriásica. FR: factor reumatoide. Adaptado de ^{283,356}.

Para el diagnóstico de la afectación axial se emplean una serie de criterios elaborados por el Grupo de Investigación y Evaluación de la Psoriasis y la Artritis Psoriásica (GRAPPA) (**Figura 34**). La presencia de al menos 2 de ellos se requiere para la clasificación de afectación axial en APs ³⁵⁷.

| Criterio | Variable |
|---------------------------|---|
| Dolor lumbar inflamatorio | |
| | edad de inicio < 45 años |
| | duración > 3 meses |
| | rigidez matutina > 30 minutos |
| | mejora con ejercicio, dolor alternante en nalgas |
| Limitación funcional | |
| | limitación movilidad cervical, dorsal o lumbar en plano sagital y frontal |
| Radiológico | |
| | sacroilitis unilateral ≥ grado 2 (radiografía simple) |
| | presencia sindesfomitos (resonancia magnética) |
| | adema en médula ósea, erosiones o disminución espacio articular |

Figura 34. Criterios GRAPPA para el diagnóstico de la afectación axial en artritis psoriásica. Adaptado de ³⁵⁷.

5.3.5. Tratamiento de la artritis psoriásica

El objetivo del tratamiento es la remisión de la enfermedad o reducir al mínimo la actividad de la enfermedad, el dolor articular y la discapacidad funcional. Al igual que la AR, la APs se caracteriza por un daño a nivel articular temprano y cronicidad inflamatoria si no se trata. Tampoco se dispone de un tratamiento que suponga la cura efectiva para la APs ³⁵⁸.

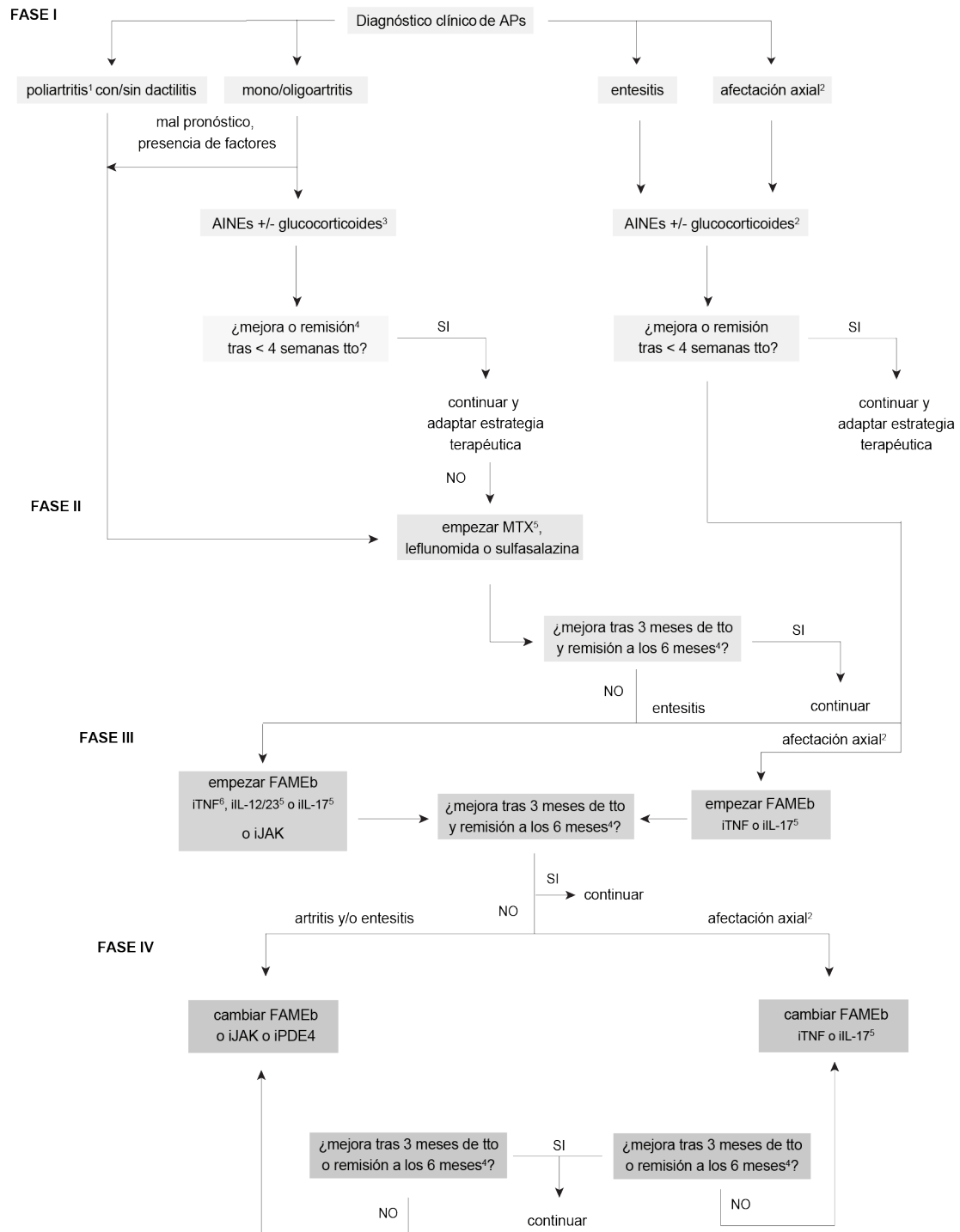


Figura 35. Recomendaciones EULAR para el manejo de artritis psoriásica. Actualizadas en 2019. ¹La poliartritis incluye más de 4 articulaciones tumefactas. ²Enfermedad predominantemente axial. ³Inyecciones de glucocorticoides, excepto en casos de enfermedad axial. ⁴La mejora de la enfermedad significa la reducción de, al menos, un 50% de la actividad de la enfermedad. ⁵Tratamiento preferiblemente con afectación dérmica, si hay uveítis o enfermedad inflamatoria intestinal es preferible un anti-TNF. ⁶Tratamiento junto con MTX. FAMEb: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad biológicos; iJAK: inhibidores JAK; iL-12/23: inhibidores IL-12/23; iL-17: inhibidores IL-17; iPDE4: inhibidores de fosfodiesterasa-4; iTNF: inhibidores de TNF; tto: tratamiento. Adaptado de ³⁵⁹.

Según las recomendaciones EULAR para el manejo de la APs, actualizadas en 2019 ³⁵⁹ (Figura 35), el tratamiento consiste en la utilización inicial de AINEs para disminuir los síntomas musculoesqueléticos de inflamación y, cuando son requeridas, inyecciones locales de glucocorticoides en articulaciones afectadas. Si no hay mejora o remisión en un plazo inferior a un mes, se recomienda que todos los pacientes con poliartritis o mono/oligoartritis sean tratados con

los FAMEs MTX (preferiblemente en el caso de pacientes con afectaciones dérmicas), leflunomida o sulfasalazina. Los FAMEs dirigidos que se emplean son iJAK como anti-JAK1/JAK3 (tofacitinib) y entre los FAMEb se encuentran anti-TNF (etanercept, infliximab, adalimumab, golimumab, certolizumab), anti-IL-12/23 (ustekinumab), anti-IL-17A (secukinumab, ixekizumab), inhibidores selectivos de la fosfodiesterasa-4 (iPDE4) (apremilast) e inhibidores de la coestimulación de células T como anti-CTLA-4 (abatacept)³⁵⁸.

O B J E T I V O S

1. Evaluar la capacidad de metotrexato (MTX) de inducir un estado de tolerancia cruzada a LPS *in vivo* y determinar la cinética de dicho efecto (EudraCT 2017-002902-11).

- 1.1. Analizar el efecto de MTX sobre los niveles de citoquinas inflamatorias en respuesta a LPS en sangre periférica, monocitos y macrófagos procedentes de sujetos sanos.
- 1.2. Determinar el efecto de MTX sobre el perfil transcripcional de monocitos.
- 1.3. Seleccionar el tiempo de detección de los efectos de memoria inmune innata tras la toma de MTX.

2. Evaluar la capacidad de pemetrexed (PMX) de inducir un estado de tolerancia cruzada a LPS en macrófagos humanos diferenciados con GM-CSF (GM-MØ).

- 2.1. Analizar el perfil transcripcional y funcional inducido por PMX en GM-MØ a nivel basal y en respuesta a LPS.
- 2.2. Determinar los mecanismos moleculares de la tolerancia a LPS inducida por PMX en GM-MØ.

3. Evaluar la expresión de GM-CSF y el estado de polarización de macrófagos en la cavidad sinovial de pacientes con artritis indiferenciada persistente y en diferentes fases de evolución.

Se han empleado muestras de tejido sinovial de pacientes con artritis establecidas (artritis indiferenciada persistente, AI; artritis reumatoide, AR; y, artritis psoriásica, APs) y artritis en diferentes fases de evolución (artritis indiferenciada con evolución a artritis reumatoide, AI-AR; y, artritis indiferenciada con evolución a artritis psoriásica, AI-APs) para realizar los objetivos específicos:

- 3.1. Analizar la expresión y la fuente celular de producción de GM-CSF en líquido y membrana sinovial.
- 3.2. Determinar la expresión y la cuantificación de proteínas asociadas a la polarización de macrófagos dependiente de GM-CSF (GM-MØ) y M-CSF (M-MØ) en membrana sinovial.
- 3.3. Determinar la densidad de macrófagos en membrana sinovial.
- 3.4. Identificar el patotipo del tejido sinovial.

M A T E R I A L E S Y
M É T O D O S

1. Características de las cohortes de pacientes y del Ensayo Clínico METOMAC

1.1. Ensayo Clínico METOMAC (Capítulo I)

Características y retirada de sujetos

El Ensayo Clínico en Fase I titulado “*Estudio de la acción tolerogénica de metotrexato sobre macrófagos como mecanismo de acción en enfermedades mediadas por mecanismos inmunes*” (número EudraCT: 2017-002902-11; código de protocolo: METOMAC) fue un estudio unicéntrico y abierto con hospitalización durante 6 horas tras la toma de MTX realizado en la unidad de Ensayos Clínicos del Hospital Universitario de la Princesa (HULP, Madrid).

El promotor e investigador principal fue el Dr. Isidoro González Álvaro (Servicio de Reumatología) y los investigadores colaboradores el Dr. Francisco Abad Santos y el Dr. Manuel Román (Servicio de Farmacología Clínica del HULP) y la Dra. Amaya Puig (Hospital General Universitario Gregorio Marañón, HGUGM, Madrid). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética (CEIm) del HULP y se siguieron las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975. La selección de los 6 sujetos se realizó en base a las características descritas en la **Tabla 1**.

| Criterios de inclusión | |
|--|--|
| Voluntarios sanos que hubiesen firmado el consentimiento informado | |
| Sujetos varones | |
| Sujetos con edad comprendida entre 18 y 55 años | |
| Criterios de exclusión | |
| Sujetos con antecedentes de hepatopatía o hipersensibilidad al MTX | |
| Sujetos en tratamiento con otra medicación en el momento del estudio | |
| Sujetos que tomasen cualquier tipo de medicación las 48h previas a recibir MTX o en las 5 vidas medias del fármaco previas a recibir MTX | |
| Sujetos con alteraciones analíticas clínicamente relevantes: | |
| | a nivel hepático |
| | hemoglobina <10 g/dL |
| | disminución en el recuento de plaquetas o leucocitos |
| Fumadores | |

Tabla 1. Criterios de selección de sujetos del ensayo clínico METOMAC.

Desarrollo del estudio y recogida de muestras

Los sujetos recibieron información oral y escrita sobre la utilización de su sangre con fines de investigación y, en el caso de aceptar su participación en el ensayo clínico, se obtuvo el consentimiento informado firmado. 7 días antes de comenzar el ensayo, se realizó una analítica de sangre (hemograma, bioquímica general, coagulación y serología para detección de VIH, hepatitis B y C), un análisis de orina, una exploración clínica, un electrocardiograma (ECG) y toma de constantes vitales (tensión arterial, frecuencia cardíaca y temperatura). Se recogieron datos demográficos (edad, etnia, peso y talla) y antecedentes personales y familiares.

Los 6 sujetos recibieron una única dosis de 20 mg de MTX (8 comprimidos de 2.5 mg) por vía oral (*METOTREXATO WYETH 2.5 mg*, FARMA S.A.) y se extrajeron 100 ml de sangre periférica en tubos de heparina (*VACUETTE heparin tubes*, Greiner Bio-One GmbH) en los siguientes tiempos: antes de la toma de MTX (basal), 3, 24 y 120 horas después de la toma de MTX. 6 horas después de la toma de MTX, se verificó cualquier efecto adverso y los voluntarios abandonaron la Unidad de

Ensayos Clínicos. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron mediante un gradiente de densidad con Ficoll *Lymphoprep* (*Nycomed Pharma*). Los monocitos se purificaron y se cultivaron a partir de PBMCs (ver *Materiales y Métodos*, apartado 2.1) y se estimularon durante 3 horas con LPS (10 ng/ml). Otra fracción de monocitos se cultivó (0.5×10^6 células/ml) durante siete días en presencia de GM-CSF (1000 U/ml, *ImmunoTools*) para generar macrófagos GM-MØ y se estimularon durante 3 horas con LPS (10 ng/ml). Para la determinación de citoquinas en plasma, dos tubos de heparina con 1ml de sangre cada uno se mantuvieron en agitación (15h, RT) y uno de ellos se estimuló con LPS (10 ng/ml). 15 horas después, los tubos se centrifugaron (1200 rpm, 10 min), el plasma se recogió y se congeló (-80°C) hasta su determinación.

La concentración de citoquinas se cuantificó en sangre total y en el sobrenadante del cultivo celular de monocitos y macrófagos (ver *Materiales y Métodos*, apartado 5). La determinación de la expresión génica se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 3. La concentración de MTX en sangre y el resto de parámetros farmacocinéticos se determinaron en el Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de La Paz. Se realizó una extracción de sangre a los siguientes tiempos: antes de la toma de MTX (basal), 1, 2, 3, 4, 6, 24 y 120 horas después de la toma de MTX. Las muestras se recogieron en tubos de EDTA (3 ml, tubos *BD Vacutainer K3-EDTA*), se centrifugaron (3500 rpm, 10 min) y el plasma resultante se separó en dos alícuotas (500 µl) que se congelaron (-20°C) hasta su posterior envío al Hospital Universitario de La Paz. Las muestras se identificaron con el código de ensayo, número de voluntario y tiempo correspondiente.

1.2. Cohortes de pacientes con artritis reumatoide para la determinación de sCD14 (Capítulo II)

1.2.1. Cohorte de inicio

Consta de 10 pacientes con artritis reumatoide de reciente comienzo que cumplían con criterios de clasificación ACR2010 ²⁴¹ con una duración de la enfermedad menor a 6 meses y que no recibieron tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad o prednisona. La muestra de sangre periférica se obtuvo en la visita inicial (basal) y a los 6 meses de iniciar el tratamiento con MTX (15-25 mg a la semana). Ningún paciente tomaba prednisona en el momento de la determinación inicial o a los 6 meses del tratamiento.

La actividad de la enfermedad se midió con el índice DAS28 ³⁶⁰. Todos los pacientes incluidos en la cohorte de inicio respondieron a la terapia con MTX. En concreto, 9 pacientes lograron la remisión de la enfermedad (DAS > 2.6) y un paciente presentó niveles de actividad de la enfermedad bajos (DAS > 1.2). Pacientes tratados concomitantemente con prednisona no se incluyeron en el estudio con el objetivo de eliminar las posibles interferencias de este fármaco inmunoregulador. La concentración plasmática de CD14 soluble (sCD14) se determinó mediante ELISA en la visita inicial (basal) y tras 6 meses de iniciar el tratamiento con MTX (ver *Materiales y Métodos*, apartado 5). El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario La Paz-*IdiPAZ* y se obtuvo el consentimiento informado firmado de cada paciente de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

1.2.2. Cohorte de validación

Se incluyeron 33 pacientes con artritis de reciente comienzo, pertenecientes a la cohorte PEARL (*Princesa Early Arthritis Register Longitudinal*) ³⁶¹, respondedores (n=23) y no respondedores (n=10) a MTX. La cohorte PEARL es un estudio prospectivo iniciado en el año 2001 por el Servicio de

Reumatología del HULP que lleva a cabo el seguimiento de los pacientes con artritis de reciente comienzo con el fin de realizar proyectos de investigación traslacional. El estudio PEARL cumple los principios éticos y de investigación descritos en la declaración de Helsinki de 1983, está aprobado por el CEim del HULP (PI-518) y se requiere el consentimiento informado firmado de cada paciente para su inclusión. Los pacientes incluidos en el estudio presentan más de 18 años, una o más articulaciones inflamadas y una duración de evolución menor a un año desde el inicio de la aparición de los síntomas ³⁶¹.

El seguimiento de los pacientes se realiza a lo largo de 5 años e incluye cinco visitas protocolarizadas (basal, 6 meses, 1, 2 y 5 años). En cada visita se recogen muestras biológicas (sangre periférica), datos sociodemográficos, clínicos, terapéuticos y analíticos. Las muestras biológicas se almacenan en el Biobanco del Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IP). Entre los datos analíticos recogidos se encuentran: bioquímica general, hemograma, niveles de PCR y VSG junto con títulos de FR y ACPA. Los datos clínicos de los pacientes incluyen NAD, NAT, actividad de la enfermedad medida con el índice DAS28 (2), cuestionario de discapacidad HAQ, tratamiento y datos de progresión radiológica según el índice de *Sharp* a lo largo del seguimiento. Al final del seguimiento, los pacientes con artritis de reciente comienzo se clasifican en pacientes con AR, si cumplen los criterios de clasificación ACR de 1987 ²⁸¹, o pacientes con AI, si cumplen los criterios descritos por *Verpoort KN* y colaboradores ³⁶². Todos los pacientes cuyo diagnóstico difiere de AR o AI son excluidos del estudio.

Todos los pacientes seleccionados en la visita basal presentaron niveles de actividad moderados o altos medidos por el DAS28. Los criterios empleados para valorar la repuesta clínica a MTX tras seis meses del tratamiento se muestran en la **Tabla 2**. Los pacientes que no cumplieron estos criterios, o que incluso empeoraron su situación tras el tratamiento con MTX, se consideraron no respondedores.

| Respuesta clínica a MTX | |
|--------------------------------|---|
| (1) | Niveles de actividad de la enfermedad medidos con DAS28: actividad baja (2.6 - 3.2) o remisión (< 2.8) |
| (2) | Número de articulaciones inflamadas (NAT): 0 o disminución de la inflamación en más de 5 articulaciones en comparación con el recuento en la visita basal |
| (3) | Normalización de los reactantes de fase aguda (PCR y VSG) |

Tabla 2. Criterios de respuesta clínica a MTX.

La concentración de sCD14 en suero se determinó mediante ELISA en la visita inicial (basal) y tras 6 meses de iniciar el tratamiento con MTX a dosis bajas en monoterapia (15-25 mg/semana) (ver *Materiales y Métodos*, apartado 5).

1.3. Cohorte de pacientes con diferentes fases de evolución de artritis inflamatoria (Capítulo III)

Esta cohorte incluye pacientes con artritis indiferenciada persistente (AI), artritis indiferenciada con evolución a artritis reumatoide (AI-RA) o con evolución a artritis psoriásica (AI-APs), artritis reumatoide (AR) y artritis psoriásica (APs). Las biopsias sinoviales se seleccionaron retrospectivamente cuando los pacientes alcanzaron criterios de clasificación de AR o APs durante el seguimiento. Se obtuvieron mediante artroscopia de las articulaciones de rodilla inflamadas con sinovitis activa de pacientes con AI (n=16), AI-RA (n=8) o AI-APs (n=9). Como controles se incluyeron

biopsias sinoviales de pacientes con AR (n=12), según criterios ACR1987²⁸¹, APs (n=10), según criterios CASPAR²⁸³, y tejido sinovial de donantes sanos (n=6, cuatro hombres y dos mujeres, edad 36 ± 5 años) que se obtuvo mediante menisectomía.

Algunos pacientes estaban en tratamiento con FAMEsc (ver *Resultados*, **Tabla 13**) o con AINEs en el momento de la artroscopia. Los pacientes no recibieron infiltración local de glucocorticoides desde, al menos, 3 meses antes de la realización de la artroscopia para evitar los efectos inmunomoduladores del fármaco. Ningún paciente recibió terapia biológica antes de la biopsia sinovial. La artroscopia se llevó a cabo mediante un artroscopio de 2.7 mm (*Storz*). De cada paciente se obtuvieron 8 muestras de la pica suprapatelar de la bolsa subcuadrípital y del canal medial y lateral³⁴². El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Hospital Clínic de Barcelona (HCB/2014/0579) y se obtuvo el consentimiento informado firmado de cada paciente.

2. Generación y cultivo de macrófagos

2.1. Aislamiento de monocitos humanos y cultivo de macrófagos

Se emplearon concentrados leucocitarios (*buffy coats*) de donantes de sangre sanos y anónimos del Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Las PBMCs se aislaron mediante un gradiente de densidad con Ficoll *Lymphoprep* (*Nycomed Pharma*). Los monocitos se purificaron a partir de PBMCs mediante selección positiva con anticuerpos anti-CD14 acoplados a bolas magnéticas (*anti-CD14 microbeads, Miltenyi Biotec*) (> 95% células CD14⁺) (**Figura 36**).

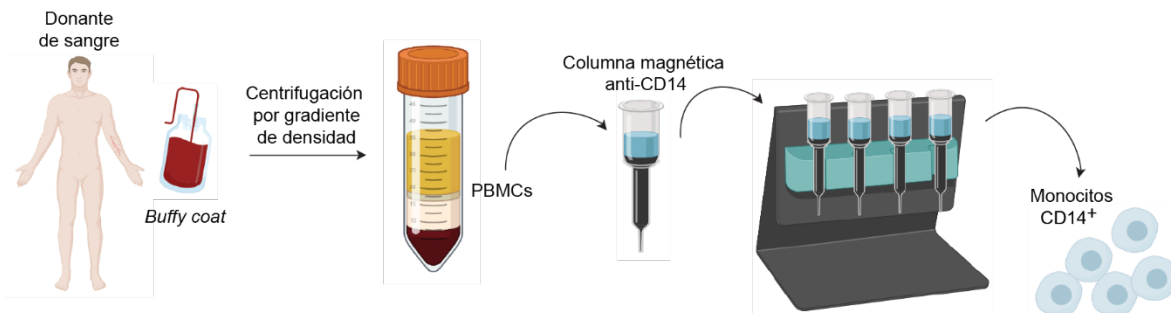


Figura 36. Esquema representativo del procedimiento de obtención de CD14⁺ purificados a partir de concentrado leucocitario (*buffy coat*). PBMCs: células mononucleares de sangre periférica.

Después de la separación celular, los monocitos CD14⁺ se resuspendieron en medio de cultivo RPMI estándar (*Thermo Fisher Scientific*, que contiene 1 mg/L de ácido fólico), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, *Sigma Aldrich*) y se cultivaron (0.5×10^6 cels/ml) en placas de cultivo de 12 pocillos (TC, *Cultek*) durante 7 días en presencia de GM-CSF (1000 U/ml, *ImmunoTools*) o M-CSF (10 ng/ml, *ImmunoTools*) para generar macrófagos GM-M \emptyset (polarizados con GM-CSF) o macrófagos M-M \emptyset (polarizados con M-CSF). Las placas de cultivo se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 21% de O₂ y 5% de CO₂ y las citoquinas se añadieron al cultivo cada dos días.

2.2. Tratamiento de macrófagos humanos

Los monocitos se trataron con una única dosis de 50 nM de pemetrexed (PMX, obtenido de la farmacia del Instituto de Investigación Biomédica de Gerona, *Alimta Lilly*, polvo para concentrado para solución por perfusión, 500 mg) o 50 nM de metotrexato (MTX, obtenido de la farmacia del

HGUGM *Pfizer*, solución inyectable 500 mg/20 ml) y/o 5 μ M de ácido folínico (FolAc, 5-formil-tetrahidrofolato, *Sigma-Aldrich*) y/o 25-50 μ M de pifitrina- α (PFT, *Sigma-Aldrich*) previo a la diferenciación hacia macrófago con las citoquinas GM-CSF (GM-M \emptyset) o M-CSF (M-M \emptyset).

Para el estudio de la tolerancia a endotoxina, los macrófagos GM-M \emptyset o M-M \emptyset se estimularon en los tiempos indicados con 10 ng/ml de lipopolisacárido bacteriano (LPS, *Ultra Pure E. coli O111:B4 strain, InvivoGen*; *smooth* LPS que se une exclusivamente a TLR4) sin cambiar el medio de cultivo. Para el estudio de la implicación de CD14 en la tolerancia a endotoxina, 20 o 200 ng/ml de la proteína sCD14 (*Recombinant Human CD14 carrier-free, Biolegend*) se añadió al cultivo de macrófagos junto con LPS.

3. Análisis de la expresión génica

3.1. Aislamiento de RNA

El RNA celular total se extrajo con el *kit* comercial *NucleoSpin RNA kit (Macherey-Nagel)* siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células (10⁶ cels) se homogeneizaron en *buffer* de lisis (350 μ l RA1+ 1% β -mercaptoetanol) y se llevó a cabo un paso de digestión enzimática con DNAasa I. Para las muestras del Ensayo Clínico METOMAC, se empleó el *kit* comercial *AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (QIAGEN)* para aislar el RNA, DNA y proteína. La concentración y pureza del RNA se determinó con el espectrofotómetro (*NanoDrop 2000, ThermoScientific*).

3.2. Retrotranscripción y PCR cuantitativa (qRT-PCR)

El RNA se retrotranscribió a cDNA empleando el *kit* comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Thermo Fisher)*, siguiendo las recomendaciones del fabricante, con las condiciones de tiempo y temperatura que se muestran en la **Tabla 3**.

| Paso | T ^a (°C) | Tiempo |
|------|---------------------|----------|
| 1 | 25 | 10 min |
| 2 | 37 | 120 min |
| 3 | 85 | 5 min |
| 4 | 4 | ∞ |

Tabla 3. Protocolo de RT.

Los niveles de *mRNA* se cuantificaron empleando oligonucleótidos y sondas diseñadas con el *software Universal ProbeLibrary Roche (UPL, Roche Life Science)* en el LightCycler[®] 480 (*Roche Life Science*). La determinación se realizó por triplicado en placas de 384 pocillos (*Roche Life Science*) y el protocolo de amplificación por PCR se muestran en la **Tabla 4**.

| | Ciclos (n°) | T ^a (°C) | Tiempo |
|-------------------------|-------------|---------------------|--------|
| Preincubación | 1 | 95 | 10 min |
| Incubación | 45 | | |
| Desnaturalización | | 95 | 10 seg |
| Alineación y elongación | | 60 | 30 seg |
| Final | 1 | 40 | 30 seg |

Tabla 4. Protocolo de qPCR.

Se empleó el método estándar *delta delta Ct* ($\Delta\Delta Ct$) para determinar la cuantificación relativa de los genes diana y los valores se normalizaron de acuerdo con el nivel de expresión del gen de referencia endógeno *TBP* (*Tata Binding Protein*). Las secuencias de oligonucleótidos de los genes analizados se muestran en la **Tabla 5**.

| Símbolo del gen | Forward primer/sense (5'→3') | Reverse primer/antisense (3'→5') |
|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <i>CD14</i> | <i>gttcggaagacttatcgacat</i> | <i>acaaggttctggcgtggt</i> |
| <i>CD209</i> | <i>cagagtggggtagcatgagtgac</i> | <i>gtgaagttctgctacgcaggag</i> |
| <i>CDKN1A</i> | <i>tcactgtcttgaccctgtgc</i> | <i>ggcgtttggagtggtagaaa</i> |
| <i>GDF15</i> | <i>ccggatacaccgccaaga</i> | <i>agagatacgcagggtcagggt</i> |
| <i>LIF</i> | <i>tgccaatgccctctttattc</i> | <i>gtccagggtgtggggaac</i> |
| <i>IGF1</i> | <i>tgtggagacaggggctttta</i> | <i>atccacgatgcctgtctga</i> |
| <i>IL1B</i> | <i>ctgtcctgcgtgtgaaaga</i> | <i>ttgggtaattttgggatctaca</i> |
| <i>IL6</i> | <i>gatgagtacaaaagtcctgatcca</i> | <i>ctgcagccactggttctgt</i> |
| <i>IL10</i> | <i>tgggggagaacctgaagac</i> | <i>ccttgctctgttttcacagg</i> |
| <i>INHBA</i> | <i>ctcggagatcatcacgtttg</i> | <i>ccttggaatctogaagtgc</i> |
| <i>MMP12</i> | <i>tgtcactaccgtgggaaataag</i> | <i>aacactggtctttggtctctcag</i> |
| <i>TLR4</i> | <i>cctgcgtgagaccagaaag</i> | <i>ttcagctccatgcattgataa</i> |
| <i>TNFA</i> | <i>cagcctcttctcctctgat</i> | <i>gccagagggctgattagaga</i> |
| <i>TNFAIP3</i> | <i>tgcacactgtgttcatcgag</i> | <i>acgctgtgggactgacttcc</i> |
| <i>TYMS</i> | <i>cccagttatggcttcagat</i> | <i>gcagttggtcaactccctgt</i> |
| <i>TBP</i> | <i>cggctgttaactcgcttc</i> | <i>cacacgccaagaacagtgga</i> |

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos empleados para RT-qPCR.

3.3. RNAseq

Se aisló el RNA de tres muestras independientes de cada condición a analizar, se cuantificó con el *NanoDrop 2000* y su calidad se determinó en el *Bioanalyzer* (*Agilent 2100 Technologies*, Parque Científico de la Universidad Complutense de Madrid). El análisis del perfil transcriptómico global se llevó en la plataforma *BGI Genomics* (*BGI Tech Solutions*, Hong Kong, <https://www.bgitechsolutions.com>). Se realizó la preparación, fragmentación y secuenciación de la biblioteca utilizando la plataforma *BGISEQ-500*. Se generó un promedio de 5.41 Gb de bases por muestra y, después del filtrado, se asignaron lecturas limpias a la referencia (*UCSC Genome assembly hg38*) mediante *Bowtie2* (proporción de mapeo promedio 93,41%)³⁶³. Los niveles de expresión génica se calcularon utilizando el paquete de software *RSEM (RNAseq by Expectation and Maximization)*³⁶⁴. La expresión diferencial se evaluó mediante el uso de algoritmos *DEseq2* y se emplearon los parámetros *Fold change* (FC) > 2 y valor de *p* ajustado (*adjp*) < 0.05 como puntos de corte para identificar genes diferencialmente expresados.

Los datos de expresión génica diferencial de macrófagos tratados con PMX (doi:10.3389/fimmu.2021.776879) se depositaron en el *NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO)*³⁶⁵ con los números de acceso GSE159349 y GSE159380. El transcriptoma de MTX GM-MØ se describió previamente en¹⁹¹ y está disponible en *GEO* (GSE71253). El transcriptoma de macrófagos de la sinovial de artritis reumatoide (RA-MØ) frente a macrófagos derivados de monocitos con M-CSF (M-MØ) se describió previamente en³⁶⁶ y está disponible en *GEO* (GSE10500).

3.4. GSEA

A partir de los datos de expresión génica, se generaron listas ranqueadas del análisis *limma* de las diferentes condiciones experimentales con los genes ordenados en base al Log_2FC o *adjp* con el programa *BEdit*. El análisis computacional de enriquecimiento en los conjuntos de genes *GSEA* (*Gene Set Enrichment Analysis*) se realizó mediante el programa informático *GSEA 4.1.0* (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). Las listas ranqueadas se compararon con los conjuntos de genes disponibles en *Molecular Signatures Database v7.4* (*MSigDB database v7.4*)³⁶⁶ o con los conjuntos de genes definidos *p53_Target_Gene*³⁶⁷, *SREBP_DEPENDENT_GENE_SET*³⁶⁸, *GM-MØ-specific markers*³⁶⁹ y *MTX-regulated genes, MTX-downregulated genes* en¹⁹¹ (GSE71253).

El resultado del análisis de enriquecimiento del conjunto de genes se refleja como la puntuación de enriquecimiento o ES (*Enrichment Score*), que indica el grado en que un conjunto de genes está sobrerrepresentado en la parte superior o inferior de una lista clasificada de genes. Los resultados se muestran como puntuación de enriquecimiento normalizada o NES (*Normalized Enrichment Score*), que explica las diferencias en el tamaño del conjunto de genes y en las correlaciones entre los conjuntos de genes y el conjunto de datos de expresión. El valor de FDR (*False Discovery Rate*) indica la probabilidad estimada de que el NES represente un resultado falso positivo y se consideró estadísticamente significativo a partir de un valor de FDR (*FDR q-value*) < 0.25.

3.5. Silenciamiento de RNA (*siRNA*)

Para el silenciamiento de la enzima timidilato sintasa (*TYMS*), monocitos CD14⁺ purificados de sangre periférica de donantes sanos (*buffy coat*) se diferenciaron durante 5 días a macrófagos con GM-CSF (GM-MØ). Los macrófagos (7.5×10^5) se transfectaron con 2 siRNA específicos para la *TYMS* (100 nM, *TYMS silencer select s14538* y *s14539*) o siRNA control (*scr, silencer select negative control #1, Ambion, Life Technologies*) usando el reactivo *HiPerFect* (QIAGEN) y se trataron o no durante 48 horas con PMX.

4. SDS-PAGE y Western Blot

Los macrófagos se lisaron en *buffer* RIPA (1M Tris-HCl, 5M NaCl, 1% Deoxicolato sódico, 10% SDS, 10% NP-40, pH 8) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa comercial: 1mM coctel de inhibidores de proteasas (PIC, *Sigma*), 10 mM NaF (*Sigma*), 1 mM Na₃VO₄ (*Sigma*) y 0.5 mM DTT. El PIC contiene 104 mM AEBSF, 80 μM Aprotinina, 4 mM Betahistina, 1.4 mM E-64, 2 mM Leupeptina y 1.5 mM Pepstatina A. Para la valoración de la concentración de proteínas se empleó el *kit DC ProteinAssay* (*BioRad*). Entre 10 y 30 μg de los lisados se resuspendieron en el *buffer* de carga 6X (30% glicerol, 70% 4x-Tris-Cl/SDS, 0.1% SDS y 180 μM azul de bromofenol), se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de *Immobilon-P* (PDVF, *Millipore*). Las membranas se bloquearon (1h, RT) con 5% BSA en *buffer* de lavado TBS-Tween (0.9% NaCl, 1M Tris pH 7.4 y 0.1% Tween).

Los anticuerpos primarios se incubaron (O/N a 4°C) (**Tabla 6**) a la concentración recomendada por la casa comercial. Tras lavar la membrana para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se incubó (1h, RT) con el anticuerpo secundario específico conjugado con la enzima *horseradish peroxidase* (HRP) (**Tabla 7**). Las proteínas se visualizaron mediante quimioluminiscencia con el *kit* comercial *Clarity™ Western ECL Substrate* (*Bio-Rad*) con el equipo *Allianz 4.7. Imaging*

System. La carga de la proteína se normalizó empleando un anticuerpo monoclonal contra el control de interés (Vinculina o GAPDH, **Tabla 6**). La cuantificación de proteínas se realizó mediante densitometría en *FIJI* (*Fiji Is Just ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*) y el valor de la intensidad del área se normalizó con la del control de carga (Vinculina o GAPDH).

| Anticuerpo (anti-) | Clon | Especie | Peso molecular (kDa) | Casa comercial | Referencia |
|--|------------|---------|----------------------|----------------------------------|------------|
| A20/TNFAIP3 | policlonal | conejo | 82 | <i>Cell Signaling Technology</i> | 4625 |
| GAPDH | 6C5 | ratón | 37 | <i>Santa Cruz Biotechnology</i> | sc-32233 |
| IkB α | L35A5 | ratón | 39 | <i>Cell Signaling Technology</i> | 4814 |
| Phospho-IRF-3 (Ser396) | 4D4G | conejo | 45, 55 | <i>Cell Signaling Technology</i> | 4947 |
| Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) | D3F9 | conejo | 43 | <i>Cell Signaling Technology</i> | 4511 |
| Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) | D13.14.4E | conejo | 42, 44 | <i>Cell Signaling Technology</i> | 4370 |
| Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) | policlonal | conejo | 46, 54 | <i>Cell Signaling Technology</i> | 9251 |
| Phospho-Stat1 (Tyr701) | 58D6 | conejo | 84, 91 | <i>Cell Signaling Technology</i> | 9167 |
| Vinculin | VIN-11-5 | ratón | 117 | <i>Sigma-Aldrich</i> | V4505 |

Tabla 6. Anticuerpos primarios para Western blot.

| Anticuerpo | Especie | Casa comercial | Referencia |
|--------------------------------------|---------|----------------------------------|------------|
| Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody | cabra | <i>Cell Signaling Technology</i> | 7074 |
| Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody | burro | <i>Bionova</i> | A90-137P |

Tabla 7. Anticuerpos secundarios para Western blot.

5. Cuantificación de citoquinas y CD14 soluble

La concentración de citoquinas se cuantificó en el sobrenadante del cultivo celular empleando el kit comercial ELISA específico para IL-10, TNF- α , IL-6, CXCL10, GM-CSF (*Human ELISA Max Deluxe, BioLegend*), IFN- β y activina A (*Duo Set ELISA, R&D Systems*). La concentración de CD14 soluble (sCD14) se midió en el plasma y suero de pacientes con AR, donantes sanos y sobrenadante de cultivo celular mediante el kit comercial ELISA específico *Human CD14 Quantikine ELISA Kit (R&D System)*. Se descartó la interferencia de factor reumatoide (FR), presente en algunas de las muestras de pacientes con AR, después de confirmar que las diluciones seriadas de plasma produjeron niveles de sCD14 idénticos tras ajustar la concentración con el factor de dilución ³⁷⁰. En todos los casos el experimento se realizó siguiendo los protocolos facilitados por la casa comercial y la absorbancia se leyó a 450 nm (a la cual se restó la absorbancia de 570 nm) mediante el lector de microplacas *Opsys MR (Dynex Technologies)*.

6. Estudio histológico

6.1. Preparación de muestras

Recogida de muestras

Las biopsias sinoviales se obtuvieron mediante artroscopia de las articulaciones de rodilla inflamadas de pacientes con artritis indiferenciada y establecida (ver apartado 1.3).

Congelación y criocorte de tejidos

Tras su extirpación, los tejidos se sumergieron en moldes con el medio de descongelación *tissue-Tek OCT (Sakura Finetek Europe B.V.)*, se congelaron directamente en nieve carbónica y se guardaron (-80°C) hasta su utilización. Las muestras se cortaron longitudinalmente en cortes de 4 μ m de espesor

empleando el criostato *Microm HM 505EV (MICROM)* y se dejaron secar (1h, RT). Posteriormente, se fijaron y permeabilizaron (15 min) con acetona pura (*VWR chemicals*) y se dejaron secar (1-2h, RT).

6.2. Tinción de inmunofluorescencia

La tinción de inmunofluorescencia de tejido sinovial se realizó en una cámara húmeda en oscuridad. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en presencia de inmunoglobulinas humanas (IgG) para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos a través de sus fracciones Fc. Las muestras se bloquearon (10 min) con 1% IgG antes de su incubación (1h, RT) con los anticuerpos primarios correspondientes (1-5 µg/ml) (**Tabla 8**), se lavaron con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo y, seguidamente, se incubaron (1h, RT) con los anticuerpos secundarios (**Tabla 9**). El mismo anticuerpo secundario se empleó como control negativo. Para visualizar el núcleo las muestras se tiñeron con DAPI (*Dihydrochloride, Calbiochem, Sigma-Aldrich*) y se montaron con el medio de montaje acuoso (*Dako Faramount Aqueous Mounting Medium, Agilent*).

| Anticuerpo (anti-) | Clon | Isotipo | Especie | Casa comercial | Referencia |
|-------------------------------------|------------|---------|---------|---|------------|
| CD3 | SK7 | IgG1 | ratón | <i>BD Biosciences</i> | 347340 |
| CD90 | E510 (RUO) | IgG1 | ratón | <i>BD Pharmigen</i> | 555593 |
| CD163 | Ber-Mac3 | IgG1 | ratón | <i>MBL</i> | K0147-3 |
| CD209 | MR1 | IgG1 | ratón | cedido por A.L.Corbí (CIB-CSIC, Madrid) | |
| fibroblast activation protein (FAP) | F11-24 | IgG1 | ratón | <i>Santa Cruz Biotechnology</i> | sc-65398 |
| inhibin beta A | policlonal | IgG | conejo | <i>Abcam</i> | 4370 |
| CD115 | policlonal | IgG | cabra | <i>R&D Systems</i> | AF66157 |
| MMP12 | policlonal | IgG | conejo | <i>Abcam</i> | ab66157 |
| TNF alpha | policlonal | IgG | conejo | <i>Abcam</i> | ab6671 |

Tabla 8. Anticuerpos primarios para inmunofluorescencia.

| Anticuerpo | Isotipo | Especie | Fluoróforo | Casa comercial | Referencia |
|--------------------|-----------|---------|------------------|-------------------------------|------------|
| Donkey Anti-Mouse | IgG (H+L) | ratón | Alexa Fluor® 488 | <i>Jackson ImmunoResearch</i> | AB_2340851 |
| Goat Anti-Mouse | IgG2a | ratón | Alexa Fluor® 488 | <i>Invitrogen</i> | A-21131 |
| Goat Anti-Mouse | IgG1 | cabra | Alexa Fluor® 647 | <i>Invitrogen</i> | A-21235 |
| Donkey Anti-Rabbit | IgG (H+L) | ratón | Alexa Fluor® 647 | <i>Jackson ImmunoResearch</i> | AB_2340626 |
| Donkey Anti-Rabbit | IgG (H+L) | ratón | Cyanine Cy™3 | <i>Jackson ImmunoResearch</i> | AB_2340606 |
| Donkey Anti-Goat | IgG (H+L) | ratón | Cyanine Cy™3 | <i>Jackson ImmunoResearch</i> | AB_2340414 |

Tabla 9. Anticuerpos secundarios para inmunofluorescencia y/o citometría de flujo.

6.3. Adquisición y procesamiento de imágenes

La captura de imágenes se realizó en el microscopio confocal invertido *SPE (Leica Microsystems)* y un objetivo de inmersión de glicerol ACS-APO 20x de apertura numérica 0.60. Se mantuvieron los mismos parámetros durante todo el proceso de adquisición de imágenes entre las diferentes muestras³⁷¹. El procesamiento de imágenes se realizó empleando el programa *FIJI*.

6.4. Cuantificación de la expresión de proteínas mediante microscopia confocal

Para el análisis y cuantificación de la expresión de proteínas en tejido sinovial, se empleó el pan-marcador de macrófagos CD163 y/o CD115 para segmentar macrófagos y estimar la intensidad media de fluorescencia (IMF) de las proteínas de interés. CD163 y/o CD115 se adquirieron en condiciones de saturación para delimitar el área total del macrófago. Considerando que la intensidad

de fluorescencia correlaciona con el número de moléculas en la superficie celular, se calculó la media del número de moléculas de proteína de interés por cada célula CD163⁺ y/o CD115⁺ mediante *FIJI*. A continuación, se detalla la cuantificación de la expresión de activina A en macrófagos CD163⁺ (**Figura 37**) como ejemplo.

A partir de la imagen adquirida en el microscopio confocal, con la combinación de la tinción en los tres canales: activina A (verde), CD163 (rojo) y DAPI (azul) (**Figura 37A**), se seleccionaron dos canales, activina A (verde) y CD163 (rojo) (**Figura 37B**) para después separarlos e individualizarlos (**Figura 37C** y **37D**). La imagen con los macrófagos marcados con CD163 (rojo) (**Figura 37D**) se convirtió a imagen binaria (**Figura 37E**) y se segmentó (**Figura 37F**) en un rango determinado (50-500 μm) en *Image J*. Finalmente, la proteína de interés (activina A) se cuantificó en cada célula. La ventana de resultados muestra el valor de IMF (Intensidad Media de Fluorescencia) de activina A por cada célula CD163⁺ (**Figura 37G**). La IMF se evaluó de forma aleatoria en 3-5 campos dentro de la región de interés (*sublining*, área estandarizada ubicada a 50 μm del *lining*) de todas las muestras analizadas. La densidad de macrófagos se normalizó en base al área de tejido seleccionado (mm^2). Después de restar el fondo (zonas sin núcleos celulares teñidos con DAPI), los datos se representaron en *GraphPad Prism* (Version 8.2.1, La Jolla, CA, USA).

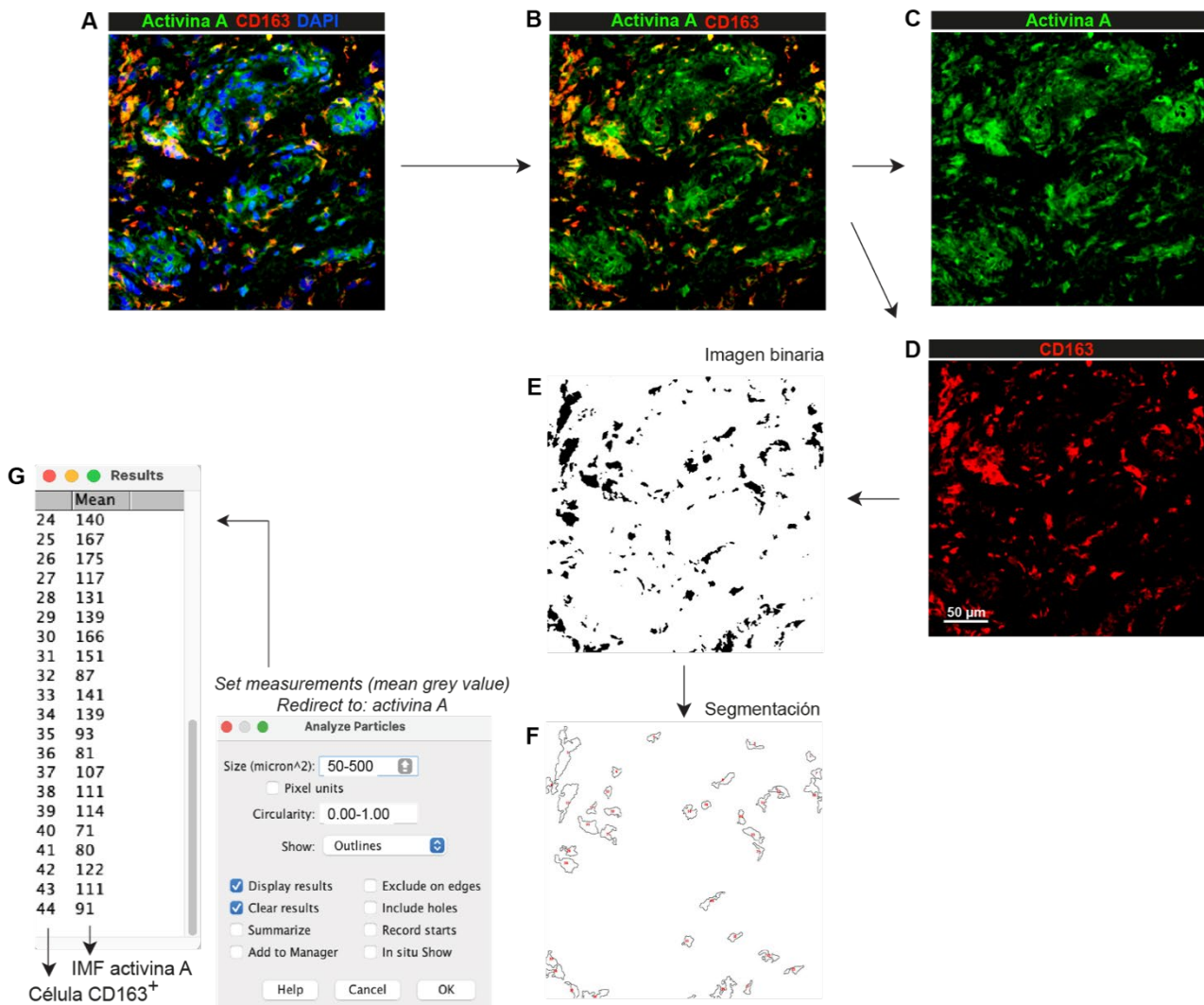


Figura 37. Cuantificación de la expresión de proteínas mediante microscopía confocal. Se detalla la cuantificación de la expresión de activina A en macrófagos CD163⁺ a modo de ejemplo.

7. Citometría de flujo

Los macrófagos se levantaron de la placa de cultivo con PBS 10 mM EDTA a 37°C, se centrifugaron y se resuspendieron (300.000 células) en *buffer* de tinción celular (100 µl) (*Cell Staining buffer*, *Biolegend*). El análisis fenotípico se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia. Los anticuerpos primarios utilizados se muestran en la **Tabla 10** y los secundarios en **Tabla 5**. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en presencia de 1% IgG para prevenir la unión inespecífica de los anticuerpos a través de sus fracciones Fc. El mismo control de isotipo se añadió como control negativo. Se empleó el citómetro de flujo *FACScan* (*Beckton Dickinson*) y la compensación de los valores de fluorescencia se llevó a cabo mediante el programa *CellQuest* (*Beckton Dickinson*) o *Kaluza* (*versión 2.1.*, *Beckman Coulter*). Se seleccionó la población celular en base a los parámetros FSC y SSC (**Figura 38**). Los resultados se analizaron utilizando el software *Kaluza* (*versión 3.1*).

| Anticuerpo (anti-) | Clon | Isotipo | Especie | Fluoróforo | Casa comercial | Referencia |
|---|---------------|------------------------|---------|------------|--------------------------|------------|
| Control γ 1 FITC/ γ 2a PE | X40 X39 (IVD) | IgG1 (FITC)/IgG2a (PE) | ratón | FITC/PE | <i>Beckton Dickinson</i> | 340041 |
| CD14 | M ϕ P9 | IgG2b | ratón | FITC | <i>Beckton Dickinson</i> | 347493 |
| CD115 | Policlonal | IgG | cabra | - | <i>R&D Systems</i> | AF329 |
| CD163 | Ber-Mac3 | IgG1 | ratón | FITC | <i>MBL</i> | K0147-3 |
| CD284/TLR4 | HTA125 | IgG2a | ratón | PE | <i>Biolegend</i> | 312805 |

Tabla 10. Anticuerpos primarios para citometría de flujo.

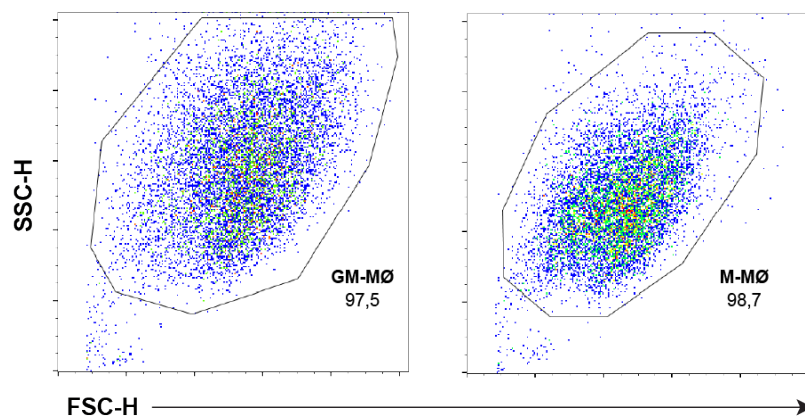


Figura 38. Estrategia de gateo de la población de macrófagos viable para el análisis de citometría de flujo. *Dot plot* representativo que indica la población celular de macrófagos (GM-MØ y M-MØ) seleccionada en base a los parámetros SSC-H (*Side Scatter Height*) y FSC-H (*Forward Scatter Height*).

8. Diseño de gráficos y esquemas y análisis estadísticos

BioRender.com se ha empleado para crear las representaciones esquemáticas de las figuras. El diseño y el análisis estadístico de los datos se ha realizado en *GraphPad Prism* (*Version 8.2.1*, *La Jolla, CA, USA*) para Mac. El análisis estadístico empleado en cada experimento se indica en el pie de cada figura. Se aplicó el test *Shapiro-Wilk* para estudiar la normalidad de las variables empleadas. Cuando las variables siguieron una distribución normal o gaussiana, se empleó el test paramétrico *t-Student* para la comparación entre dos grupos y la prueba estadística ANOVA de una vía con comparación múltiple de Tukey para la comparación entre varios grupos. Cuando las variables siguieron distribución no normal, se empleó el test no paramétrico *Mann-Whitney* para determinar las diferencias entre dos grupos y *Kruskal-Wallis* con comparación múltiple de *Dunn's* para la

comparación entre varios grupos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$.

Para el análisis de los datos del Ensayo Clínico METOMAC (EudraCT: 2017-002902-11) del Capítulo I los experimentos se realizaron por triplicado, se determinó la media y el error estándar de la media (SEM) de los seis donantes y la comparación entre muestras se realizó mediante un ANOVA de medidas repetidas con comparación múltiple de Tukey.

Para el análisis de los datos clínicos de las cohortes de pacientes con artritis reumatoide del Capítulo II se empleó *Stata 14.0* para *Windows* (*Stata Corp LP, College Station, TX, USA*). El test no paramétrico *Wilcoxon* se empleó para determinar las diferencias significativas entre los niveles de sCD14, DAS28 y PCR antes y después del tratamiento con MTX. La correlación entre diferentes variables se determinó mediante el test de *Spearman*. Para la cohorte de validación, como mayoría de las variables siguieron una distribución no normal, se representan como mediana y rango intercuartílico (IQR) y se emplearon las pruebas no paramétricas *Mann-Whitney* o *Kruskal-Wallis* para analizar las diferencias significativas. Las variables cualitativas se describieron mediante el cálculo de proporciones y se empleó la prueba exacta de *Fisher* para comparar entre variables categóricas. Para determinar la capacidad de las variables sCD14 basal (ng/ml) o Δ sCD14 (diferencia entre los niveles séricos de sCD14 finales y basales) para discriminar entre pacientes respondedores o no a MTX se realizó un análisis de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) mediante la opción gráfica y el comando *roctab*. Cada punto de corte se seleccionó en base al mejor valor de compensación entre sensibilidad, especificidad, casos correctamente clasificados y cocientes de verosimilitud positivos (LR+) y negativos (LR-). Una vez determinados los puntos de corte, se generaron nuevas variables para definir a los pacientes con concentración de sCD14 basal baja o alta y con una disminución de Δ sCD14 relevante. Se estimaron las *odds ratios* (OR) y su intervalo de confianza al 95% (IC 95%) con el comando *cs* de *Stata* y la opción *or*. Este comando proporciona la significación estadística con la prueba exacta de *Fisher*.

R E S U L T A D O S

CAPÍTULO I

Estudio de la acción tolerogénica de metotrexato sobre macrófagos como mecanismo de acción en enfermedades mediadas por mecanismos inmunes

MTX *in vivo* induce un estado de tolerancia a LPS en leucocitos

El objetivo de la primera parte de este trabajo fue verificar *ex vivo* la hipótesis de que la acción antiinflamatoria de MTX deriva de su capacidad de inducir un estado de tolerancia inmunitaria, ya observada *in vitro*¹⁸⁶, en sujetos sanos y determinar el tiempo-respuesta de los efectos de inmunidad entrenada del MTX. Para ello, en colaboración con el Servicio de Reumatología y Farmacología Clínica del Hospital Universitario La Princesa (HULP), se diseñó el Ensayo Clínico en Fase I “*Estudio de la acción tolerogénica de metotrexato sobre macrófagos como mecanismo de acción en enfermedades mediadas por mecanismos inmunes*” (número EudraCT 2017-002902-11, código METOMAC). Los datos demográficos de los sujetos incluidos en el estudio se detallan en la **Tabla 11**. El diseño del ensayo se basó en la administración de una única dosis de MTX (20 mg) de forma oral a seis sujetos sanos varones y la extracción de 100 ml de sangre periférica antes de la toma de MTX (basal) y 3, 24 y 120h después de la toma de MTX (Post-MTX) (**Figura 39A**).

| DATOS DEMOGRÁFICOS | | | | | | | | |
|---------------------|--------|-----------|---------------------|-----------|-------|--------------|-----------|-------|
| Sujeto | Código | Sexo | Fecha de nacimiento | Raza | Edad | Estatura (m) | Peso (Kg) | IMC |
| 1 | 03-S | Masculino | 09/05/1983 | Latina | 34 | 1.69 | 59.8 | 20.94 |
| 2 | 01-S | Masculino | 05/06/1988 | Caucásica | 29 | 1.77 | 88.5 | 28.25 |
| 3 | 06-S | Masculino | 14/02/1994 | Caucásica | 23 | 1.68 | 63.6 | 22.53 |
| 4 | 07-S | Masculino | 20/10/1988 | Caucásica | 29 | 1.81 | 85.3 | 26.04 |
| 5 | 08-S | Masculino | 05/05/1984 | Caucásica | 33 | 1.79 | 75.5 | 23.56 |
| 6 | 09-S | Masculino | 03/06/1996 | Caucásica | 21 | 1.80 | 84.7 | 26.14 |
| Media | | | | | 28.17 | 1.76 | 76.23 | 24.58 |
| Desviación estándar | | | | | 5.23 | 0.06 | 12.12 | 2.70 |

Tabla 11. Datos demográficos de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC. El estudio se compone de seis sujetos sanos. Se indican los parámetros sexo, raza, edad, estatura, peso e IMC (índice de masa corporal), calculado como peso (kg)/altura² (m²).

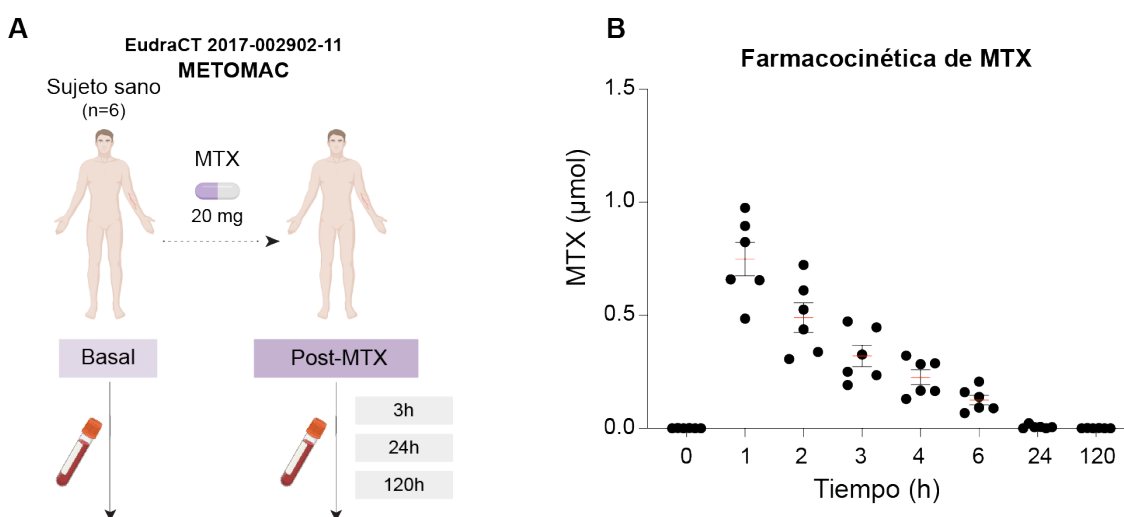


Figura 39. Diseño experimental del Ensayo Clínico METOMAC y farmacocinética de MTX. (A) Representación esquemática del diseño experimental del Ensayo Clínico METOMAC. Se administró una única dosis de MTX (20 mg) por vía oral a seis sujetos sanos varones y se extrajeron 100 ml de sangre periférica antes de la toma de MTX (basal) y 3h, 24h y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX. (B) Farmacocinética de MTX en los sujetos del estudio. Cada punto representa la medida de concentración plasmática de MTX (µmol) respecto al tiempo (horas) desde la toma del fármaco de cada sujeto. Se indica la media ± SEM los seis sujetos independientes.

El análisis farmacocinético de MTX en los seis sujetos reveló que 1h después de la toma de MTX (T_{max}) se detectó la concentración máxima de MTX (C_{max}) en plasma, que oscilaba entre 0.49 y 0.98 μmol (media de 0.75 μmol) (**Figura 39B**, **Tabla 12**), y fue indetectable 24h después de la toma de MTX.

| DATOS FARMACOCINÉTICOS | | | | | | |
|------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------|---|--|
| Sujeto | AUCINF_obs (h· μmol) | AUClast (h· μmol) | C_{max} (μmol) | T_{max} (h) | $V_z_F_obs$ (mg/(μmol)) | Cl_F_obs (mg/(h· μmol)) |
| 1 | 1.97 | 1.69 | 0.66 | 1.00 | 31.05 | 10.16 |
| 2 | 2.68 | 2.25 | 0.82 | 1.00 | 23.41 | 7.45 |
| 3 | 3.09 | 2.62 | 0.98 | 1.00 | 19.07 | 6.47 |
| 4 | 3.45 | 2.78 | 0.90 | 1.00 | 18.78 | 5.79 |
| 5 | 1.85 | 1.57 | 0.66 | 1.00 | 33.49 | 10.84 |
| 6 | 1.45 | 1.25 | 0.49 | 1.00 | 40.21 | 13.81 |
| Media | 2.415 | 2.026 | 0.750 | 1.000 | 27.669 | 9.087 |
| Desviación Estándar | 0.783 | 0.616 | 0.181 | 0.000 | 8.644 | 3.062 |

Tabla 12. Datos farmacocinéticos de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC. AUCINF_obs: el área bajo la curva del tiempo observado (desde el momento cero hasta que el fármaco es eliminado) frente a la concentración plasmática de MTX; AUClast: Área bajo la curva del tiempo desde el momento cero hasta la última concentración cuantificable frente a la concentración plasmática de MTX; C_{max} : concentración máxima; T_{max} : tiempo transcurrido hasta alcanzar la C_{max} ; $V_z_F_obs$: volumen aparente de distribución del fármaco observado; Cl_F_obs : aclaramiento plasmático del fármaco observado calculado como dosis/AUC ajustado por la biodisponibilidad. El perfil farmacocinético de MTX en cada uno de los sujetos se muestra en **Anexos**.

Para determinar si el MTX es capaz de inducir un estado de tolerancia a LPS, se midió la concentración de las citoquinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10 en plasma antes (basal) y 3, 24 y 120h después de la toma de MTX y tras la estimulación *ex vivo* durante 15h con LPS (**Figura 40A**). 120h post-MTX se detectó una menor concentración de IL-6 que a nivel basal en respuesta a LPS. También se detectó menor concentración de IL-6 en plasma en respuesta a LPS 120h post-MTX que 3h y 24h post-MTX (**Figura 40B**). Así mismo, la concentración de IL-1 β (**Figura 40C**) e IL-10 (**Figura 40D**) en respuesta a LPS fue significativamente menor 120h post-MTX que en las muestras basales y tras 3h (IL-1 β) y 24h (IL-10) post-MTX. Sin embargo, a pesar de que se observa una tendencia similar en el caso de TNF- α , la concentración de TNF- α en respuesta a LPS en plasma se redujo significativamente entre las muestras recogidas 3h y 24h post-MTX (**Figura 40E**). Estos resultados indican que la producción de las citoquinas IL-6, IL-1 β e IL-10 en respuesta a LPS en sangre total disminuye 5 días (120h) después de la toma de MTX.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el recuento de leucocitos totales, linfocitos, monocitos o neutrófilos o plaquetas antes y post-MTX (**Figura 40F**), lo que indica que la disminución de la concentración de citoquinas en respuesta a LPS tras la toma de MTX no se debe a que el fármaco disminuya la cantidad de leucocitos en sangre.

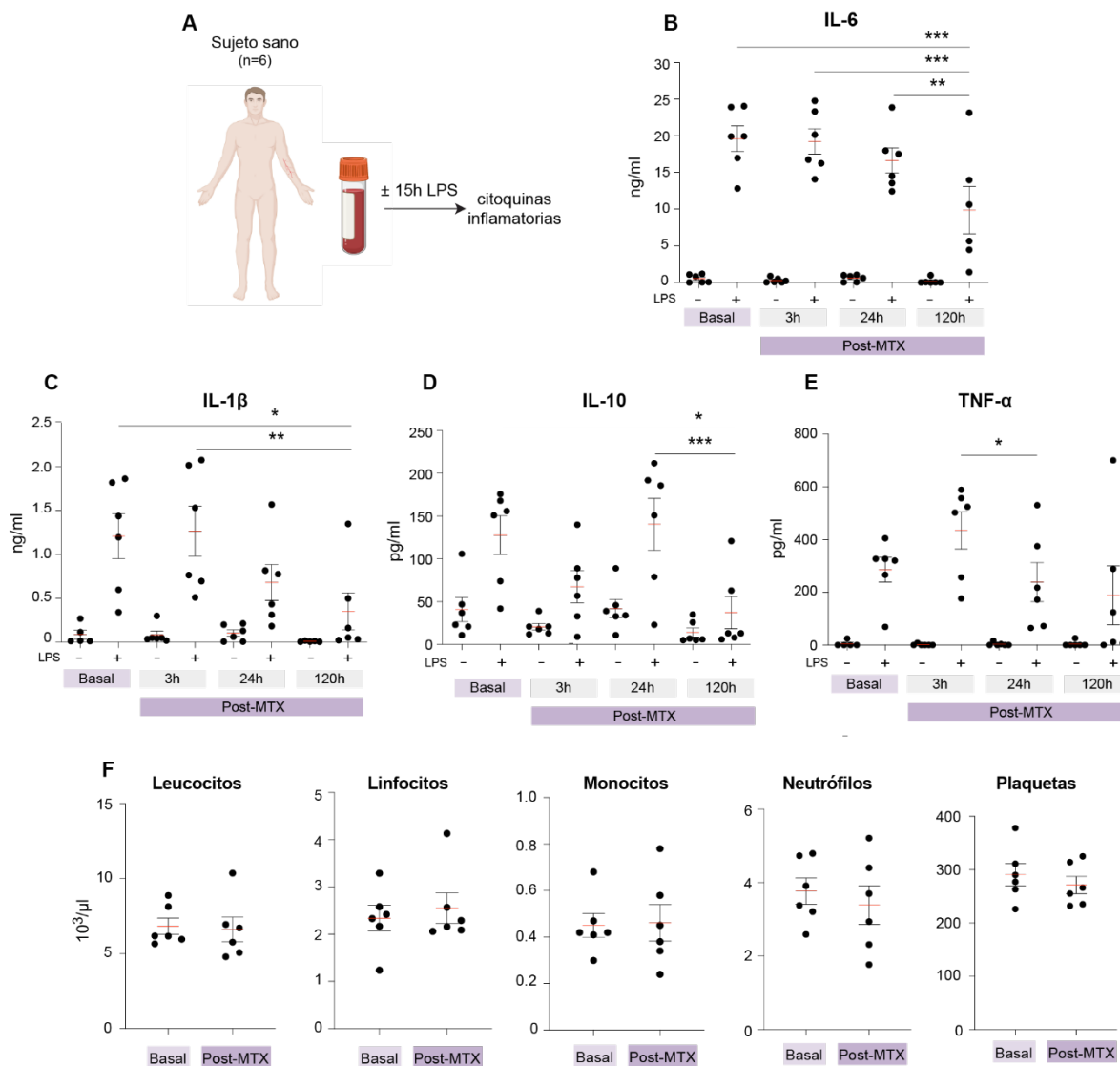


Figura 40. MTX *in vivo* disminuye la producción de citoquinas en respuesta a LPS en plasma. (A) Representación esquemática del diseño experimental. La sangre periférica extraída de los seis sujetos antes y después de la toma de MTX se estimuló durante 15h con LPS (10 ng/ml) y se midió la expresión de citoquinas inflamatorias. (B-E) Expresión de IL-6 (B), IL-1 β (ng/ml) (C), IL-10 (D) y TNF- α (pg/ml) (E) determinada mediante ELISA en el plasma de sujetos sanos en respuesta (+) o no (-) a LPS (15h) antes (basal) y 3, 24 y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX. Cada punto representa la medida de la concentración de la citoquina de un sujeto (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ANOVA). (F) Número de células de los tipos celulares sanguíneos (leucocitos, linfocitos, monocitos, neutrófilos y plaquetas) de voluntarios sanos antes (basal) y después de 7 días de la toma de MTX (Post-MTX). Cada punto representa la medida del número de cada tipo celular por donante (no significativo, *t-Student*). En B-F se indica la media \pm SEM de seis sujetos independientes.

MTX *in vivo* disminuye la producción de TNF- α en respuesta a LPS en monocitos

A partir de la extracción de sangre periférica de cada uno de los sujetos a nivel basal y post-MTX (3, 24 y 120h), se aislaron monocitos CD14⁺ y se midió la expresión de las citoquinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10 en el sobrenadante de cultivo tras la estimulación durante 3h con LPS (Figura 41A). Los monocitos produjeron significativamente menos TNF- α en respuesta a LPS a las 120h de la toma de MTX que 3h post-MTX (Figura 41C). Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la expresión de IL-6 e IL-1 β en respuesta a LPS (Figura 41B) en monocitos aislados de las muestras basales y monocitos post-MTX. No se detectó la producción de IL-10 en monocitos en respuesta a LPS en ninguna de las muestras analizadas (datos no mostrados).

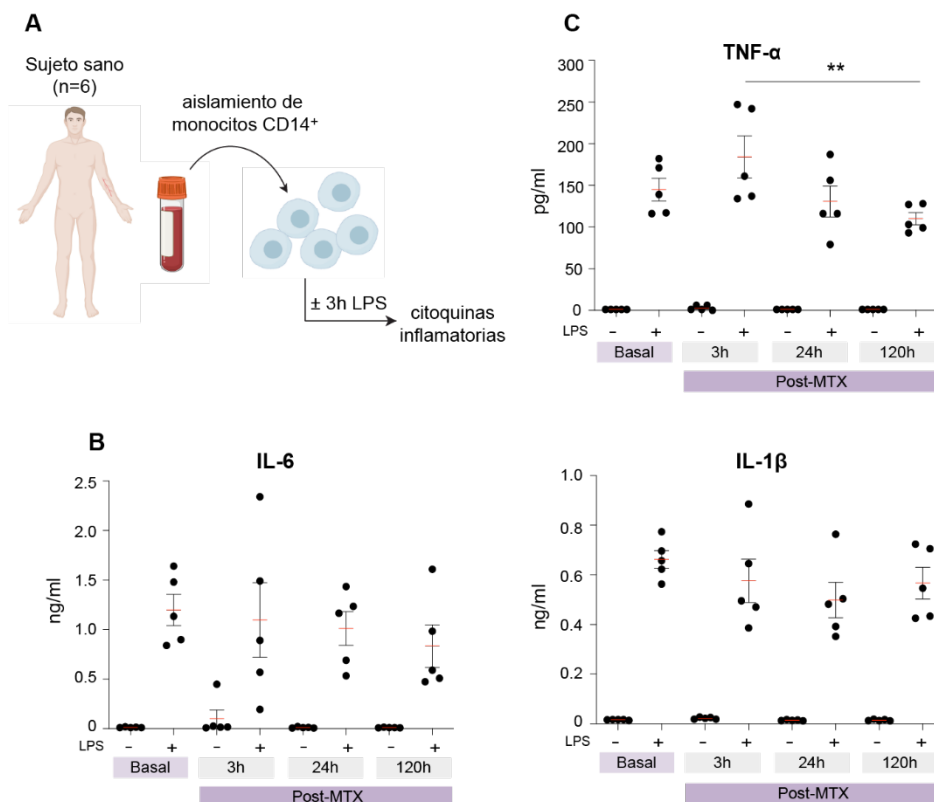


Figura 41. MTX *in vivo* disminuye la producción de TNF- α en respuesta a LPS en monocitos. (A) Representación esquemática del diseño experimental. A partir de la sangre periférica extraída de los seis sujetos antes y después de la toma de MTX se aislaron monocitos CD14⁺ se estimularon durante 3h con LPS (10 ng/ml) y se midió la expresión de citoquinas inflamatorias. (B-C) Expresión de IL-6, IL-1 β (ng/ml) (B) y TNF- α (pg/ml) (C) determinada mediante ELISA en monocitos de voluntarios sanos en respuesta (+) o no (-) a LPS (3h) antes (basal) y 3h, 24h y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX. Se indica la media \pm SEM de cinco sujetos independientes (** $p < 0.01$, ANOVA). Aunque el EudraCT 2017-002902-11 se realizó en 6 sujetos sanos, los datos de monocitos presentan una n=5 debido a la pérdida de una de las muestras del sujeto #3.

MTX *in vivo* promueve la adquisición de un perfil transcripcional menos proinflamatorio y más profibrótico en monocitos

Para evaluar los posibles cambios de expresión génica en monocitos tras la toma de MTX a distintos tiempos, se aisló el RNA, se determinó la secuenciación del transcriptoma mediante *RNAseq* y se comparó el perfil transcripcional de los monocitos recogidos a nivel basal y post-MTX (3h, 24h y 120h) (Figura 42A). Empleando las condiciones $adjp < 0.05$ y $\text{Log}_2|\text{FC}| > 1$ ningún gen varió su expresión de forma significativa significativa entre las diferentes condiciones. La agrupación jerárquica no supervisada (*heatmap*) de los genes diferencialmente expresados en los monocitos a nivel basal y post-MTX reveló que mientras que los monocitos 3 y 24h post-MTX mostraban un perfil transcripcional estrechamente relacionado con el de los monocitos a nivel basal, 120h post-MTX los monocitos presentaban un perfil de expresión génica muy diferente (Figura 42B). A continuación, mediante el análisis computacional de enriquecimiento en los conjuntos de genes *GSEA* (*Gene Set*

Enrichment Analysis) se analizó el transcriptoma de los monocitos a nivel basal y 3, 24 y 120h post-MTX (**Figura 42C**).

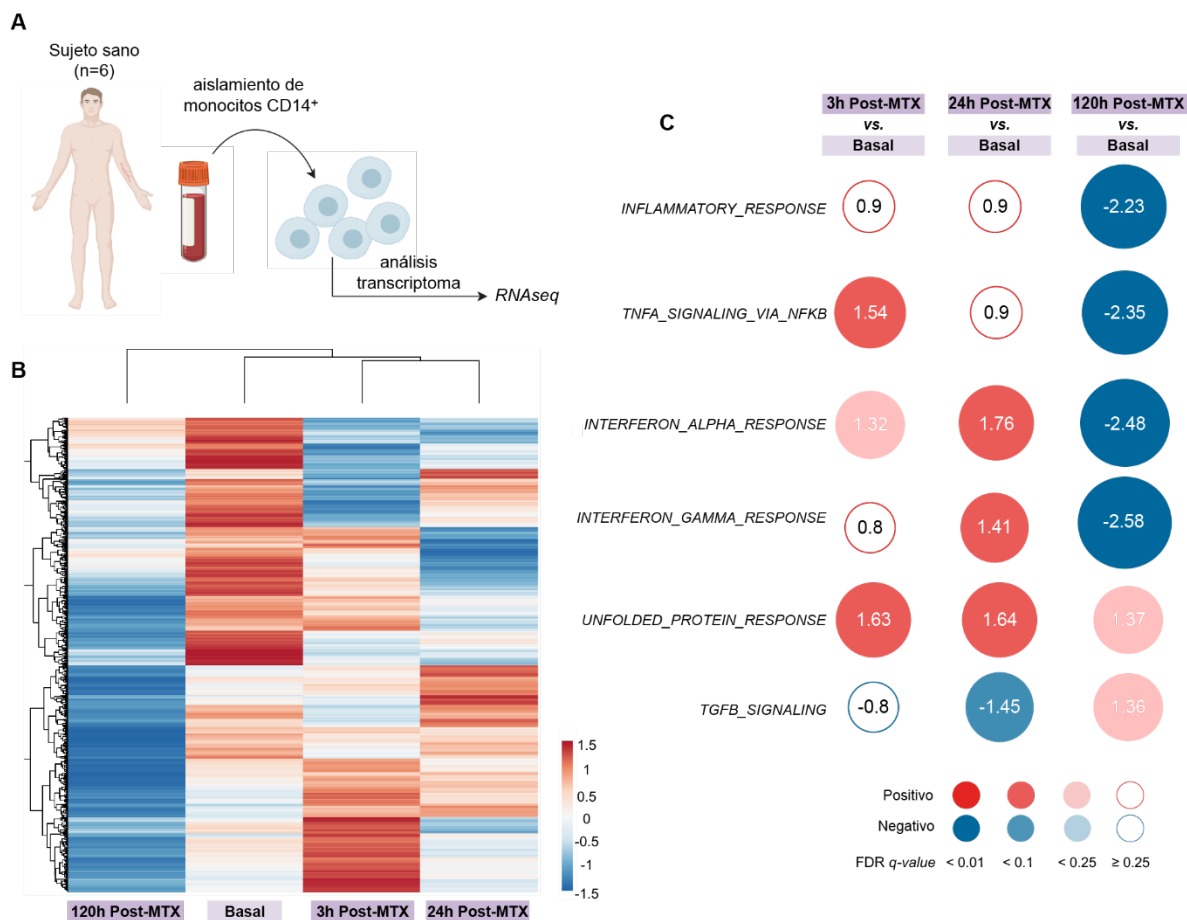


Figura 42. MTX *in vivo* promueve la adquisición de un perfil transcripcional menos proinflamatorio y más profibrótico en monocitos. (A) Se aisló el RNA de los monocitos CD14⁺ antes (basal) y 3, 24 y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX y se analizó el transcriptoma mediante *RNAseq*. (B) Agrupación jerárquica no supervisada que muestra el nivel de expresión génica de los genes diferencialmente expresados en monocitos de sujetos sanos (n=6) aislados a nivel basal y 3, 24 y 120h post-MTX. (C) Esquema representativo del análisis de *GSEA* que muestra el enriquecimiento en los conjuntos de genes indicados de los genes obtenidos de las listas ranqueadas (ordenadas por Log_2FC) del análisis *limma* de monocitos 3h post-MTX vs. basal, 24h post-MTX vs. basal y 120h post-MTX vs. basal. El área del círculo es proporcional al valor absoluto del *NES* (*Normalized Enrichment Score*) de la firma génica, indicado en el interior del círculo. La intensidad del color aumenta conforme aumenta la significación indicada por *FDR q-value* (*False Discovery Rate*). Se muestra en color rojo el enriquecimiento positivo y en azul, el negativo. El análisis de *GSEA* en cada conjunto genes indicado se muestra en **Anexos**.

En comparación con los monocitos aislados a nivel basal, el perfil génico de los monocitos 3h post-MTX reveló un enriquecimiento positivo significativo en el conjunto de genes regulados por NFκB en respuesta a *TNF* (*HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB*, NES: 1.54, FDR: 0.034) y en el conjunto de genes inducidos durante la respuesta a proteínas desplegadas (*HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE*, NES: 1.63, FDR: 0.014) y el perfil génico de los monocitos 24h post-MTX mostró un enriquecimiento positivo significativo en los conjuntos de genes regulados positivamente en respuesta a *IFNA* (*HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE*, NES: 1.76, FDR: 0.009) e *IFNG* (*HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE*, NES: 1.41, FDR: 0.086) además de en el conjunto de genes *HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE* (NES: 1.64, FDR: 0.018). En conjunto, estos resultados indican que el MTX promueve la adquisición de un perfil transcripcional proinflamatorio en monocitos a las 3 y 24h de su administración.

Sin embargo, el transcriptoma de los monocitos 120h post-MTX vs. basal reveló un enriquecimiento negativo significativo en el conjunto de genes implicados en la respuesta

inflamatoria (*HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE*, NES: -2.23, FDR: 0.000) y en los conjuntos de genes *HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB* (NES: -2.35, FDR: 0.000), *HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE* (NES: -2.58, FDR: 0.000) y *HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE* (NES: -2.48, FDR: 0.000) (**Figura 42B y 42C**). Además, el transcriptoma de los monocitos 120h post-MTX vs. basal mostró un enriquecimiento positivo significativo en el conjunto de genes regulados positivamente en respuesta a *TGFB1* (*HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALLING*, NES: 1.36, FDR: 0.1335) y el enriquecimiento en el conjunto de genes *HALLMARK_UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE* disminuyó y presentó menor significación (NES: 1.13, FDR: 0.1857) que monocitos 3 y 24h post-MTX vs. basal (**Figura 42B y 42C**). Estos resultados indican que el perfil transcriptómico de monocitos varía 5 días después de la toma de MTX, presentando un perfil transcripcional menos inflamatorio y más profibrótico y reparador que antes de la toma de MTX.

Previamente nuestro grupo de investigación ha demostrado que el MTX actúa selectivamente en macrófagos polarizados por GM-CSF (GM-MØ), a los que condiciona a la adquisición de un estado de *tolerancia* inmunológica frente a estímulos proinflamatorios como LPS o TNF- α . El mecanismo de *tolerancia cruzada* inducido por MTX en GM-MØ *in vitro* está mediado por un aumento de la expresión de *TNFAIP3*,¹⁸⁶ gen que codifica para la deubiquitina A20, regulador negativo de la señalización de NF κ B y MAPK por TLR4 y TNFR^{150,185,372}. Por ello, a partir de la extracción de sangre periférica de cada uno de los sujetos a nivel basal y post-MTX (3h, 24h y 120h), se diferenciaron monocitos a macrófagos con GM-CSF (GM-MØ) durante 7 días y se cuantificó en el sobrenadante de cultivo la concentración de las citoquinas IL-6 e IL-1 β tras la estimulación con LPS durante 3h (**Figura 43A**). No se detectaron diferencias significativas en la expresión de IL-6 e IL-1 β en respuesta a LPS (**Figura 43B**) en GM-MØ diferenciados a partir de los monocitos de las muestras basales y post-MTX. Por último, se analizó la expresión de *TNFAIP3* en las muestras de monocitos y GM-MØ de cada uno de los sujetos a nivel basal y post-MTX (3h, 24h y 120h). Aunque 24 y 120h post-MTX monocitos y GM-MØ mostraron mayores niveles de expresión del *mRNA* de *TNFAIP3* que a nivel basal, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (**Figura 43C y 43D**).

Globalmente, los resultados del Ensayo Clínico METOMAC “*Estudio de la acción tolerogénica de metotrexato sobre macrófagos como mecanismo de acción en enfermedades mediadas por mecanismos inmunes*” (EudraCT: 2017-002902-11) indican que MTX disminuye la producción de citoquinas en respuesta a LPS en monocitos y leucocitos de sangre periférica 5 días después de su administración. Además, el perfil transcriptómico de monocitos 5 días después de la toma de MTX resulta menos inflamatorio y más profibrótico que antes de la toma del fármaco. En consecuencia, estos resultados son compatibles con que la exposición *in vivo* a MTX promueve un estado de *tolerancia cruzada* frente a LPS en monocitos y leucocitos de sangre periférica y nos han permitido seleccionar el tiempo de 5 días después de la toma de MTX como tiempo-respuesta de visualización de los efectos de la memoria inmune innata por MTX para la realización de un posterior estudio observacional en pacientes con AR de reciente comienzo que vayan a iniciar tratamiento con MTX.

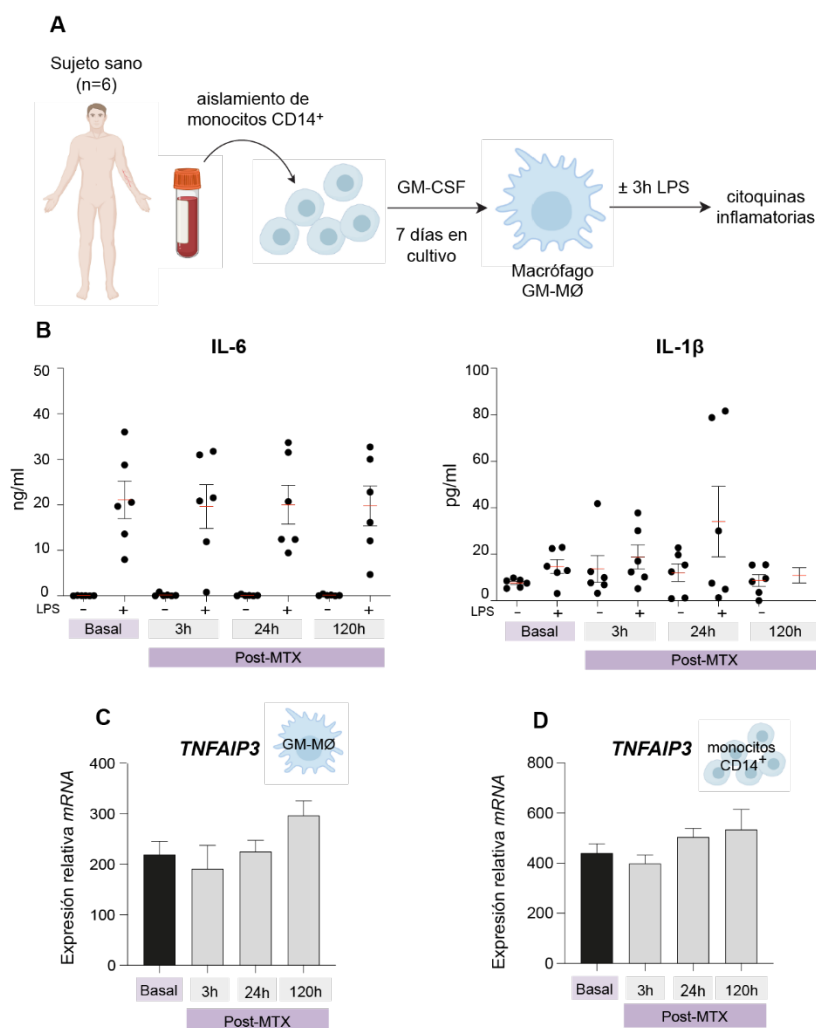


Figura 43. MTX *in vivo* no modifica la producción de citoquinas en respuesta a LPS en GM-MØ. (A) Representación esquemática del diseño experimental. A partir de la sangre periférica extraída de los seis sujetos antes y después de la toma de MTX se aislaron monocitos CD14⁺ y se diferenciaron durante 7 días a macrófagos con GM-CSF (GM-MØ). A día 7 se estimularon durante 3h con LPS (10 ng/ml) y se cuantificó la expresión de citoquinas inflamatorias. (B) Expresión de IL-6 (ng/ml) e IL-1 β (pg/ml) determinada mediante ELISA en GM-MØ de voluntarios sanos en respuesta (+) o no (-) a LPS (3h) antes (basal) y 3, 24 y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX. (C-D) Expresión relativa del *mRNA* de *TNFAIP3* determinada mediante RT-qPCR en GM-MØ (C) y monocitos (D) en voluntarios sanos antes (basal) y 3, 24 y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX. Los resultados se muestran como la expresión relativa, que indica la detección de cada *mRNA* en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia *TBP*. Se indica la media \pm SEM de seis sujetos independientes (no significativo, ANOVA).

CAPÍTULO II

Estudio de la capacidad del pemetrexed
para inducir un estado de tolerancia a
LPS en macrófagos

El tratamiento con PMX induce un perfil transcripcional proinflamatorio en macrófagos

Estudios previos del laboratorio han demostrado que el tratamiento con dosis bajas (50 nM) de MTX actúa selectivamente sobre macrófagos diferenciados con GM-CSF (GM-MØ) que expresan timidilato sintasa (TS). El MTX induce la expresión de un conjunto de genes con perfil inflamatorio y dependiente de p53 (GSE71253)¹⁹¹. Dado que el PMX, antagonista del ácido fólico y potente inhibidor de la enzima TS, es capaz de aumentar la expresión de algunos genes regulados por MTX (*CCL20*, *LIF*, *MET* y *GDF15*)¹⁹¹, se determinó el perfil génico global de macrófagos expuestos a PMX mediante *RNAseq*. Para ello, se diferenciaron monocitos a macrófagos humanos con GM-CSF en presencia (PMX GM-MØ) o ausencia (GM-MØ) de PMX (50 nM) durante 7 días y se compararon ambas firmas génicas (Figura 44A).

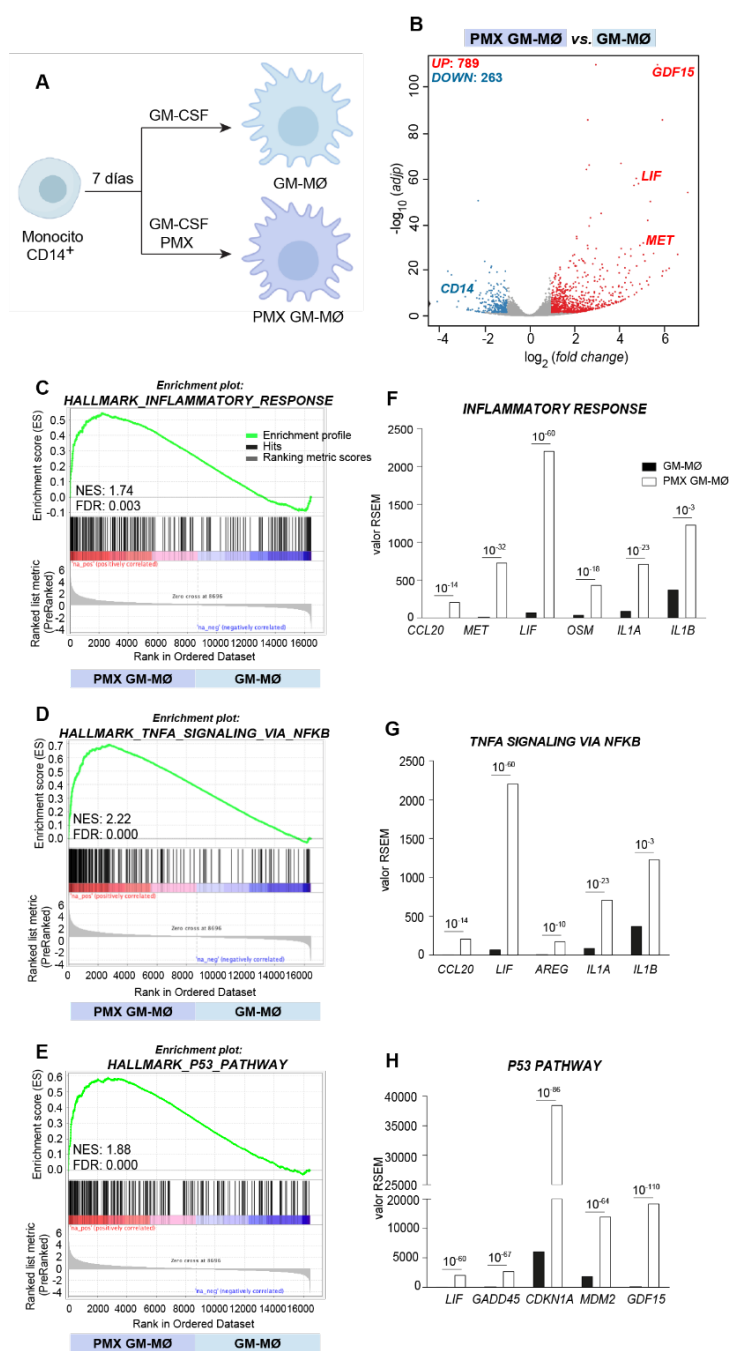


Figura 44. PMX induce un perfil génico proinflamatorio en GM-MØ.

(A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ purificados de sangre periférica de donantes sanos (*buffy coat*) se trataron (50 nM, PMX GM-MØ) o no (GM-MØ) con PMX al principio del proceso de diferenciación a macrófagos con GM-CSF. Los niveles de *mRNA* se determinaron a los 7 días en PMX GM-MØ y su control sin tratar (GM-MØ) mediante *RNAseq*. (B) *Volcano plot* que representa el perfil de expresión génica de PMX GM-MØ frente al perfil de expresión génica de GM-MØ en base al valor de *p* ajustado (*adjp* < 0.05, eje Y) y *Log₂ Fold Change* (*Log₂|FC|* > 1, eje X). Se indica el número de genes cuya expresión aumenta (UP) o disminuye (DOWN). El área punteada incluye los genes con *adjp* < 0.05 y se indican algunos de los genes diferencialmente expresados. (C-E) Análisis de *GSEA* de genes obtenidos de la lista ranqueada (ordenada por *Log₂FC*) del análisis *limma* de PMX GM-MØ frente a GM-MØ en los conjuntos de genes indicados. Se indican los valores de NES (*Normalized Enrichment Score*) y FDR (*False Discovery Rate*). El perfil de enriquecimiento se muestra en verde. (F-H) Niveles de expresión del *mRNA* mostrados en valores RSEM (*RNAseq by Expectation Maximization*) de GM-MØ (negro) y PMX GM-MØ (blanco) de los genes representativos de los conjuntos de genes indicados del análisis de *GSEA*. Se indica el valor de *adjp*

El tratamiento con PMX aumentó significativamente la expresión de 789 genes y disminuyó significativamente la expresión de 263 genes ($\text{Log}_2|\text{FC}| > 1$; $\text{adj}p < 0.05$) respecto a macrófagos sin tratar (GM-MØ), tal y cómo se indica en el *Volcano Plot* (**Figura 44B**) que muestra, además, genes de respuesta a antifolatos en macrófagos. Mediante el análisis computacional de enriquecimiento en los conjuntos de genes *GSEA* (*Gene Set Enrichment Analysis*), y en comparación con GM-MØ, el perfil génico de PMX GM-MØ reveló un enriquecimiento positivo significativo en los conjuntos de genes representativos de la respuesta inflamatoria (*HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE*, NES: 1.74, FDR: 0.003) (**Figura 44C**) y de la señalización de NFκB por *TNFA* (*HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB*, NES: 2.22, FDR: 0.000) (**Figura 44D**). Dentro de los genes más significativos que se posicionan en el *leading edge* se encontraron *CCL20*, *MET*, y *LIF* junto con *IL1A* e *IL1B* (**Figura 44F** y **44G**). Además, de forma similar al tratamiento con MTX¹⁹¹, el perfil génico de PMX GM-MØ mostró un enriquecimiento positivo significativo en el conjunto de genes característicos de la señalización de p53 (*HALLMARK_P53_PATHWAY*, NES: 1.88, FDR: 0.000) (**Figura 44E**) con *LIF*, *CDKN1A* y *GDF15*, genes diana de p53^{264,265}, en su *leading edge* (**Figura 44H**). En conjunto, estos resultados demuestran que el PMX promueve la adquisición de un perfil transcripcional proinflamatorio y de una firma génica dependiente de p53 en GM-MØ.

Con el objetivo de comparar los perfiles de expresión génica de GM-MØ en respuesta a diferentes antifolatos, se comparó el transcriptoma de macrófagos tratados con PMX y con MTX (PMX GM-MØ y MTX GM-MØ) (GSE71253) (**Figura 45A**) y se encontró gran similitud entre ambas firmas génicas. Como se indica en el *Diagrama de Venn* (**Figura 45B**), MTX GM-MØ y PMX GM-MØ mostraron un aumento común de la expresión de 285 genes (de un total de 788 genes) y una disminución común de la expresión de 50 genes (de un total de 263 genes). Además, el análisis de *GSEA* del transcriptoma de PMX GM-MØ respecto a GM-MØ reveló un enriquecimiento positivo significativo del conjunto de genes cuya expresión se ve aumentada por MTX (*MTX-regulated genes*, NES: 2.84, FDR: 0.000) (**Figura 45C**) y, un enriquecimiento negativo en el conjunto de genes cuya expresión disminuye por MTX (*MTX-downregulated*, NES: -3.53, FDR: 0.000) (**Figura 45D**). El perfil transcriptómico de PMX GM-MØ y MTX GM-MØ mostraron un enriquecimiento positivo significativo en los conjuntos de genes *HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE*, *HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB* y genes diana de LXR (*LXR_TARGETS*) con respecto a GM-MØ (**Figura 45E**). Respecto a las diferencias entre ambos antifolatos, únicamente el tratamiento con MTX potenció un enriquecimiento positivo en genes que engloban las enzimas encargadas de la síntesis del colesterol (*ENZYMES_CHOLESTEROL_SYNTHESIS*, NES: 1.82, FDR: 0.000) y en genes dependientes de *SREBP* (*SREBP_DEPENDENT_GENE_SET*, NES: 1.84, FDR: 0.002) (**Figura 45E**).

Globalmente, estos resultados demuestran que ambos antifolatos ejercen un efecto transcripcional similar en GM-MØ y que promueven la adquisición de un perfil génico más proinflamatorio y dependiente de p53.

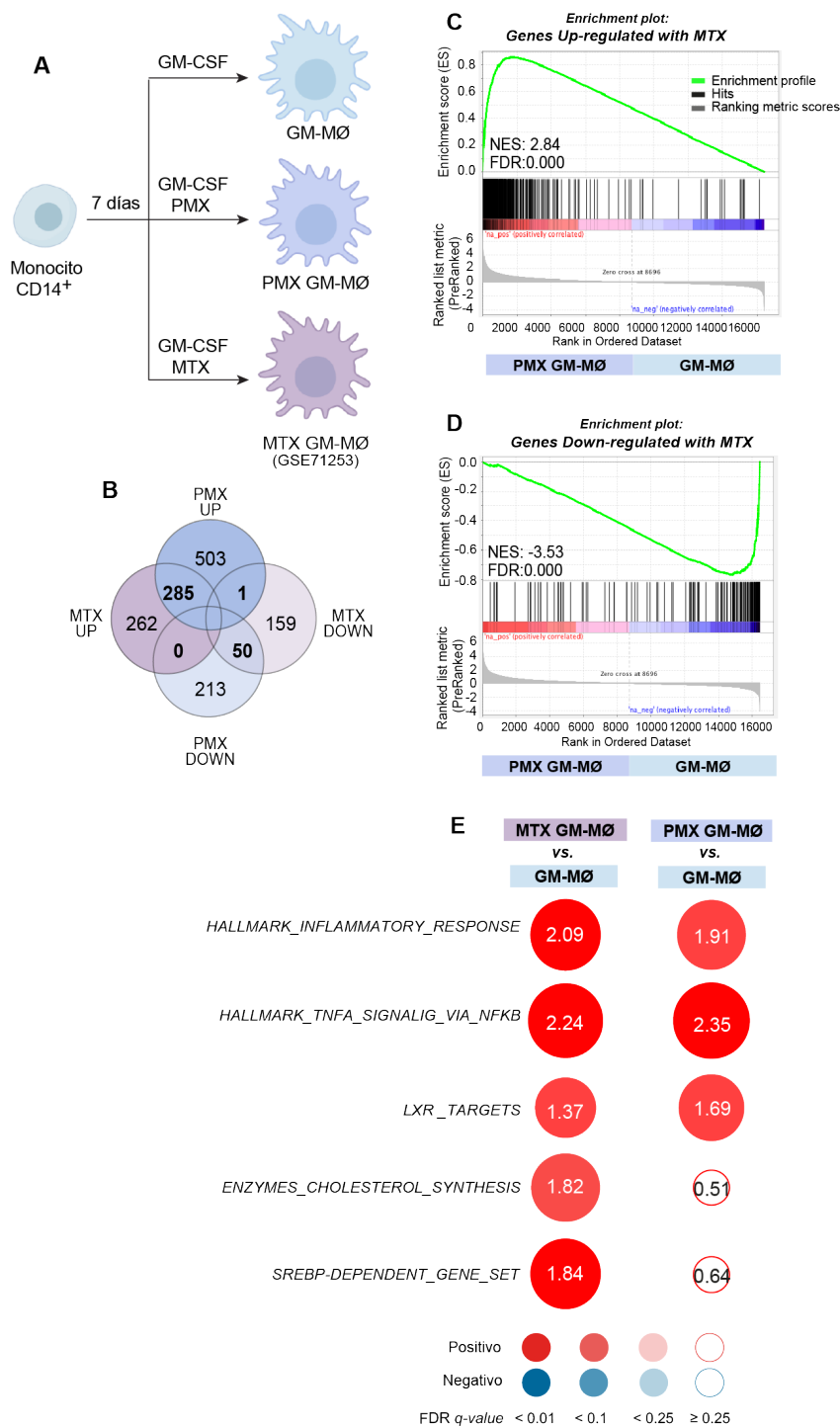


Figura 45. MTX y PMX promueven la adquisición de un perfil génico proinflamatorio en GM-MØ. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ se trataron con PMX (50 nM, PMX GM-MØ) o con MTX (50 nM, MTX GM-MØ) al principio del proceso de diferenciación de macrófagos con GM-CSF. Los niveles de mRNA se determinaron a los 7 días en PMX GM-MØ, MTX GM-MØ y su control sin tratar (GM-MØ). (B) Diagrama de Venn que muestra la comparación del número de genes significativamente (*adjp* < 0.05, $\log_2|FC| > 1$) regulados por PMX en GM-MØ con los genes significativamente modulados por MTX en GM-MØ. Se muestra el número de genes que aumenta (UP) o disminuye (DOWN) en cada caso y el solapamiento de los círculos, el número de genes en común entre PMX GM-MØ y MTX GM-MØ. (C-D) Análisis de GSEA de genes obtenidos de la lista ranqueada (ordenadas por Log₂FC) del análisis *limma* de PMX GM-MØ vs. GM-MØ en los conjuntos de genes indicados. Se indican los valores de NES y FDR. El perfil de enriquecimiento se muestra en verde. (E) Esquema representativo del análisis de GSEA que muestra el enriquecimiento en los conjuntos de genes indicados de los genes obtenidos de comparación las listas ranqueadas (ordenada por Log₂FC) del análisis *limma* de PMX GM-MØ vs. GM-MØ y MTX GM-MØ vs. GM-MØ. El área del círculo es proporcional al valor absoluto del NES de la firma génica, indicado en el interior del círculo. La intensidad del color aumenta conforme aumenta la significación (*FDR q-value*). Se muestra en color rojo el enriquecimiento positivo.

El tratamiento con PMX promueve la adquisición de un estado de tolerancia transcripcional a LPS en macrófagos

Los macrófagos son capaces de mostrar características de memoria inmunológica tras una estimulación transitoria, de forma que, ante un segundo estímulo responden de forma atenuada, fenómeno conocido como *tolerancia*, o aumentada, *trained immunity* o *inmunidad entrenada* 135,144,145. Dado que el MTX condiciona a GM-MØ a la adquisición de un estado de tolerancia a LPS 186, se quiso determinar la respuesta a la estimulación con LPS en PMX GM-MØ a nivel transcripcional. Para ello, se diferenciaron monocitos a macrófagos en ausencia (LPS GM-MØ) o en

presencia de PMX (LPS PMX GM-MØ), ácido folínico (LPS FolAc GM-MØ) o de PMX y ácido folínico (LPS PMX+FolAc GM-MØ) y se determinó su perfil de expresión génica mediante *RNAseq* tras la estimulación con LPS (3h) (**Figura 46A**). El ácido folínico (FolAc, 5-formil-THF), forma reducida del ácido fólico²⁰⁹, se empleó como competidor en exceso (100x) para determinar la capacidad de PMX de actuar como fármaco antifolato. En comparación con LPS GM-MØ, la estimulación con LPS aumentó significativamente la expresión de 355 genes, mientras que disminuyó la expresión de 273 genes en LPS PMX GM-MØ ($\text{Log}_2|\text{FC}| > 1$; $\text{adj}p < 0.05$) (**Figura 46B**). Sin embargo, ninguno de estos cambios en expresión génica se detectó en presencia de PMX y ácido folínico (LPS PMX+FolAc GM-MØ), cuyo transcriptoma resultó similar al de macrófagos estimulados con LPS en presencia de ácido folínico (LPS FolAc GM-MØ) (**Figura 46C**). Estos resultados demuestran que el efecto transcripcional de PMX en macrófagos estimulados con LPS depende del metabolismo de un carbono (OCM).

El análisis computacional de *GSEA* reveló que el perfil génico de LPS PMX GM-MØ presentaba un enriquecimiento significativo negativo en conjuntos de genes implicados en la señalización de *IL6* vía JAK-STAT3 (*IL6_JAK_STAT3_SIGNALING*, NES: -2.25, FDR: 0.001) y en la respuesta al *IFNA* (*INTERFERON_ALPHA_RESPONSE*, NES: -2.00, FDR:0.001) e *IFNG* (*INTERFERON_GAMMA_RESPONSE*, NES: -2.46, FDR: 0.001), así como en los conjuntos de genes *HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE* (NES: -2.13, FDR: 0.000) y *HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFkB* (NES: -2.35, FDR: 0.000) en comparación con LPS GM-MØ. (**Figura 46D**). Sin embargo, en presencia de ácido folínico (LPS PMX+FolAc GM-MØ vs. LPS FolAc GM-MØ) no se observó el enriquecimiento negativo en los conjuntos de genes *HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE* (NES: 1.14, FDR: 0.3605), *HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFkB* (NES: 0.76, FDR: 1.000) e *IL6_JAK_STAT3_SIGNALING* (NES: 0.921, FDR: 0.866) lo que demostró, nuevamente, la especificidad del efecto transcripcional de PMX en macrófagos (**Figura 46D**). Estos resultados demuestran que la presencia de PMX durante la diferenciación de macrófagos disminuye la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria dependiente de LPS, lo que es compatible con que PMX promueve la adquisición de un estado de tolerancia transcripcional a LPS.

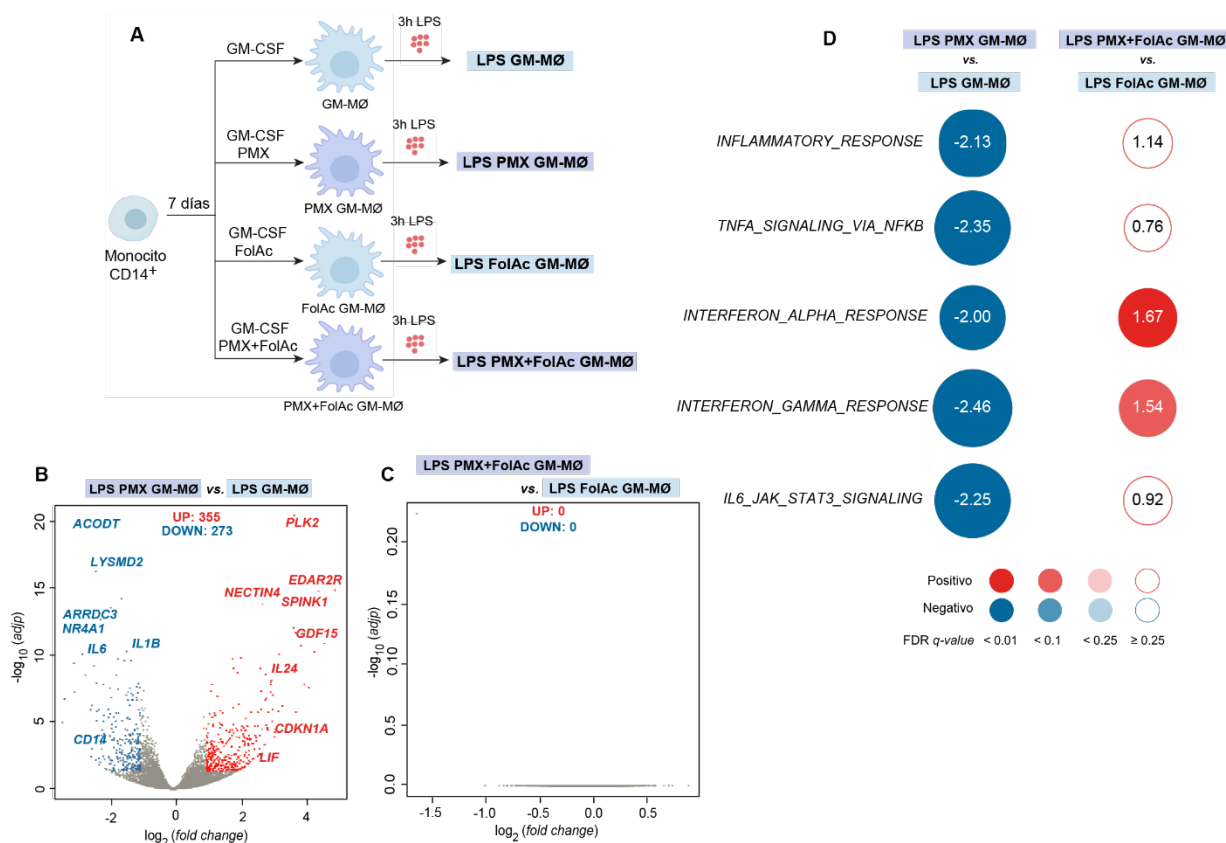


Figura 46. PMX promueve un estado de tolerancia transcripcional a LPS en GM-MØ. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ sin tratar (LPS GM-MØ), tratados con PMX (50 nM, LPS PMX GM-MØ), ácido fólico (5µM, LPS FolAc GM-MØ) o ambos (LPS PMX+FolAc GM-MØ) se diferenciaron durante 7 días a macrófagos con GM-CSF. A día 7 se estimularon durante 3h con LPS (10 ng/ml) y se determinaron los niveles de expresión mediante *RNAseq*. (B-C) *Volcano plot* que representa el perfil de expresión génica de LPS PMX GM-MØ vs. GM-MØ (B) y de LPS PMX+FolAc GM-MØ vs. LPS FolAc GM-MØ (C) en base al valor de *p* ajustado (*adjp* < 0.05, eje Y) y *Log₂ Fold Change* (*Log₂|FC|* > 1, eje X). Se indica el número de genes cuya expresión aumenta (UP) o disminuye (DOWN). El área punteada incluye los genes con *adjp* < 0.05 y se indican algunos de los genes expresados diferencialmente en cada caso. (D) Esquema representativo del análisis de GSEA que muestra el enriquecimiento en los conjuntos de genes indicados de los genes obtenidos de comparación las listas ranqueadas del análisis *limma* de LPS PMX GM-MØ vs. LPS GM-MØ y LPS PMX+FolAc GM-MØ vs. LPS FolAc GM-MØ tras 3h de estimulación LPS. El área del círculo es proporcional al valor absoluto del NES de la firma génica, indicado en el interior del círculo. La intensidad del color aumenta conforme aumenta la significación (*FDR q-value*). Se muestra en color rojo el enriquecimiento positivo y en azul, el negativo. El análisis de GSEA en cada conjunto genes indicado se muestra en **Anexos**.

El análisis de GSEA también reveló que el transcriptoma de LPS PMX GM-MØ vs. LPS GM-MØ presentaban un enriquecimiento positivo significativo en el conjunto de genes *HALLMARK_P53_PATHWAY* (NES: 1.5, FDR: 0.081) (Figura 47A) que no se detectó en presencia de PMX y ácido fólico (NES: -0.89, FDR: 1.0) (Figura 47B). Por lo tanto, y al igual que ocurría de forma basal (sin estimulación con LPS), el PMX potenció la firma génica dependiente de p53 en macrófagos estimulados con LPS. Para analizar la influencia de p53 en la modulación génica de PMX GM-MØ tras la estimulación por LPS, los monocitos se trataron con PMX en presencia de pifitrina-α (PFT), inhibidor específico de p53 (Figura 47C y 47D) y se midió la expresión de *GDF15*, *LIF* y *CDKN1A*, genes diana de p53^{264,265} que explican la señal de enriquecimiento del perfil génico de PMX GM-MØ, tal y como se muestra en la Figura 44F, 44G y 44H. El tratamiento con PFT disminuyó de manera dosis-dependiente la expresión del *mRNA* de *GDF15*, *LIF* y *CDKN1A* en LPS PMX GM-MØ (Figura 47E y 47F). Estos resultados, en conjunto, sugieren que PMX induce un estado de tolerancia transcripcional a LPS en macrófagos dependiente de p53.

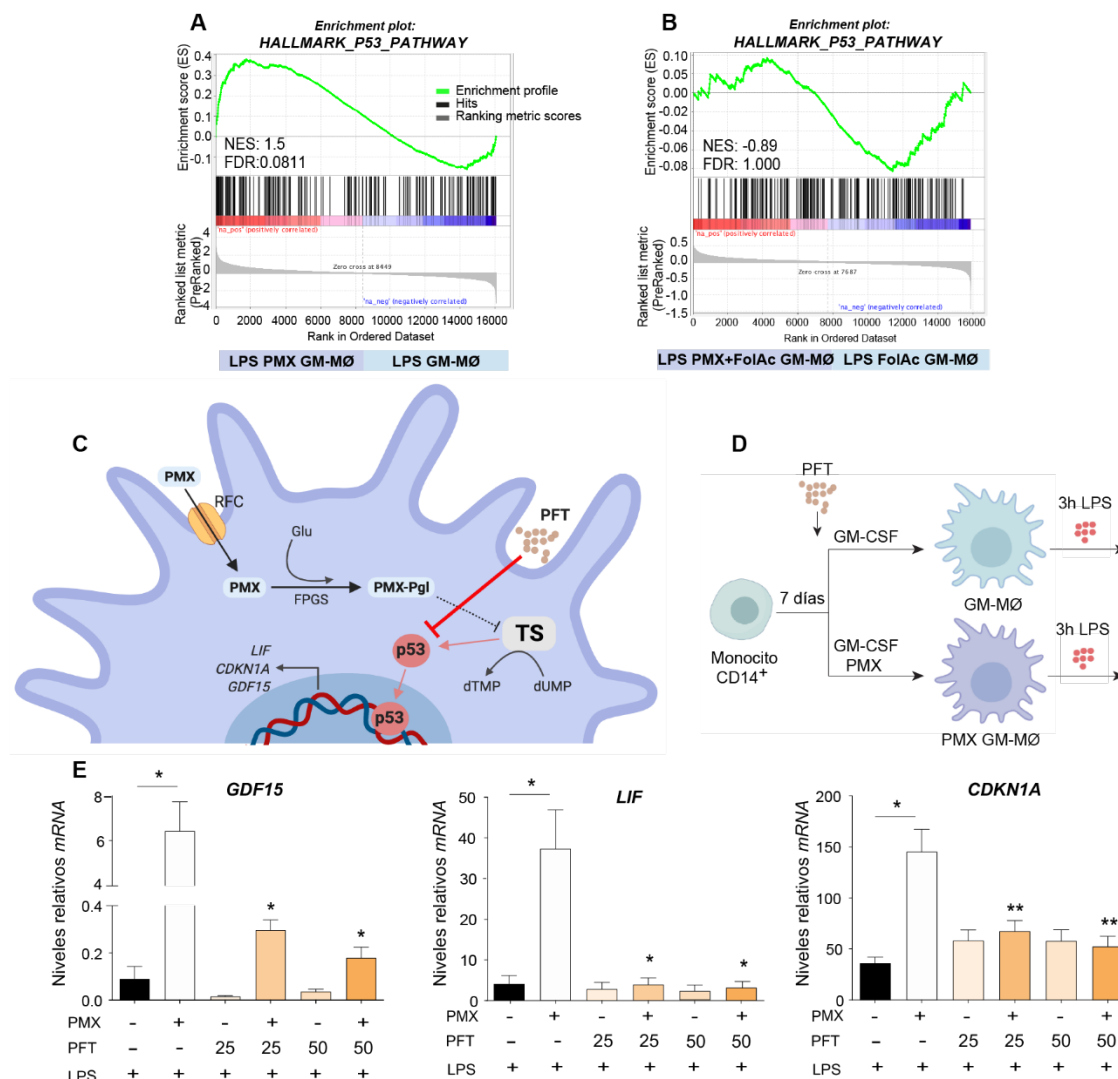


Figura 47. El estado de tolerancia transcripcional inducido por PMX en GM-MØ es dependiente de p53. (A, B) Análisis de GSEA de genes obtenidos de la lista ranqueada del análisis *limma* de LPS PMX GM-MØ vs. LPS GM-MØ y LPS PMX+FolAc GM-MØ vs. LPS FolAc GM-MØ tras 3h estimulación LPS en el conjunto de genes *HALLMARK_P53_PATHWAY*. Se indican los valores de NES y FDR. El perfil de enriquecimiento se muestra en verde. **(C)** Representación esquemática del bloqueo de p53 por pifitrina- α (PFT). **(D)** Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ sin tratar (GM-MØ) o tratados con PMX (50 nM, PMX GM-MØ) en presencia o ausencia de PFT (25-50 μ M) se diferenciaron durante 7 días a macrófagos con GM-CSF. Los niveles de *mRNA* se determinaron a día 7 tras 3h de estimulación con LPS (10 ng/ml). **(E)** Expresión relativa del *mRNA* de *GDF15*, *LIF* y *CDKN1A* determinada mediante RT-qPCR en GM-MØ en ausencia (-) o presencia (+) de PMX y 25 μ M (25) o 50 μ M (50) de PFT tras la estimulación con LPS. Los resultados se muestran como la expresión relativa, que indica la detección de cada *mRNA* en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia *TBP*. Se indica la media \pm SEM de 4 donantes independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *t-Student*).

El tratamiento con PMX promueve la adquisición de un estado de tolerancia funcional a LPS en macrófagos

A continuación, para determinar si PMX promueve la adquisición de un estado de tolerancia funcional a LPS se midió, a nivel de *mRNA* y de proteína, la concentración de las citoquinas IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10 en PMX GM-MØ y GM-MØ tras la estimulación con LPS (**Figura 48A**). Se detectó una disminución significativa en la expresión de *mRNA* de *IL6* e *IL1 β* (3h) (**Figura 48B**) y de la producción de IL-6 (3 y 24h), TNF- α (3h) e IL-10 (24h) en respuesta a LPS en macrófagos tratados con PMX respecto a GM-MØ (**Figura 48C**). El efecto inhibitorio de PMX sobre la expresión de *IL6* e *IL1 β* y la producción de IL-6 y TNF- α en respuesta a LPS se revirtió en presencia de ácido fólico (PMX+FolAc

GM-MØ (Figura 48D y 48E), lo que demostró nuevamente la especificidad del PMX como inhibidor del metabolismo de un carbono. Los resultados demuestran que el PMX disminuye tanto la expresión como la producción de citoquinas inflamatorias en respuesta al ligando de TLR4 LPS. Estos resultados, junto con los datos de expresión génica (Figura 46), indican que el PMX promueve la adquisición de un estado de tolerancia a nivel transcripcional y funcional en macrófagos GM-MØ y que dichos efectos están mediados por el bloqueo del OCM.

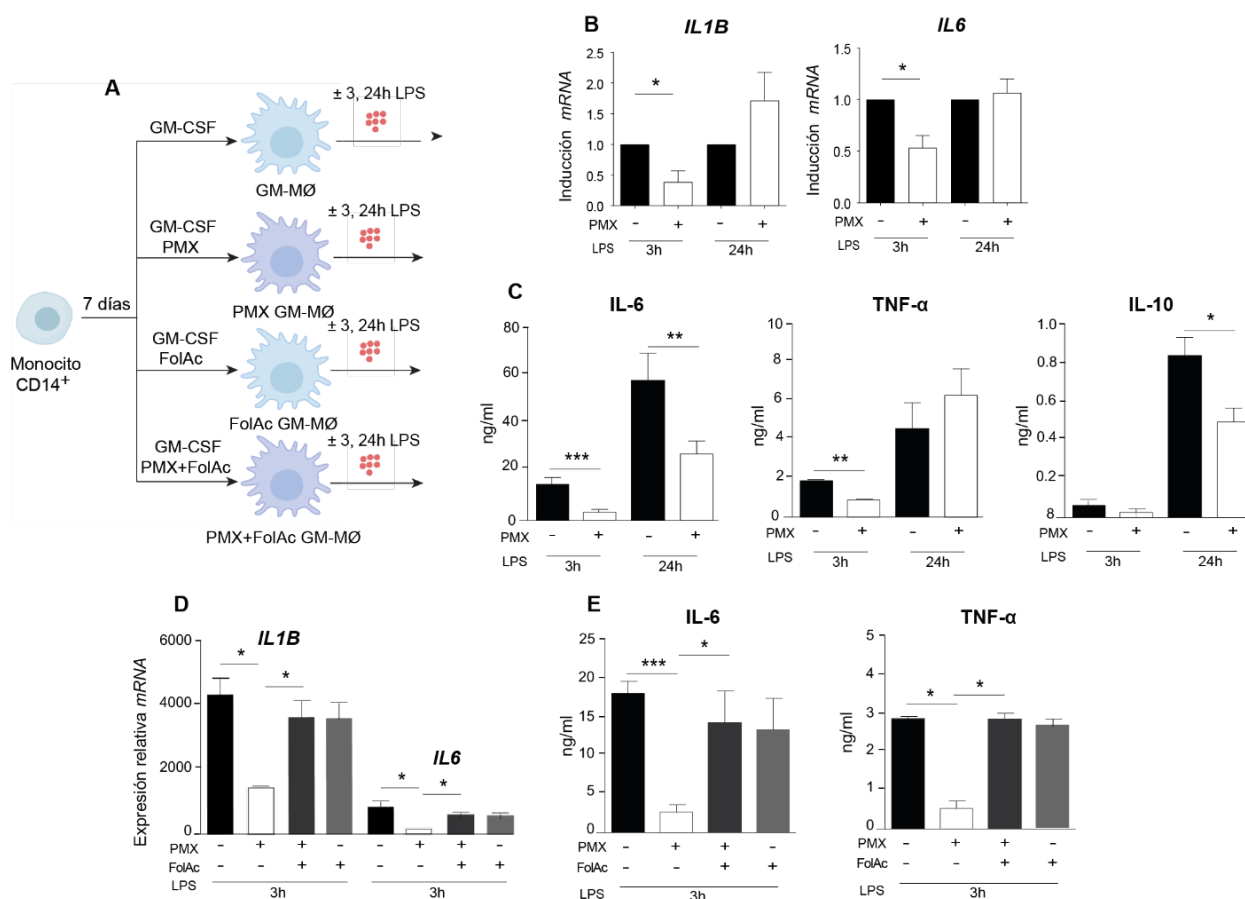


Figura 48. PMX disminuye la producción de citoquinas inflamatorias en respuesta a LPS en GM-MØ. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ sin tratar (GM-MØ), tratados con PMX (50 nM, PMX GM-MØ), ácido fólico (5µM, FolAc GM-MØ) o ambos (PMX+FolAc GM-MØ) se diferenciaron durante 7 días a macrófagos con GM-CSF. Los niveles de *mRNA* se determinaron a día 7 tras 3 y 24h de estimulación con LPS (10 ng/ml). (B) Expresión relativa del *mRNA* de *IL1B* e *IL6* determinada mediante RT-qPCR en GM-MØ generados en ausencia (-) o presencia (+) de PMX tras la estimulación con LPS a diferentes tiempos (3 y 24h). Los resultados se muestran como porcentaje de inducción, que indica la expresión de cada gen en las células tratadas con PMX respecto a su expresión en las células control. Los valores en ausencia de PMX se normalizaron a 1. (C) Expresión de IL-6, TNF-α e IL-10 determinada mediante ELISA en el sobrenadante de cultivo de GM-MØ generados en ausencia (-) o presencia (+) de PMX tras la estimulación con LPS a diferentes tiempos (3 y 24h). En B, C se indica la media ± SEM de 7-10 donantes independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *t-Student*). (D) Expresión relativa del *mRNA* de *IL1B* e *IL6* en GM-MØ generados en ausencia (-) o presencia (+) de PMX, ácido fólico (FolAc) o ambos tras la estimulación con LPS (3h). Los resultados se muestran como la expresión relativa, que indica la detección de cada *mRNA* en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia *TBP*. (E) Expresión de IL-6 y TNF-α en el sobrenadante de cultivo de GM-MØ generados en ausencia (-) o presencia (+) de PMX, ácido fólico o ambos tras la estimulación con LPS (3h). En D, E se indica la media ± SEM de 3-5 donantes independientes (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ANOVA).

PMX atenúa la señalización por TLR4 en respuesta a LPS en macrófagos

La tolerancia a endotoxina (TE) en macrófagos está asociada con defectos en la señalización de TLR4 a diferentes niveles (ver *Introducción*, apartado 2.5) como una menor formación del complejo TLR4-MyD88 y una disminución en la actividad de IRAK^{150,185}. Para determinar los mecanismos moleculares subyacentes al estado de tolerancia a LPS inducida por PMX, se evaluó el efecto de PMX

sobre la activación y expresión de proteínas de las vías de señalización dependientes de TLR4. Para ello, se generaron GM-MØ, PMX GM-MØ, FolAc GM-MØ y PMX+FolAc GM-MØ y se estimularon con LPS a diferentes tiempos (0, 15, 30, 60 min, 2, 3 y 24h) (**Figura 49A**) para determinar el nivel de activación de MAPK, NFκB, IRF3 y STAT1. La estimulación con LPS indujo menor activación de p38 (pp38) y JNK (pJNK) (15 y 30 min) en PMX GM-MØ que en GM-MØ (**Figura 49B**). Sin embargo, la estimulación con LPS incrementó la fosforilación de ERK1/2 (pERK) de manera sostenida en PMX GM-MØ respecto a GM-MØ (**Figura 49B**). Como medida de la activación de NFκB, se analizaron los niveles de expresión de IκBα, proteína que recluta al dímero activo (p50 y RelA) e impide su traslocación al núcleo ¹⁸¹. La estimulación con LPS disminuyó la degradación de IκBα en PMX GM-MØ (15 min) (**Figura 49C**) respecto a los macrófagos control, lo que indica una menor activación de NFκB. Estos resultados muestran como el PMX atenúa, en parte, la señalización de TLR4 dependiente del adaptador MyD88 en GM-MØ en respuesta a LPS.

La señalización por TLR4 dependiente de TRIF es más tardía que la MyD88-dependiente y está implicada en la producción de IFN de tipo I ¹⁸². Los resultados de *Western blot* muestran que LPS indujo una menor activación de IRF3 (pIRF3) (30 y 60 min) (**Figura 49D**) y de STAT1 (pSTAT1) (2h) (**Figura 49E**) en PMX GM-MØ respecto a GM-MØ. Además, tal y como se ha observado en experimentos anteriores, el efecto de la disminución de la activación de IRF3 (pIRF3) inducido por PMX se revertió en presencia de ácido folínico, indicando la especificidad del antifolato (**Figura 49F**). Por último, para relacionar los cambios en activación de las proteínas de la ruta de TRIF con la expresión de citoquinas diana, se midieron los niveles de producción de IFN-β y CXCL10 en el sobrenadante de cultivo de macrófagos PMX GM-MØ y GM-MØ. Se cuantificó una disminución significativa de IFN-β (3h) (**Figura 49G**) y CXCL10 (24h) (**Figura 49H**) en respuesta a LPS en presencia de PMX. Estos resultados indican que el tratamiento con PMX disminuye la activación de proteínas implicadas en la ruta de señalización de TLR4 dependiente del adaptador TRIF en respuesta a LPS en GM-MØ.

En su conjunto, los datos demuestran cómo la exposición continua al antifolato PMX atenúa la activación de proteínas implicadas en la señalización de TLR4, tanto MyD88- como TRIF-dependientes, y disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1β, TNF-α, IFN-β y CXCL10) en respuesta a LPS en GM-MØ.

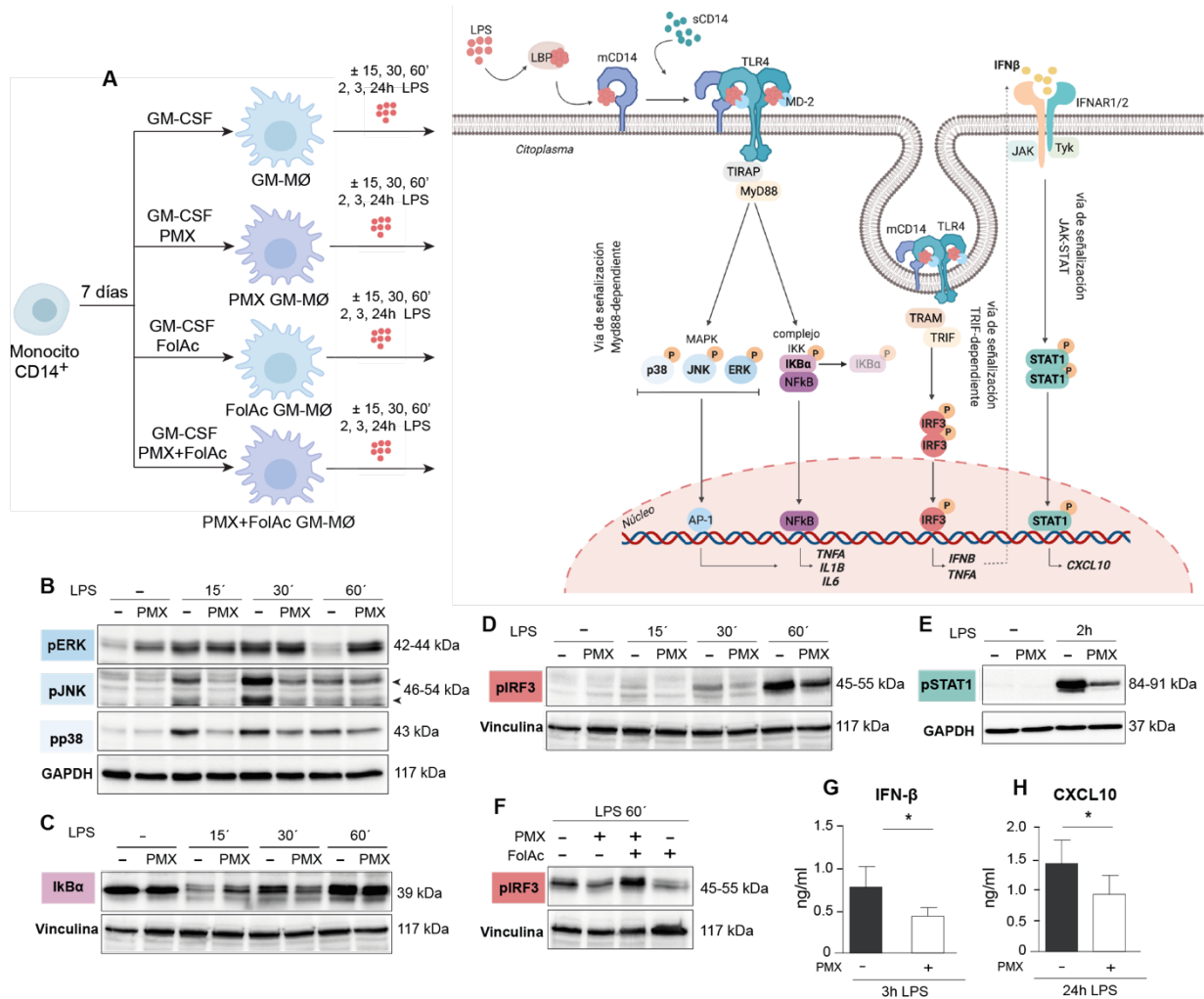


Figura 49. El PMX disminuye la señalización por TLR4 en respuesta a LPS en GM-MØ. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ sin tratar (GM-MØ), tratados con PMX (50 nM, PMX GM-MØ), ácido fólico (5μM, FolAc GM-MØ) o ambos (PMX+FolAc GM-MØ) se diferenciaron durante 7 días a macrófagos con GM-CSF. Los niveles de proteína se determinaron a día 7, a nivel basal, y, tras diferentes tiempos de estimulación con LPS (10 ng/ml). (B-D) Análisis de *Immunoblot* de pERK, pJNK y pp38 (B), IκBα (C) y pIRF3 (D) en GM-MØ generados en ausencia (-) o presencia (PMX) de PMX sin estimular (-) y estimulados con LPS a diferentes tiempos (15, 30 y 60 min). Se muestran como controles de carga la expresión de GAPDH (B) y Vinculina (C-D). (E) Análisis de *Immunoblot* de pSTAT1 en GM-MØ generados ausencia (-) o presencia (PMX) de PMX sin estimular (-) y estimulados con 2h de LPS. Se muestra como control de carga la expresión de GAPDH. (F) Análisis de *Immunoblot* de pIRF3 en GM-MØ generados ausencia (-) o presencia (+) de PMX (PMX), ácido fólico (FolAc) o ambos estimulados 60 min con LPS. En B-F se muestra un experimento representativo de 4-5 donantes independientes y se indica el peso molecular (kDa) de cada proteína de interés. (G, H) Expresión de IFN-β (G) y CXCL10 (H) determinada mediante ELISA en el sobrenadante de cultivo de GM-MØ generados en ausencia (-) o presencia (+) de PMX tras la estimulación con LPS (3 o 24h). Se indica la media ± SEM de 4-5 donantes independientes (* $p < 0.05$, *t-Student*).

MTX y PMX regulan la expresión de CD14 en macrófagos

A nivel molecular, el fenómeno de TE en macrófagos se asocia a una disminución en la expresión del receptor TLR4^{150,164} y en línea con esta modulación, los resultados de *RNAseq* de GM-MØ y PMX GM-MØ mostraron que la expresión de TLR4 disminuyó significativamente en presencia de PMX respecto a las células sin tratar (Figura 50A). Este resultado se validó en muestras adicionales (Figura 50B), donde la expresión del *mRNA* de *TLR4* disminuyó significativamente con el tratamiento de PMX. Sin embargo, no hubo variaciones en la expresión de TLR4 a nivel de proteína entre GM-MØ y PMX GM-MØ (Figura 50C). Además de la asociación de la TE en macrófagos con defectos en la señalización de TLR4, tanto nivel del propio receptor como de moléculas adaptadoras de señalización y factores de transcripción, también se ha descrito un papel relevante de moléculas inhibitorias de la ruta de TLR4

a diferentes niveles^{150,185,186}. En este contexto, con el objetivo de identificar genes y/o proteínas responsables del efecto pro-tolerante de PMX se determinó si, al igual que MTX¹⁸⁶, PMX modulaba la expresión de *TNFAIP3*. Los datos del *RNAseq* indicaron que los niveles de expresión génica *TNFAIP3* eran significativamente mayores en presencia del fármaco que en GM-MØ (**Figura 50D**). Este resultado se validó en muestras adicionales (**Figura 50E**), en las que PMX aumentó significativamente la expresión del *mRNA* de *TNFAIP3*. Sin embargo, al igual que TLR4 los niveles de expresión a nivel de proteína no cambiaron significativamente entre GM-MØ y PMX GM-MØ (**Figura 50F**). Por lo tanto, PMX regula la expresión del *mRNA* de *TNFAIP3* y *TLR4* pero estos cambios no se reflejan a nivel de proteína.

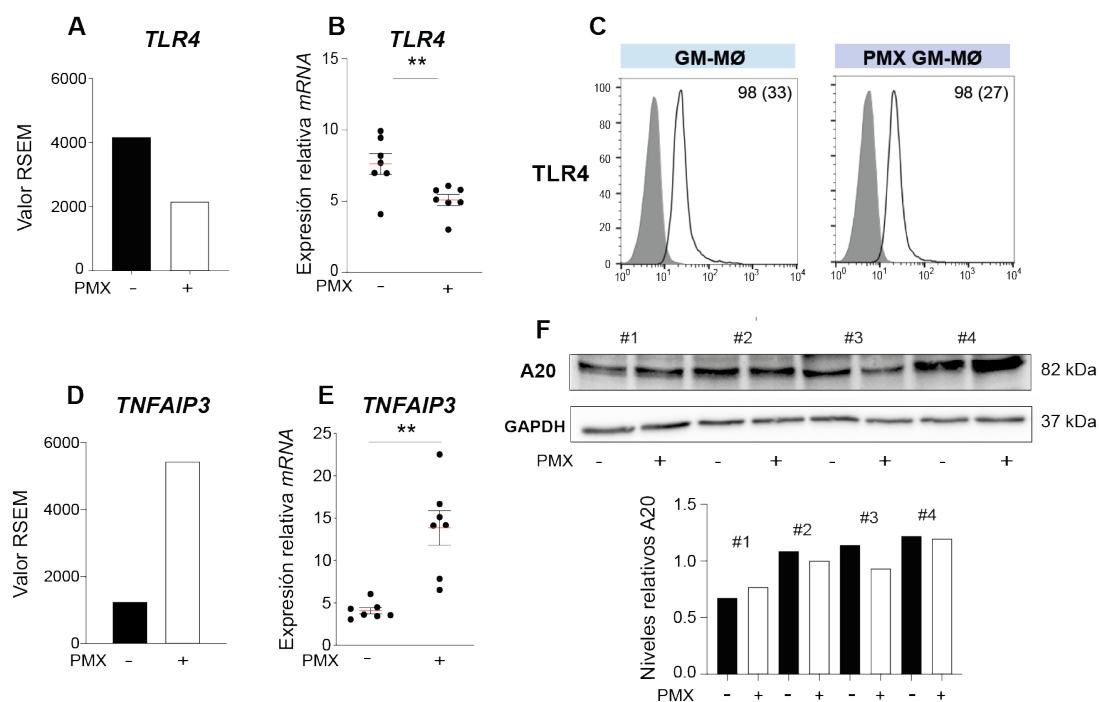


Figura 50. PMX regula la expresión del *mRNA* de *TNFAIP3* y *TLR4*. (A, D) Expresión del *mRNA* indicada como valor RSEM de *TLR4* ($adjp=10^{-5}$) (A) y *TNFAIP3* ($adjp=10^{-34}$) (D) determinados por *RNAseq* en GM-MØ generados en ausencia (-) o presencia (+) de PMX (50 nM). (B, E) Expresión relativa del *mRNA* de *TLR4* (B) y *TNFAIP3* (E) determinados por RT-qPCR en GM-MØ generados ausencia (-) o presencia (+) de PMX. Cada punto representa la medida de los macrófagos tratados (+) o no (-) con PMX de un donante independiente. Los resultados se muestran como la expresión relativa que indica la detección de cada *mRNA* en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia *TBP*. Se indica la media \pm SEM de 7-11 donantes independientes (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *t-Student*). (C) Expresión de TLR4 en membrana determinada mediante citometría de flujo en GM-MØ y PMX GM-MØ. Se muestra la fluorescencia de las células en presencia de anticuerpo control (histograma gris) y de TLR4 (histograma vacío). Se indica el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (entre paréntesis) de un experimento representativos de 8. (F) Análisis de *Immunoblot* de A20 en GM-MØ generados ausencia (-) o presencia (+) de PMX de 4 donantes independientes (#1, #2, #3 y #4). Se indica el peso molecular (kDa) y se muestra la cuantificación de los niveles de proteína por *Western blot* relativizados con respecto al control de carga (GAPDH).

Siguiendo el contexto de la ruta de señalización de TLR4, y partir de los resultados de *RNAseq*, se identificó que PMX GM-MØ expresaban niveles menores de *mRNA* de *CD14* que GM-MØ (**Figura 51A**), correceptor de TLR4 que media la señalización de LPS³⁷³. Este resultado se confirmó en preparaciones de macrófagos adicionales (**Figura 51B**), en las que se detectó que la expresión relativa del *mRNA* de *CD14* es menor tras el tratamiento con PMX. Dado que CD14, preestímulo correceptor de TLR2 y TLR4³⁷⁴, es una proteína unida a la membrana por glicosilfosfatidilinositol (GPI) que se expresa en la membrana plasmática (mCD14) y también en forma soluble (sCD14)³⁷⁵, se analizaron los niveles de expresión tanto en membrana, mediante citometría de flujo, como en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA. PMX GM-MØ mostraron menor expresión de mCD14 que GM-MØ (**Figura 51C**). Los cambios de expresión de mCD14 inducidos

por PMX resultaron ser donante-dependiente ya que, en algunos donantes, los macrófagos expuestos al fármaco presentaron dos poblaciones con diferente expresión de mCD14 en superficie, una con menor expresión y otra con igual expresión que GM-MØ (**Figura 51C #1**), mientras que en otros PMX disminuyó la expresión de mCD14 en una única población en su totalidad (**Figura 51C #2**). Específicamente, el porcentaje de células CD14⁺ disminuyó de un 87% (GM-MØ) a un 50% (PMX GM-MØ) (**Figura 51C #1**) y de un 58% (GM-MØ) a su totalidad (**Figura 51C #2**). Respecto a la forma soluble de CD14 (sCD14), se cuantificó su concentración en el sobrenadante de GM-MØ tratados o no con PMX. La concentración de sCD14 resultó significativamente menor en el sobrenadante de PMX GM-MØ que en GM-MØ (**Figura 51D**). Además, la reducción de la expresión de mCD14 y de sCD14 inducida por PMX se revirtió totalmente en presencia de ácido folínico (**Figura 51E** y **51F**), lo que indica que el efecto de la disminución de CD14 inducido por PMX en macrófagos GM-MØ está mediado por el bloqueo del OCM.

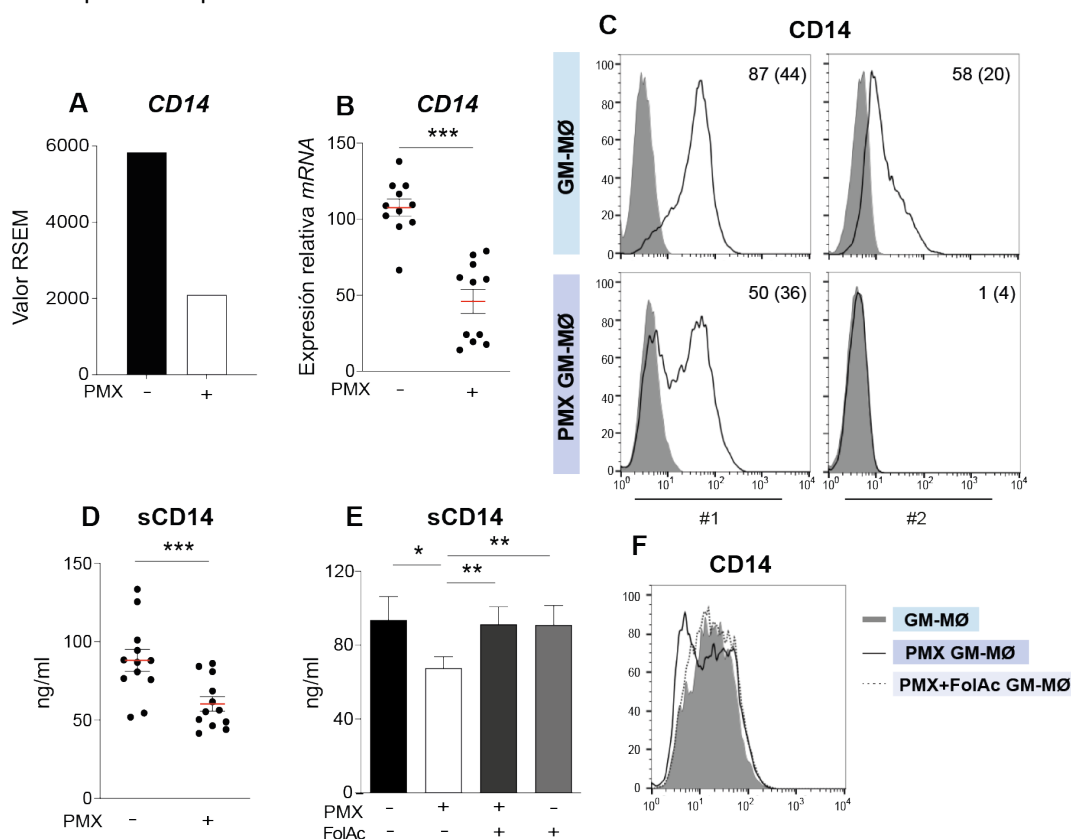


Figura 51. PMX regula la expresión de CD14 en GM-MØ. (A) Expresión del *mRNA* indicada como valor RSEM de *CD14* en GM-MØ generados en ausencia (-) o presencia (+) de PMX (50 nM) ($adjp=10^{-5}$). (B) Expresión relativa del *mRNA* de *CD14* determinados por RT-qPCR en GM-MØ generados ausencia (-) o presencia (+) de PMX. Cada punto representa la medida de los macrófagos tratados (+) o no (-) con PMX de un donante independiente. Los resultados se muestran como la expresión relativa que indica la detección de cada *mRNA* en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia *TBP*. Se indica la media \pm SEM de 11 donantes independientes ($***p < 0.001$, *t-Student*). (C) Expresión de CD14 en membrana determinada mediante citometría de flujo en GM-MØ y PMX GM-MØ. Se muestra la fluorescencia de las células en presencia de anticuerpo control (histograma gris) y de CD14 (histograma vacío). Se indica el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (entre paréntesis) de dos donantes representativos (#1, #2) de 8. (D, E) Expresión de sCD14 determinada mediante ELISA en el sobrenadante de cultivo de GM-MØ generados ausencia (-) o presencia (+) de PMX (D), ácido folínico (5 μ M, FolAc) o ambos (E). En D se indica la media \pm SEM de 12 donantes independientes ($***p < 0.001$, *t-Student*) (D) y en E de 6 donantes independientes ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, ANOVA). (F) Expresión de CD14 en membrana determinada mediante citometría de flujo en GM-MØ generados ausencia (histograma gris) o presencia de PMX (histograma vacío, línea negra) o PMX y ácido folínico (histograma vacío, línea discontinua). Se muestra un experimento representativo de 5.

Las formas poliglutamiladas de PMX (PMX-Pgl) inhiben con menor K_i que la forma nativa las enzimas implicadas en el metabolismo del folato, entre ellas la timidilado sintasa (TS). Y, en este contexto, estudios anteriores del grupo han demostrado como la inhibición de la TS resulta clave en

la modulación funcional de GM-MØ por MTX ¹⁹¹. Para determinar si los cambios de expresión génica en CD14 inducidos por PMX dependían de la inhibición de la TS, se analizó el efecto de la expresión del *mRNA* de CD14 tras el silenciamiento de la expresión del gen de la timidilato sintasa (*TYMS*) con un *siRNA* específico (*siTYMS*) en macrófagos GM-MØ tratados o no con PMX (**Figura 52A-C**). Los resultados muestran por un lado que el silenciamiento de *TYMS* disminuye la expresión del *mRNA* de CD14 en GM-MØ y, por otro, que la bajada en la expresión del *mRNA* de *CD14* inducida por PMX también se produce al silenciar *TYMS* (**Figura 52C**), lo que indica que la regulación de CD14 por PMX en GM-MØ depende de la expresión de la enzima TS.

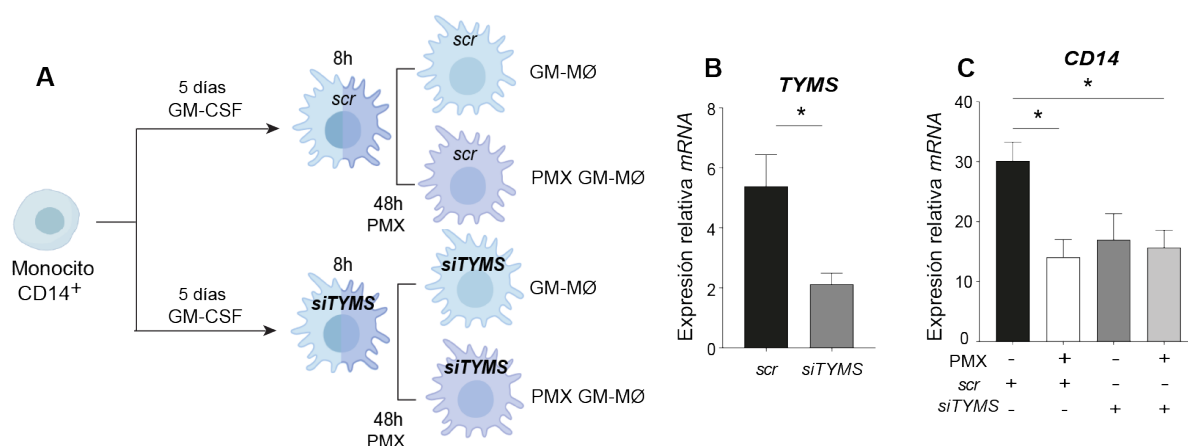


Figura 52. La regulación de la expresión de CD14 por PMX depende de la enzima timidilato sintasa. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ se diferenciaron durante 5 días a macrófagos con GM-CSF, se transfectaron con *siRNA* control (*scr*) o *siRNA* para el gen de enzima timidilato sintasa (*siTYMS*) y se trataron o no durante 48h con PMX. (B) Expresión relativa del *mRNA* de *TYMS* determinada por RT-qPCR en GM-MØ tras la transfección con *siRNA* control (*scr*) o *siRNA* para *TYMS* (*siTYMS*) durante 48h. Se indica la media \pm SEM de 4 donantes independientes. Los resultados se muestran como la expresión relativa, que indica la detección de cada *mRNA* en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia *TBP* (* $p < 0.05$, *t*-Student). (C) Expresión relativa del *mRNA* de *CD14* determinada por RT-qPCR en GM-MØ tras la transfección con *siRNA* control (*scr*) o *siRNA* para *TYMS* (*siTYMS*) y tratados (+) o no (-) con PMX. Los resultados se muestran como la expresión relativa, que indica la detección del *mRNA* en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia *TBP*. Se indica la media \pm SEM de 4 donantes independientes (* $p < 0.05$, ANOVA).

Dado que el MTX induce un estado de *tolerancia cruzada* a LPS en GM-MØ ¹⁸⁶, para determinar si el MTX también modulaba la expresión de CD14, se analizó su expresión en GM-MØ expuestos a MTX (MTX GM-MØ) (**Figura 53A**). MTX GM-MØ expresaron menores niveles de *CD14* *mRNA* y mCD14 que GM-MØ (**Figura 53B** y **54C**) y de sCD14 en el sobrenadante de cultivo (**Figura 53D**). Además, tal y como ocurre con PMX la reducción de la expresión de mCD14 y de sCD14 inducida por MTX se revirtió totalmente en presencia de ácido fólico (**Figura 53E** y **53F**).

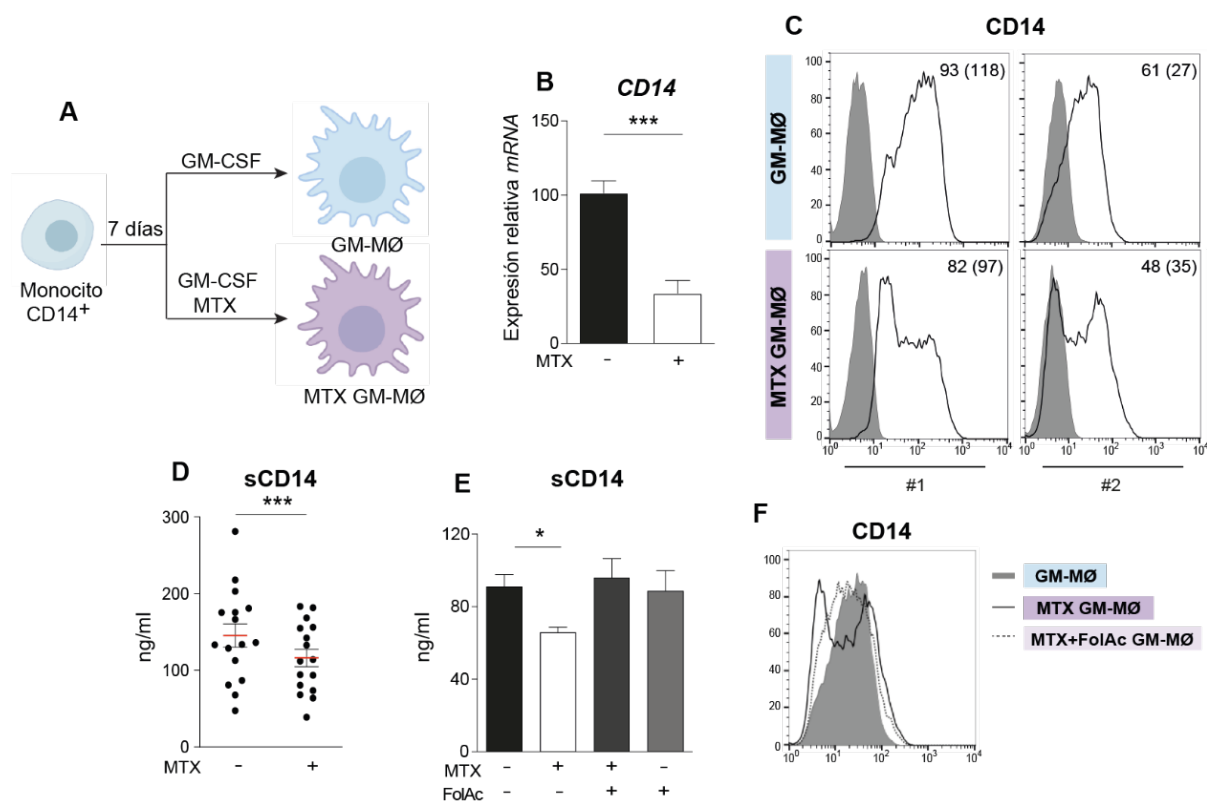


Figura 53. MTX regula la expresión de CD14 en GM-MØ. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ se trataron (50 nM, MTX GM-MØ) o no (GM-MØ) con MTX al principio del proceso de diferenciación a macrófagos con GM-CSF. (B) Expresión relativa del *mRNA* de *CD14* determinada por RT-qPCR en GM-MØ generados ausencia (-) o presencia (+) de MTX. Los resultados se muestran como la expresión relativa que indica la detección del *mRNA* en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia *TBP*. Se indica la media \pm SEM de 6 donantes independientes ($*** p < 0.001$, *t-Student*). (C) Expresión de CD14 en membrana determinada mediante citometría de flujo en GM-MØ y MTX GM-MØ. Se muestra la fluorescencia de las células en presencia de anticuerpo control (histograma gris) y el perfil de expresión de CD14 (histograma vacío). Se indica el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (entre paréntesis) de dos experimentos representativos (#1 y #2) de 8 donantes independientes. (D-E) Expresión de sCD14 determinada mediante ELISA en el sobrenadante de cultivo de GM-MØ generados ausencia (-) o presencia (+) de MTX (D), ácido fólico (5 μ M, FolAc) o ambos (E). En D se indica la media \pm SEM de 15 donantes independientes ($*** p < 0.001$, *t-Student*) y en E de 4 donantes independientes ($* p < 0.05$, ANOVA). (F) Expresión de CD14 en membrana determinada mediante citometría de flujo en GM-MØ generados en ausencia (histograma gris) o presencia de MTX (histograma vacío, línea negra) o ácido fólico (histograma vacío, línea discontinua). Se muestra un experimento representativo de 5 donantes independientes.

Por último, para comprobar si la modulación de CD14 por MTX y PMX dependía del estado de polarización de macrófagos, se analizó la expresión de CD14 en macrófagos diferenciados en presencia de M-CSF (M-MØ) expuestos o no a MTX (MTX M-MØ) y PMX (PMX M-MØ) (Figura 55A). El tratamiento con MTX o PMX no modificó la expresión de CD14 a nivel de *mRNA* ni superficie celular en macrófagos M-MØ (Figura 54B y 54C), confirmando que la disminución de CD14 por ambos antifolatos es dependiente del estado de polarización de macrófagos.

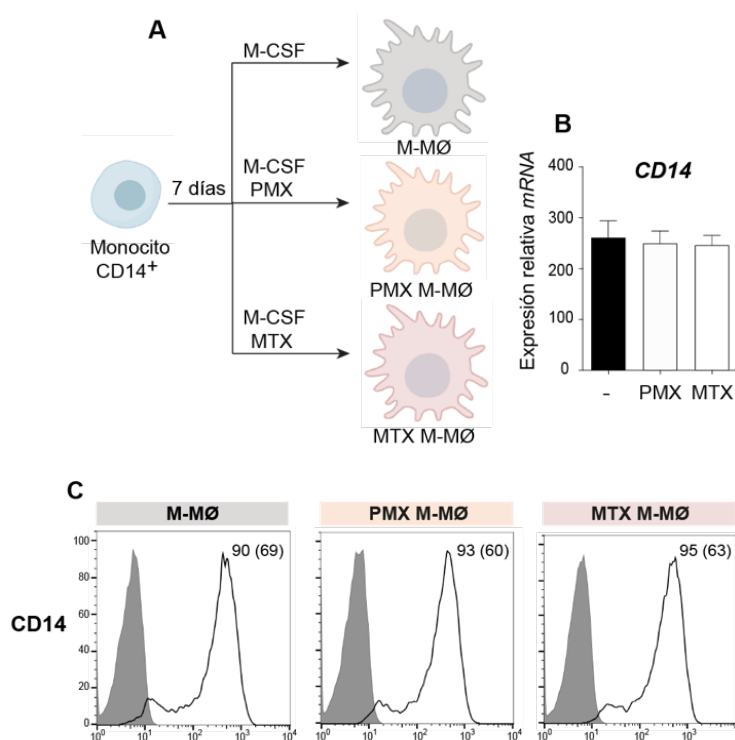


Figura 54. MTX y PMX no modifican la expresión de CD14 en M-MØ.

(A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ sin tratar (M-MØ), tratados con PMX (50 nM, PMX M-MØ) o MTX (50 nM, MTX M-MØ) se diferenciaron durante 7 días a macrófagos con M-CSF. (B) Expresión relativa del mRNA de CD14 determinada por RT-qPCR en M-MØ generados ausencia (-) o presencia de MTX o PMX. Los resultados se muestran como la expresión relativa, que indica la detección de cada mRNA en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia TBP. Se indica la media ± SEM de 3 donantes independientes (no significativo, ANOVA). (C) Expresión de CD14 en membrana determinada mediante citometría de flujo en M-MØ, PMX M-MØ y MTX M-MØ. Se muestra la fluorescencia de las células en presencia de anticuerpo control (histograma gris) y el perfil de expresión de CD14 (histograma vacío). Se indica el porcentaje de células positivas y la media de intensidad de fluorescencia (entre paréntesis). Se muestra un experimento representativo de 5 donantes independientes.

En conjunto, los resultados demuestran que los antifolatos MTX y PMX disminuyen la expresión de CD14, tanto a nivel de mRNA como de proteína (mCD14, sCD14), en macrófagos diferenciados con GM-CSF *in vitro* (GM-MØ), cuyo perfil genético se asemeja a macrófagos proinflamatorios^{69,91}, mientras que no modificaron la expresión de CD14 en macrófagos diferenciados en presencia de M-CSF (M-MØ), que se asemejan a macrófagos antiinflamatorios^{47,91,94,96,97}.

La aportación exógena de CD14 soluble restaura la atenuación de la respuesta a LPS en macrófagos tratados con PMX y MTX

La disminución en la expresión de CD14 por PMX y MTX correlacionaba con la disminución de la señalización intracelular de TLR4 y producción de citoquinas en respuesta a LPS en PMX GM-MØ (Figura 48 y Figura 49) y MTX GM-MØ¹⁸⁶ y sugería la implicación de CD14 en la tolerancia cruzada inducida de ambos antifolatos a LPS. Para verificar esta hipótesis, se analizó el efecto de la adición de sCD14 recombinante a dos concentraciones diferentes (20 y 200 ng/ml) en la señalización de TLR4 por LPS en GM-MØ y PMX GM-MØ (Figura 55A). Tal y como habíamos detectado anteriormente (Figura 49), el PMX disminuyó la fosforilación de p38 y JNK (Figura 55B y 55D), así como la degradación de IκBα (Figura 55C) tras la estimulación con LPS con respecto a los macrófagos control, fenómeno compatible con la inducción de tolerancia a LPS. Sin embargo, la adición de sCD14 aumentó la fosforilación de p38 y JNK (Figura 55B y 55D) y la degradación de IκBα en PMX GM-MØ (Figura 55C y 55E) en respuesta a LPS, mientras que no tuvo efecto en la activación de p38, JNK y degradación de IκBα en GM-MØ control. Además, cuando se midió la concentración de la citoquina IL-6 en el sobrenadante de cultivo, la adición de sCD14 aumentó la producción de IL-6 en respuesta a 3h de LPS de forma dosis-dependiente en PMX GM-MØ, pero no tuvo ningún efecto aditivo en la producción de IL-6 en GM-MØ (Figura 55F). Estos resultados indican que sCD14 restaura, en parte, el efecto inhibitorio de PMX sobre la expresión de proteínas implicadas en la ruta de señalización de

TLR4 y la producción de IL-6 y muestran cómo CD14 media la adquisición de un estado de tolerancia a LPS por PMX en macrófagos.

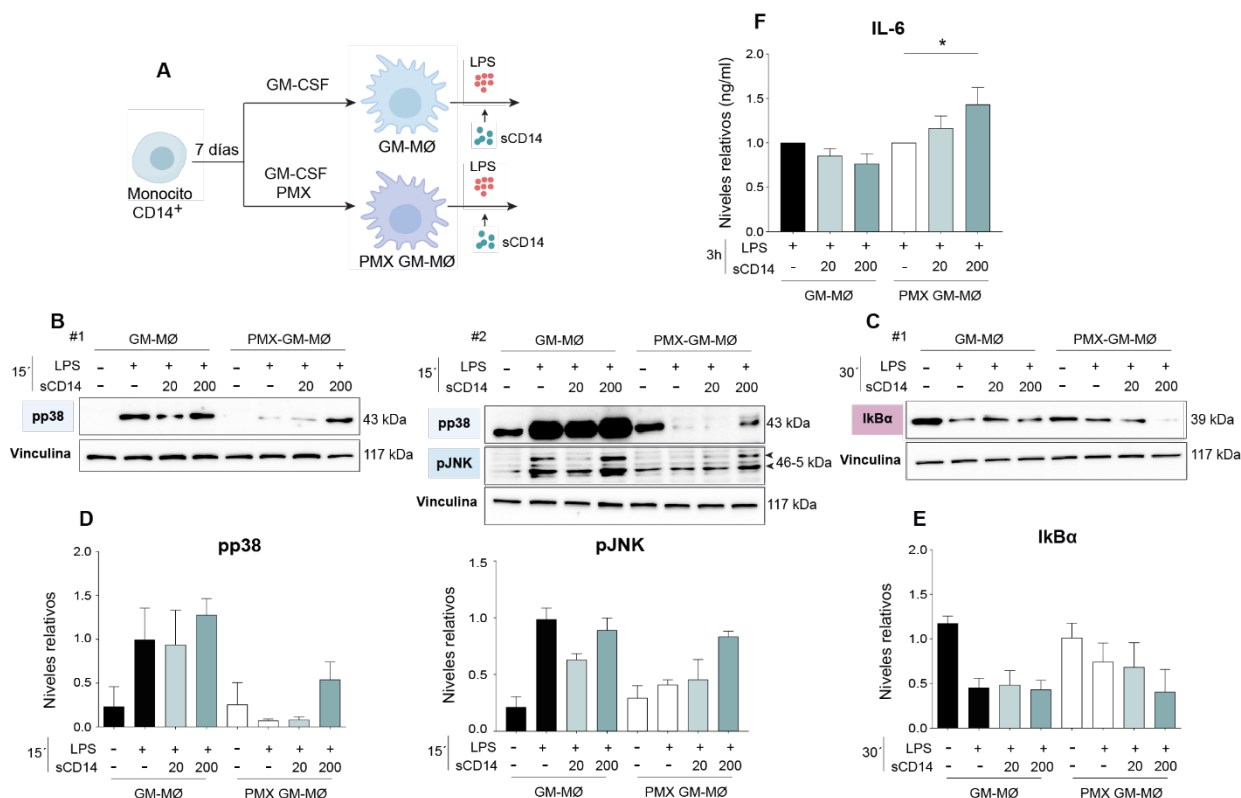


Figura 55. La adición de CD14 soluble restaura la activación de p38 y JNK, la degradación de IκBα y la producción de IL-6 en respuesta a LPS en PMX GM-Mφ. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ sin tratar (GM-Mφ) o tratados con PMX (PMX GM-Mφ) se diferenciaron durante 7 días a macrófagos con GM-CSF. A día 7 se estimularon con LPS (10 ng/ml) y sCD14 (20-200 ng/ml) a diferentes tiempos. (B) Análisis de *immunoblot* de pp38 y pJNK de GM-Mφ y PMX GM-Mφ estimulados (+) o no (-) con LPS (15 min) y en ausencia (-) o presencia de 20 ng/ml (20) o 200 ng/ml (200) de sCD14. El experimento se realizó en cuatro donantes diferentes y se muestran dos representativos (#1 y #2). La señal de pp38 del donante #2 está saturada para favorecer la detección del carril 8 (sCD14 200 ng/ml) en PMX GM-Mφ. (C) Análisis de *immunoblot* de IκBα de GM-Mφ y PMX GM-Mφ estimulados (+) o no (-) con LPS (30 min) y en ausencia (-) o presencia de 20 ng/ml (20) o 200 ng/ml (200) de sCD14. En B, C se muestra un experimento representativo de 4 donantes independientes y se indica el peso molecular (kDa) de cada proteína de interés. (D, E) Cuantificación de los niveles de proteína de pp38, pJNK (D) e IκBα (E) de GM-Mφ y PMX GM-Mφ estimulados (+) o no (-) con LPS (15-30 min) y en ausencia (-) o presencia de 20 ng/ml (20) o 200 ng/ml (200) de sCD14 por *Western blot* relativizados con respecto al control de carga (Vinculina). Se indica la media ± SEM de 3-4 donantes independientes (no significativo, *t-Student*). (F) Expresión de IL-6 determinada mediante ELISA en el sobrenadante de cultivo de GM-Mφ y PMX GM-Mφ estimulados (+) con LPS (3h) y en ausencia (-) o presencia de 20 ng/ml (20) o 200 ng/ml (200) de sCD14. Los niveles de IL-6 de los macrófagos sin tratar (GM-Mφ) se normalizaron a 1. Se indica la media ± SEM de 4 donantes independientes (* *p* < 0.05, *t-Student*).

Resultados similares se observaron en macrófagos expuestos a MTX (Figura 56A). Mientras que MTX disminuyó la fosforilación de p38 y JNK (Figura 56B y 56D) y la degradación de IκBα (Figura 56C) en macrófagos GM-Mφ en respuesta a LPS, la adición de sCD14 restauró, parcialmente, la activación de p38 y JNK (Figura 56B y 56D), así como la degradación de IκBα (Figura 56C y 56E) en respuesta a LPS en MTX GM-Mφ, mientras que no tuvo efecto en macrófagos control. Globalmente, estos resultados indican que la adquisición de un estado de tolerancia a LPS por los antifolatos PMX y MTX en GM-Mφ es dependiente de CD14.

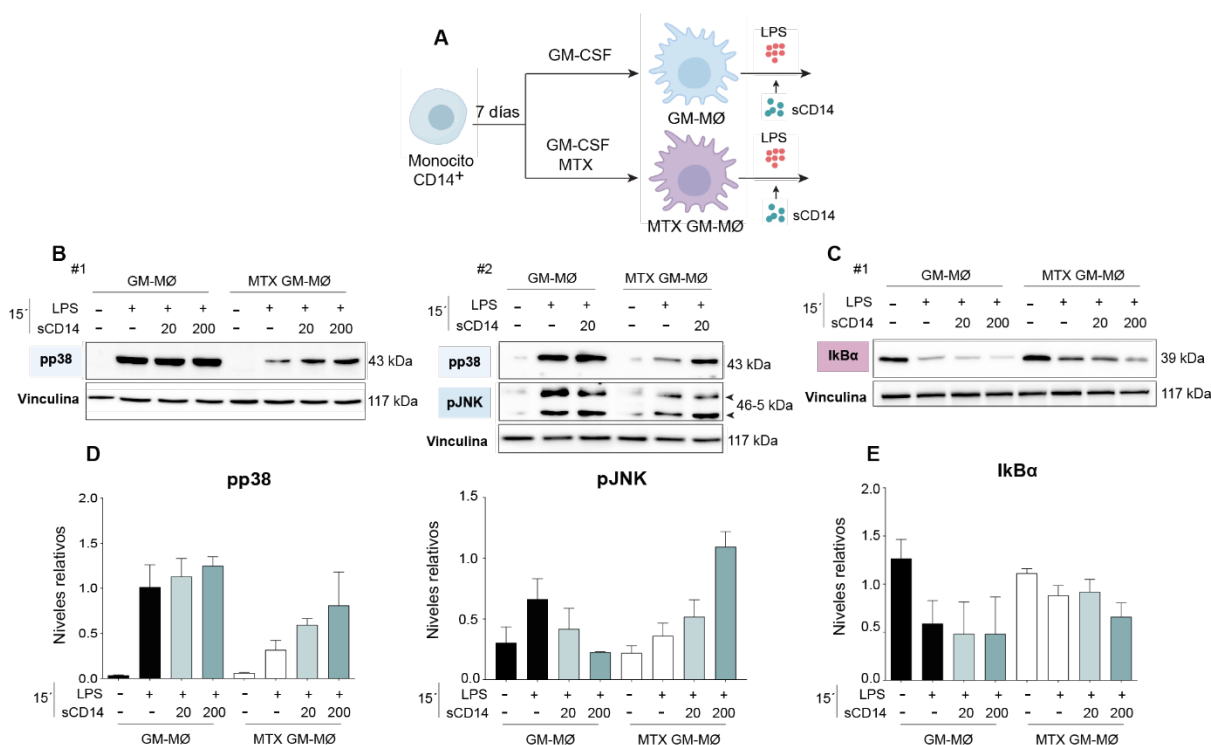


Figura 56. La adición de CD14 soluble restaura la activación de p38 y JNK y la degradación de IκBα en respuesta a LPS en MTX GM-MØ. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ sin tratar (GM-MØ) o tratados con MTX (MTX GM-MØ) se diferenciaron durante 7 días a macrófagos con GM-CSF. A día 7 se estimularon con LPS a diferentes tiempos en presencia de sCD14 (20-200 ng/ml). (B) Análisis de *Immunoblot* de pp38 y pJNK de macrófagos GM-MØ y MTX GM-MØ estimulados (+) o no (-) con LPS (15') y en ausencia (-) o presencia de 20 ng/ml (20) o 200 ng/ml (200) de sCD14. El experimento se realizó en 4 donantes diferentes y se muestran 2 representativos (#1 y #2). (C) Análisis de *Immunoblot* de IκBα de macrófagos GM-MØ y MTX GM-MØ estimulados (+) o no (-) con LPS (15 min) y en ausencia (-) o presencia de 20 ng/ml (20) o 200 ng/ml (200) de sCD14. En B, C se muestra un experimento representativo de 3 donantes independientes y se indica el peso molecular (kDa) de cada proteína de interés. (D, E) Cuantificación de los niveles de proteína de pp38, pJNK (D) e IκBα (E) de macrófagos GM-MØ y MTX GM-MØ estimulados (+) o no (-) con LPS (15 min) y en ausencia (-) o presencia de 20 ng/ml (20) o 200 ng/ml (200) de sCD14 por *Western blot* relativizados con respecto al control de carga (Vinculina). Se indica la media ± SEM de 3 donantes independientes (no significativo, *t-Student*).

La concentración de CD14 soluble es menor en el plasma de pacientes con artritis reumatoide tras el tratamiento con MTX

Aunque ambos antifolatos, PMX y MTX, disminuyen la expresión de CD14 en macrófagos, solo el MTX a dosis bajas se emplea como fármaco de referencia para el tratamiento de artritis reumatoide (AR) ^{237,238}. Para evaluar la relevancia fisiopatológica de la regulación de CD14 por MTX, se cuantificaron los niveles de sCD14 en el plasma de pacientes con AR (**cohorte de inicio**) a nivel basal (antes del tratamiento) y a los seis meses de iniciar la terapia con MTX (15-25 mg/semana) y dosis bajas de prednisona (**Figura 57A**). Este estudio se realizó en colaboración con la Dra. M^a Eugenia Miranda Carús del Servicio de Reumatología del Hospital La Paz-IdIPaz. La muestra de sangre periférica se obtuvo de diez pacientes con AR de reciente comienzo que cumplían con los criterios de clasificación revisados por ACR (*American College of Rheumatology*) en 2010 ²⁴¹. Los pacientes incluidos fueron clínicamente respondedores a la terapia con MTX por lo que el tratamiento con prednisona se interrumpió por lo menos un mes antes de la segunda determinación de los niveles de sCD14. Aquellos pacientes que necesitaron terapia continua con prednisona no se incluyeron en el estudio con el objetivo de eliminar las posibles interferencias de este fármaco inmunoregulador con los resultados. Los datos clínicos, demográficos y serológicos de los pacientes con AR que componen la cohorte de inicio se muestran en la **Tabla 13**. La concentración de sCD14 plasmática fue significativamente menor a los 6 meses de tratamiento con MTX (**Figura 57B**) y la concentración de

sCD14 correlacionó positivamente con la actividad de la enfermedad medida con el DAS28 (*Disease Activity Score 28*)³⁶⁰ ($r=0.5169$, $p=0.019$) (**Figura 57C y 57E**) y la proteína C reactiva (PCR) ($r=0.631$, $p=0.003$) (**Figura 57D y 57F**). Estos resultados muestran que la expresión de sCD14 es menor tras 6 meses de tratamiento con MTX en pacientes con AR respondedores a MTX.

| COHORTE DE INICIO | |
|-------------------------------|--------------------|
| Respondedores | |
| (n=10) | |
| Sexo femenino; n (%) | 6 (60) |
| Edad; p50 [p25-p75] | 60.5 (44.25-71.25) |
| FR positivo; n (%) | 6 (60) |
| ACPA positivo; n (%) | 1 (10) |
| DAS28; p50 [p25-p75] | 4.97 (3.79-5.56) |
| HAQ; p50 [p25-p75] | 1.02 (0.67-1.67) |
| Dosis MTX (mg); p50 [p25-p75] | 17.5 (15-20) |

Tabla 13. Datos clínicos, demográficos y serológicos de la cohorte de inicio. Esta cohorte incluye a pacientes con AR de reciente comienzo respondedores a MTX (n=10). Se indican los parámetros sexo, edad, FR (factor reumatoide), ACPA (anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados), DAS28 (actividad de la enfermedad medida en 28 articulaciones, *Disease Activity Score 28*), HAQ (cuestionario de discapacidad, *Health Assessment Questionnaire*) y dosis de MTX. Los datos se expresan como porcentaje y mediana (p50) y rango intercuartílico (p25-p75).

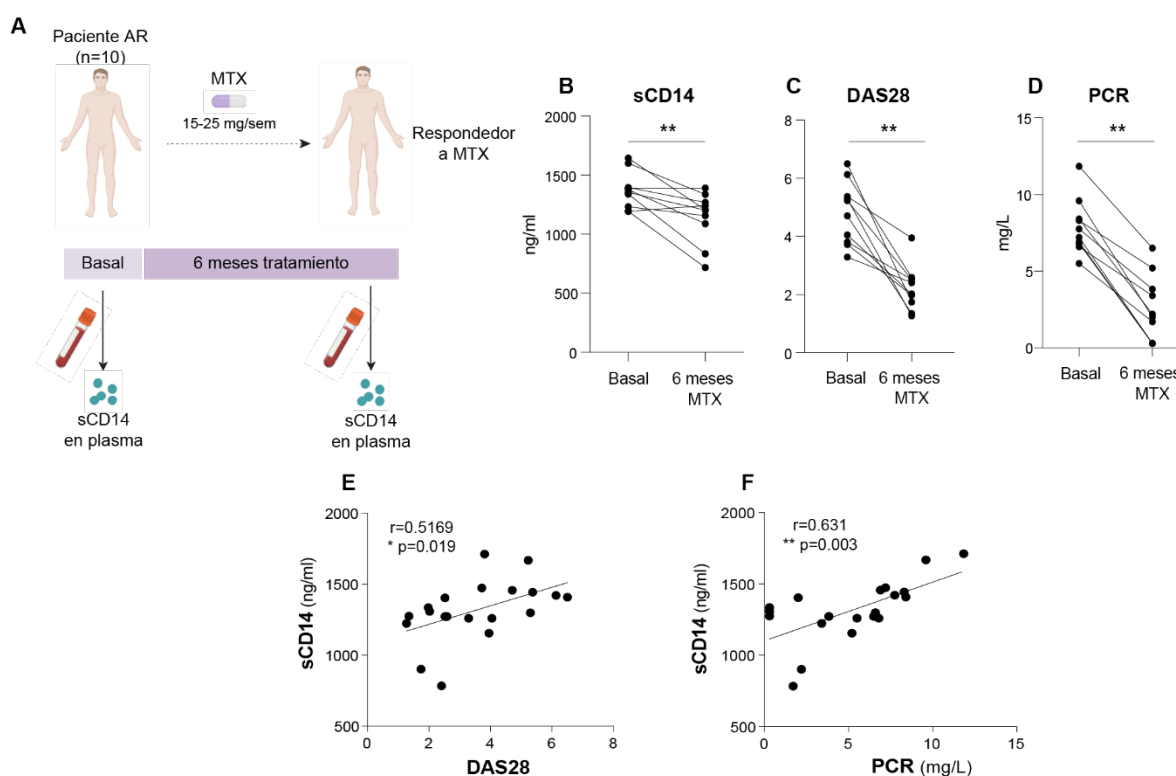


Figura 57. La concentración de CD14 soluble es menor en el plasma de pacientes con AR tras 6 meses de tratamiento con MTX. (A) Diseño experimental de la cohorte de inicio. Se analizó la concentración de sCD14 en plasma de pacientes con AR en la visita inicial (basal) y a los 6 meses del tratamiento con MTX (15-25 mg/semana). La cohorte de inicio consta de 10 pacientes con AR de reciente comienzo respondedores a MTX. (B-D) Concentración de sCD14 (ng/ml) en plasma determinados por ELISA (B), valor DAS28 (*Disease Activity Score*), actividad de la enfermedad estimada con 28 articulaciones (C) y concentración PCR (proteína C reactiva) (ng/L) (D) de la cohorte de inicio en la visita inicial (basal) y tras la terapia con MTX (6 meses) (** $p < 0.01$, test Wilcoxon). (E-F) Correlación entre los niveles de concentración de sCD14 en plasma (ng/ml) y la actividad de la enfermedad medida con DAS28 (E) o PCR (F) de la cohorte de inicio antes y después del tratamiento con MTX (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, correlación de Spearman dos-colas).

La concentración de CD14 soluble es menor en el suero de pacientes con artritis reumatoide respondedores a MTX que en no respondedores a MTX

Con el objetivo de validar los resultados anteriores, se analizaron los niveles séricos de sCD14 en otra población con AR de reciente comienzo con un mayor número de pacientes (**cohorte de validación**) pertenecientes a la cohorte estudio PEARL (*Princesa Early Arthritis Register Longitudinal*). Este estudio se realizó en colaboración con el Dr. Isidoro González-Álvaro del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario La Princesa. Esta población incluye a pacientes respondedores y no respondedores a MTX en monoterapia clasificados en base a los criterios previamente descritos (ver *Materiales y métodos*, apartado 1.2.2). Los datos clínicos, demográficos y serológicos de los pacientes que componen la cohorte de validación se muestran en la **Tabla 14**. Asimismo, los datos demográficos de los controles sanos se muestran en la **Tabla 15**.

| COHORTE DE VALIDACIÓN | | | |
|-------------------------------|---------------------|---------------------|---------|
| | Respondedores | No respondedores | p-valor |
| | (n=23) | (n=10) | |
| Sexo femenino; n (%) | 20 (86.96) | 9 (90) | 1 |
| Edad; p50 [p25-p75] | 56.57 (42.69-67.48) | 59.66 (53.62-76.84) | 0.22 |
| FR positivo; n (%) | 14 (60.87) | 7 (70) | 0.46 |
| ACPA positivo; n (%) | 11 (47.83) | 6 (60) | 0.39 |
| DAS28; p50 [p25-p75] | 4.90 (4.07-5.81) | 4.11 (3.46-5.09) | 0.12 |
| HAQ; p50 [p25-p75] | 1.37 (0.87-1.75) | 0.87 (0.5-1.75) | 0.32 |
| Dosis MTX (mg); p50 [p25-p75] | 15 (15-20) | 15 (12.5-15) | 0.27 |

Tabla 14. Datos clínicos, demográficos y serológicos de los pacientes con artritis reumatoide de la cohorte de validación. Esta cohorte incluye a pacientes con AR respondedores (n=23) y no respondedores (n=10) a MTX en régimen de monoterapia. Se indican los parámetros sexo, edad, FR (factor reumatoide), ACPA (anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados), DAS28 (actividad de la enfermedad mediada en 28 articulaciones, *Disease Activity Score 28*), HAQ (cuestionario de discapacidad, *Health Assessment Questionnaire*) y dosis de MTX. Los datos se expresan como porcentaje y mediana (p50) y rango intercuartílico (p25-p75). Se indica el p-valor en cada caso (*Mann-Whitney*).

| COHORTE DE VALIDACIÓN | |
|-----------------------|------------------|
| Controles sanos | |
| | (n=40) |
| Sexo femenino; n (%) | 37 (92.5) |
| Sexo masculino; n (%) | 3 (7.5) |
| Edad; p50 [p25-p75] | 53 (44.81-63.78) |

Tabla 15. Datos demográficos de los controles sanos de la cohorte de validación. Esta cohorte incluye a 40 donantes sanos como controles. Se indican los parámetros sexo y edad como porcentaje y mediana (p50) y rango intercuartílico (p25-p75).

Se determinaron los niveles séricos de sCD14 en la visita basal (antes del tratamiento) y a los 6 meses de iniciar el tratamiento con MTX en monoterapia (15-25 mg/semana) (**Figura 58A**). En los pacientes respondedores a MTX (n=23), se observó una disminución significativa de los niveles séricos de sCD14 entre la medición basal y los 6 meses tras la instauración del tratamiento con MTX (**Figura 58B**). Los niveles de actividad de la enfermedad medidos por el DAS28 en pacientes respondedores a la terapia disminuyeron a los 6 meses tras la instauración del tratamiento (**Figura 58C**) y, a su vez, la actividad correlacionó positivamente con los niveles de sCD14 en suero ($r=0.3951$, $p=0.0096$) (**Figura 58D**), validándose así los resultados obtenidos en la cohorte de inicio. Sin embargo, en los pacientes no respondedores a la terapia con MTX (n=10) no hubo variaciones en los niveles séricos de sCD14 entre la visita inicial y los 6 meses del tratamiento con MTX (**Figura 58E**). Por otro lado, la concentración basal de sCD14 fue significativamente mayor en pacientes respondedores que en no respondedores a MTX, que resultaron ser similares a los obtenidos del suero de donantes sanos (pareados por edad y sexo, n=40) (**Figura 58F**). En línea con estos resultados, se calculó la

diferencia entre los niveles séricos de sCD14 finales (tras los primeros 6 meses de tratamiento con MTX) y los niveles basales y esta nueva variable se denominó Δ sCD14. El Δ sCD14 resultó ser significativamente mayor en los pacientes respondedores a MTX que en no respondedores (**Figura 58G**).

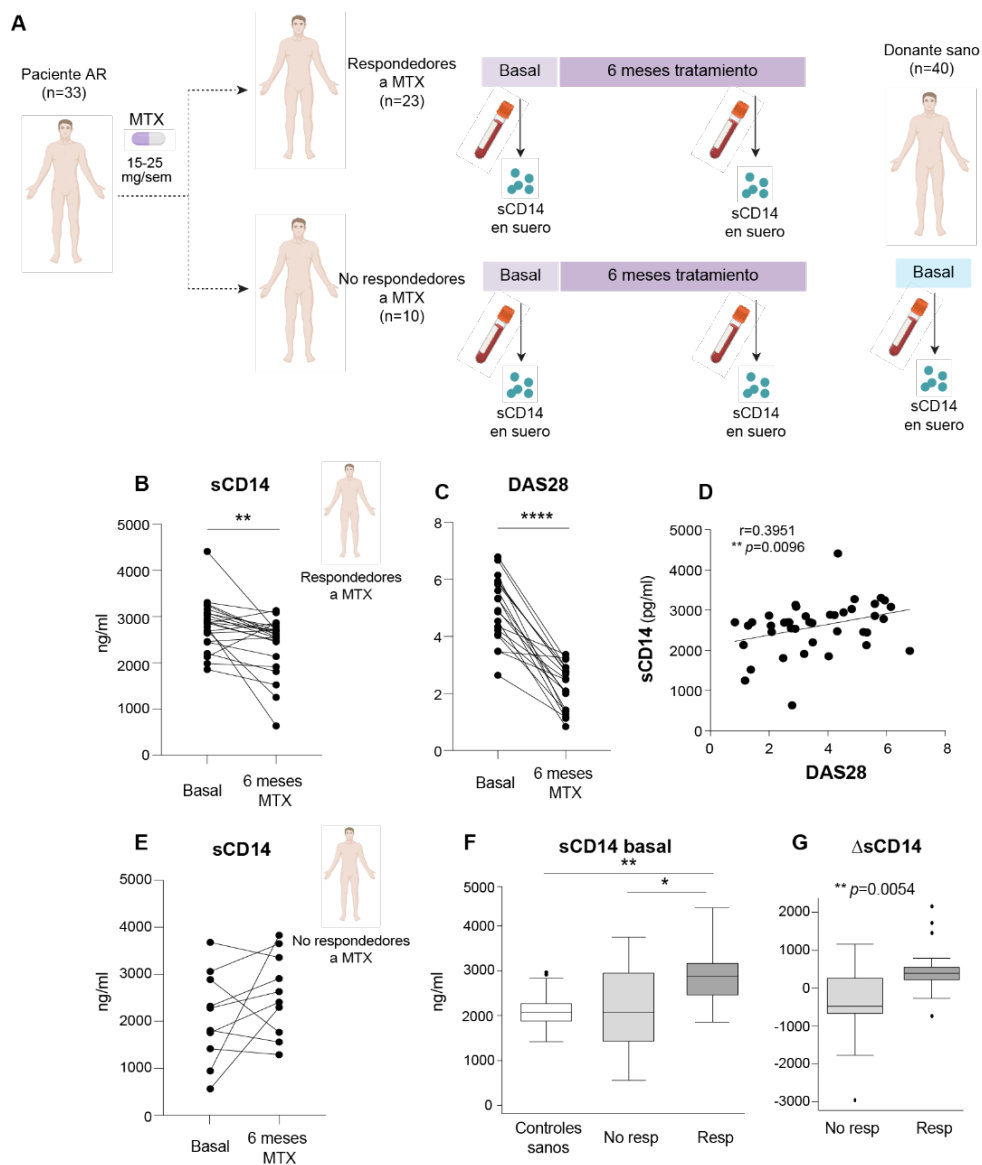


Figura 58. La concentración de CD14 soluble es menor en el suero de pacientes con artritis reumatoide respondedores a MTX que en no respondedores a MTX. (A) Diseño experimental de la cohorte de validación. Se analizó la concentración de sCD14 en suero de donantes sanos (controles, n=40) a nivel basal y de pacientes con AR de reciente comienzo, respondedores (n=23) o no (n=10) a MTX en la visita inicial (basal) y a los 6 meses de iniciar tratamiento con MTX (15-25 mg/semana). **(B, E)** Concentración de sCD14 (ng/ml) en suero determinados por ELISA de los pacientes con AR de la cohorte de validación en la visita inicial (basal) y tras la terapia con MTX (6 meses). Se muestra la medida en pacientes respondedores a MTX **(B)** y en pacientes no respondedores a MTX **(E)**. **(C)** Valor DAS28 (Disease Activity Score) en los pacientes con AR respondedores a MTX en la visita inicial (basal) y tras la terapia con MTX (6 meses). En **B, C, E** $** p < 0.01$, $**** p < 0.0001$, test Wilcoxon. **(D)** Correlación entre los niveles de sCD14 en suero (ng/ml) y la actividad de la enfermedad medida con DAS28 en los pacientes con AR respondedores a MTX antes y después del tratamiento con MTX ($** p < 0.01$, correlación de Spearman dos-colas). **(F)** Concentración de sCD14 (ng/ml) en suero en donantes sanos (blanco), pacientes con AR no respondedores (gris claro) y respondedores a MTX (gris oscuro) en la visita inicial (basal) ($* p < 0.05$, $** p < 0.01$, Kruskal-Wallis). **(G)** Variación entre la concentración de sCD14 basal y tras 6 meses de tratamiento con MTX (Δ sCD14) en pacientes con AR no respondedores y respondedores a MTX ($* p < 0.05$, $** p < 0.01$, Mann-Whitney). Los datos en **F-G** se muestran como rango intercuartílico (p75 borde superior del cuadro, p25 borde inferior, p50 línea media) así como p95 (línea arriba del cuadro) y p5 (línea abajo).

A continuación, con el objetivo de evaluar la capacidad de los niveles basales sCD14 (ng/ml) y/o del Δ sCD14 para discriminar entre pacientes respondedores y no respondedores al tratamiento con MTX, se realizó un análisis de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). El análisis de curvas ROC determinó que valores de sCD14 basal en torno a 2460 ng/ml (78% sensibilidad, 70% especificidad, AUC=0.75) y de Δ sCD14 en torno a 188 ng/ml (83% sensibilidad, 70% especificidad, AUC=0.81) son capaces de discriminar entre pacientes respondedores y no respondedores a MTX. Aunque el AUC de Δ sCD14 (AUC=0.81) resultó ser ligeramente superior que la de sCD14 basal (ng/ml) (AUC=0.75) (**Figura 59A**), estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. En base a esos puntos de corte (sCD14 basal: 2460 ng/ml y Δ sCD14: 188 ng/ml) se calcularon las *odds ratio* (OR) frente a la variable respuesta. En el caso de tener niveles de sCD14 basal superiores a 2460 ng/ml, la probabilidad de ser respondedor a la terapia con MTX aumentó 8.4 ($p=0.0126$) y en el caso de tener niveles Δ sCD14 superiores a 188 ng/ml, la probabilidad de ser respondedor a MTX aumentó 11.1 ($p=0.0059$) (**Figura 59B**).

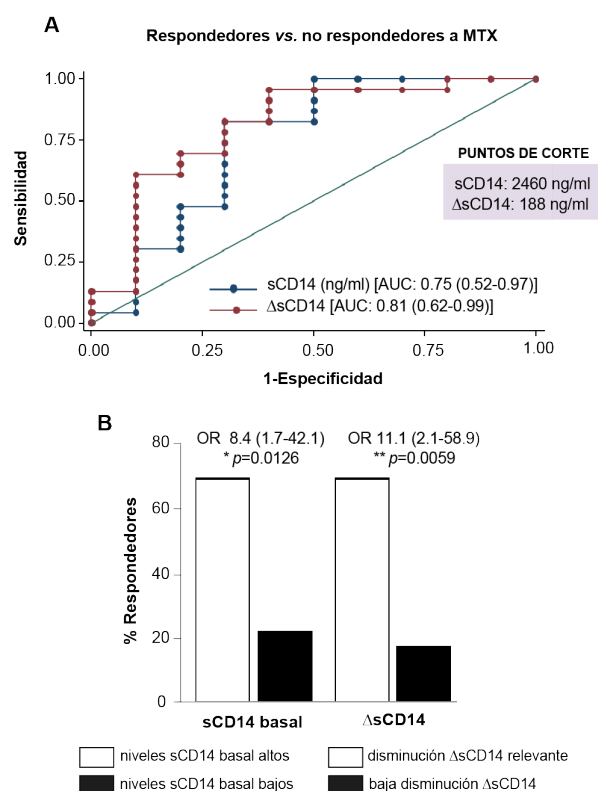


Figura 59. Análisis de la capacidad de las variables sCD14 basal (ng/ml) y Δ sCD14 para discriminar entre pacientes con artritis reumatoide respondedores o no a MTX. (A) Representación del análisis de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) de las variables niveles basales sCD14 (ng/ml) (línea puntos azules) o disminución de Δ sCD14 (línea de puntos rojos). Se representa la sensibilidad frente a 1-especificidad. Se indica el área bajo la curva (AUC) de sCD14 basal y Δ sCD14, el intervalo de confianza al 95% (entre paréntesis) y los puntos de corte para cada variable. **(B)** Comparación entre el porcentaje de pacientes con AR respondedores a MTX con niveles basales de sCD14 altos (blanco, izquierda) frente a niveles basales de sCD14 bajos (negro, izquierda) y entre el porcentaje de pacientes con una disminución relevante de Δ sCD14 (blanco, derecha) frente a una baja disminución Δ sCD14 (negro, derecha). Se indican las *odds ratio* (OR) y el intervalo de confianza al 95% (entre paréntesis) estimados con el comando cs de Stata 14.1 y el nivel de significancia con la prueba exacta de Fisher (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). **(C)** Tabla que representa el análisis de regresión logística multivariable para estimar la relación entre la concentración basal sCD14 altos (ng/ml) en suero o disminución de Δ sCD14 y la respuesta a MTX en pacientes con AR. Como variables independientes se incluyen sexo, edad y niveles basales de DAS28 y se incluyen, además, las variables niveles basales sCD14 (ng/ml) altos en suero o disminución de Δ sCD14 con las *odds ratio* (OR) e intervalo de confianza al 95% (IC 95%) ajustado en base a edad, sexo y niveles basales DAS28. Se indica el *p*-valor en cada caso, siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

C

| Niveles basales sCD14 (ng/ml) altos | | |
|-------------------------------------|---------------------|-----------------|
| | OR (IC 95%) | <i>p</i> -valor |
| Sexo femenino | 0.11 (0.005-2.37) | 0.16 |
| Edad (años) | 0.93 (0.85-1.01) | 0.1 |
| Niveles basales sCD14 (ng/ml) altos | 25.49 (2.22-291.90) | 0.009 |
| DAS28 | 2.11 (0.92-4.84) | 0.076 |

| Disminución Δ sCD14 | | |
|----------------------------|---------------------|-----------------|
| | OR (IC 95%) | <i>p</i> -valor |
| Sexo femenino | 0.59 (0.03-9.58) | 0.71 |
| Edad (años) | 0.96 (0.89-1.03) | 0.31 |
| Disminución Δ sCD14 | 40.35 (3.02-537.38) | 0.005 |
| DAS28 | 2.86 (1.15-7.12) | 0.02 |

Por último, para evaluar con mayor precisión la capacidad de los niveles séricos basales de sCD14 para discriminar entre pacientes respondedores o no a MTX, se realizó un análisis de regresión logística multivariable en el que se empleó como variable dependiente la respuesta a MTX y como variables independientes se incluyeron variables que influyen en la respuesta a MTX tales como edad, sexo y niveles basales de DAS28. En cada modelo se incluyeron las variables sCD14 basal (ng/ml) o Δ sCD14 para determinar sus respectivos *odds ratio* ajustados por edad, sexo y niveles basales de DAS28. La *odds ratio* con un intervalo de confianza del 95% (IC 95%) para sCD14 basal alta se incrementó significativamente a 25.49 ($p=0.009$) y para la disminución de Δ sCD14 se incrementó significativamente a 40.35 ($p=0.005$) (**Figura 59C**). En conjunto, estos resultados indican que la determinación de los niveles de sCD14 podría ser una herramienta útil en la práctica clínica diaria para predecir de forma muy significativa la respuesta a MTX en pacientes con artritis reumatoide.

CAPÍTULO III

Expresión de GM-CSF y polarización de macrófagos en artritis indiferenciada persistente y en evolución

Un año después del diagnóstico de artritis indiferenciada (AI) los pacientes pueden evolucionar a un diagnóstico de artritis reumatoide (AR, 30% de los pacientes), espondiloartritis periférica (EA), generalmente artritis psoriásica (APs, 7-15%)²⁸⁶ o mantenerse en AI (AI persistente, 20-60%)²⁸⁴. A pesar de las diferencias patológicas entre AR y APs, la composición y distribución estructural de los infiltrados celulares en su sinovitis resulta muy similar³⁴² y el número de macrófagos en el tejido sinovial de ambas patologías se asocia con el grado de actividad de la enfermedad y la respuesta a tratamiento^{312,322,350-352}. Los macrófagos de la membrana y del líquido sinovial de pacientes con AR muestran un perfil de polarización similar al de macrófagos diferenciados *in vitro* en presencia de GM-CSF (GM-MØ)⁹⁹. GM-CSF actúa como mediador de inflamación tisular^{50,72,83,107}, desarrolla un papel clave en el inicio, desarrollo y progresión de la artritis^{75,109,110} y promueve la adquisición de un perfil de expresión génica en macrófagos *in vitro* que incluye un *conjunto de genes proinflamatorios*^{69,91} cuya presencia caracteriza a los macrófagos inmunoestimuladores y antitumorales. Aunque se ha descrito como la mayor parte de los macrófagos presentes en el tejido sinovial de AR presentan un estado de polarización dependiente de GM-CSF, la distribución de la polarización de macrófagos y su relevancia clínica en la sinovitis inflamatoria crónica no está del todo definida. En este contexto, con el objetivo de identificar posibles biomarcadores para un diagnóstico y clasificación temprana de AI, y dada la implicación patológica de GM-CSF en el desarrollo y progresión de la artritis inflamatoria^{114,120}, se analizó la expresión de GM-CSF, así como, la polarización y densidad de macrófagos en el tejido sinovial de cinco grupos experimentales de pacientes con diferentes fases de artritis inflamatorias: artritis indiferenciada persistente (AI), artritis indiferenciada con evolución a artritis reumatoide (AI-AR) o a artritis psoriásica (AI-APs), artritis reumatoide (AR) y artritis psoriásica (APs).

Las características clínicas, demográficas y serológicas de los pacientes incluidos en el estudio se muestran en la **Tabla 16**. Los pacientes con AI-AR (n=8) presentaron significativamente menor número de articulaciones tumefactas (NAT) y dolorosas (NAD), menor actividad de la enfermedad (DAS28 basal) y una duración desde el inicio de la enfermedad hasta la obtención de la biopsia sinovial menor que los pacientes con AR (n=12). Los pacientes con AI-APs (n=9) eran significativamente más jóvenes que pacientes con APs (n=10) y presentaron menor duración de la enfermedad desde su inicio hasta la obtención de la biopsia sinovial y hasta que se incluyeron en el estudio. Además, el número de pacientes en tratamiento con FAMEsc (mayoritariamente MTX) en el momento de la artroscopia, fue mayor en AI-APs que en APs. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la cuantificación de los títulos RF y/o ACPA entre las fases en evolución y establecidas (AI-AR vs. AR y AI-APs vs. APs). La comparación entre ambas fases de artritis indiferenciadas en evolución (AI-AR y AI-APs) mostró que los pacientes con AI-AR tenían significativamente mayor número de NAD y mayores niveles de FR y/o ACPA que los pacientes con AI-APs.

| | DATOS CLÍNICOS, DEMOGRÁFICOS Y SEROLÓGICOS | | | | |
|--|--|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | AI | AI-AR | AR | AI-APs | APs |
| | (n=16) | (n=8) | (n=12) | (n=9) | (n=10) |
| Sexo femenino; n (%) | 5 (31) | 3 (38) | 3 (25) | 5 (56) | 8 (80) |
| Edad (años) | 57 (40-65) | 56 (42-71) | 58 (52-71) | 44 (35-49) | 53 (48-62) |
| Duración enfermedad hasta biopsia sinovial (meses) | 30 (21-37) | 13 (6-51) | 104 (73-202) | 6 (3-30) | 129 (45-265) |
| Seguimiento hasta diagnóstico definitivo (meses) | 32 (11-59) | 1 (0.5-7) | NA | 1 (0.5-2) | NA |
| Duración enfermedad (meses) | 60 (36-97) | 34 (7-57) | 28 (10-82) | 6 (4-36) | 25 (12-56) |
| NAT | 1 (1-2) | 2 (1-9) | 11 (4-19) | 1 (1-2) | 1 (1-1) |
| NAD | 1 (1-2) | 3 (2-5) | 19 (4-25) | 1 (1-2) | 1 (1-1) |
| PCR basal (mg/dl) | 1.34 (0.57-2.53) | 2.46 (0.51-3.12) | 4.45 (1.20-10.10) | 1.70 (0.39-8.23) | 3.55 (0.64-7.87) |
| VSG basal (mm/h) | 17 (7-32) | 34 (20-67) | 49 (22-69) | 30 (12-40) | 8 (5-41) |
| DAS28 basal (VSG) | 3.34 (2.68-3.82) | 4.40 (3.43-5.39) | 5.84 (4.88-7.59) | 3.73 (2.85-4.17) | 3.13 (2.27-4.24) |
| FR y/o ACPA n (%) | 0 | 4 (50) | 9 (75) | 0 | 0 |
| FAMEsc (%) | 7 (44) | 2 (25) | 6 (50) | 6 (67) | 2 (20) |

| | AI-AR vs. AI-APs | AI-AR vs. AR | AI-APs vs. APs |
|--|------------------|--------------|----------------|
| | p-valor | p-valor | p-valor |
| Sexo femenino; n(%) | 0.457 | 0.550 | 0.252 |
| Edad (años) | 0.102 | 0.643 | 0.024 |
| Duración enfermedad hasta biopsia sinovial (meses) | 0.289 | 0.002 | 0.003 |
| Seguimiento hasta diagnóstico definitivo (meses) | 0.847 | NA | NA |
| Duración enfermedad (meses) | 0.177 | 0.671 | 0.060 |
| NAT | 0.141 | 0.033 | 0.850 |
| NAD | 0.009 | 0.015 | 0.633 |
| PCR basal (mg/dl) | 0.630 | 0.117 | 0.744 |
| VSG basal (mm/h) | 0.499 | 0.589 | 0.204 |
| DAS28 basal (VSG) | 0.102 | 0.039 | 0.391 |
| FR y/o ACPA n (%) | 0.006 | 0.710 | - |
| FAMEsc n (%) | 0.205 | 0.667 | 0.004 |

Tabla 16. Datos clínicos, demográficos y serológicos de los pacientes incluidos en el estudio. El estudio se compone cinco grupos experimentales de artritis inflamatoria: artritis indiferenciada persistente (AI, n=16), artritis indiferenciada con evolución a artritis reumatoide (AI-AR, n=8), artritis indiferenciada con evolución a artritis psoriásica (AI-APs, n=9), artritis reumatoide (AR, n=12) y artritis psoriásica (APs, n=10). Se indican los parámetros NAT (número de articulaciones tumefactas), NAD (número de articulaciones dolorosas), PCR (proteína C reactiva) basal, VSG (velocidad de sedimentación globular) basal, DAS28 (actividad de la enfermedad mediada en 28 articulaciones, *Disease Activity Score 28*) basal, FR (factor reumatoide), ACPA (anticuerpos antipeptidos cíclicos citrulinados), FAMEsc (Fármacos modificadores de la enfermedad sintéticos convencionales), entre otros. Los datos se expresan como mediana (p50) y rango intercuartílico (p25-p75). Se indica el p-valor en cada caso, siendo * p < 0.05, ** p < 0.01 y *** p < 0.001, *Mann-Whitney*. NA: no aplicable.

Expresión de GM-CSF en la cavidad sinovial de AI, AR y APs

Antes de comenzar el estudio, se definieron los marcadores para localizar e identificar macrófagos en la membrana sinovial. Seleccionamos las proteínas CD163 y CD115 (M-CSFR) ya que se consideran marcadores pan-macrófago^{36,376,377}. En el sistema experimental de macrófagos generados *in vitro*, la expresión de CD163 y CD115 en la superficie celular es similar en macrófagos con perfil proinflamatorio (GM-MØ) y antiinflamatorio (M-MØ) (**Figura 60A**). Del mismo modo, la expresión de CD163 colocaliza en un 99.5% con la expresión de CD115 en la membrana sinovial de todos los grupos experimentales del estudio (**Figura 60B**) y ambas proteínas delimitan el contorno celular de los

macrófagos (**Figura 60C**), parámetro muy útil para su cuantificación. Por lo tanto, a lo largo del estudio se emplearon indistintamente anticuerpos anti-CD163 o anti-CD115 como marcadores de macrófagos de la membrana sinovial tanto en condiciones homeostáticas como en inflamación.

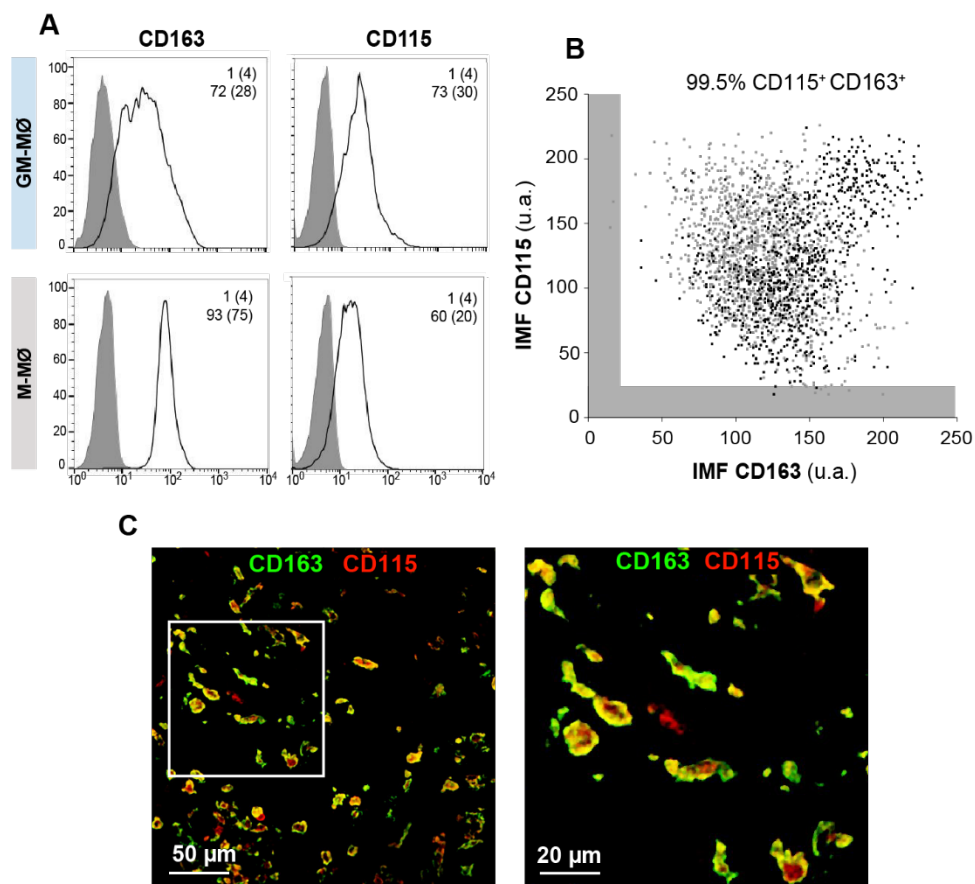


Figura 60. CD115 y CD163: pan-marcadores de macrófagos en tejido sinovial. (A) Expresión de CD163 y CD115 en membrana celular determinada mediante citometría de flujo de monocitos diferenciados durante 7 días a macrófagos con GM-CSF (GM-Mφ) o M-CSF (M-Mφ). Se muestra la fluorescencia de las células en presencia de anticuerpo control (histograma gris) y de CD163 o CD115 (histograma vacío). Se indica el porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia (entre paréntesis) de un experimento representativo de 4 donantes independientes. (B) Expresión de CD163 y CD115 en membrana sinovial de dos muestras independientes (negro y gris) de artritis indiferenciada persistente (AI). Cada punto representa la intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD115 o CD163 por célula. Se indican los valores de IMF como unidades arbitrarias (u.a.). El análisis se llevó a cabo en muestras independientes de los grupos experimentales del estudio y se muestra un análisis representativo. (C) Expresión de CD163 (verde) y CD115 (rojo) en macrófagos de membrana sinovial de AI determinada mediante inmunofluorescencia. Escala de 50 μm y su ampliación (cuadrado blanco) a 20 μm. Se muestra una imagen representativa, pero se corroboró el mismo resultado en muestras independientes de cada grupo experimental

Para llevar a cabo el estudio, se definieron previamente las áreas *lining* o capa íntima y *sublining* o capa subíntima de la membrana sinovial en todas las muestras de tejido sinovial. Durante la sinovitis, la AR se caracteriza por presentar una mayor hiperplasia del *lining* que APs, sin embargo, el proceso de hiperplasia y de infiltración de macrófagos en el *sublining* en ambas patologías resulta similar^{339,340,353,378}. Por otro lado, el número de macrófagos en el *sublining* se ha sugerido como biomarcador de enfermedad y respuesta terapéutica en AR^{312,319–321}. En línea con estos datos y ante la ausencia de *lining* en la mayoría de las muestras de artritis indiferenciada, se seleccionó como región de interés (ROI) de estudio el *sublining* (cuadrado amarillo, **Figura 61A y 61B**), un área estandarizada ubicada a 50 μm del *lining*, en todas las muestras de tejido sinovial del estudio.

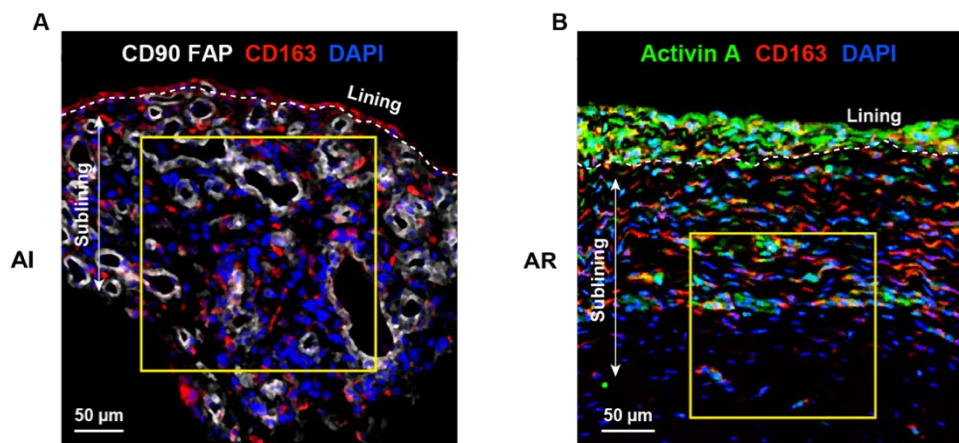
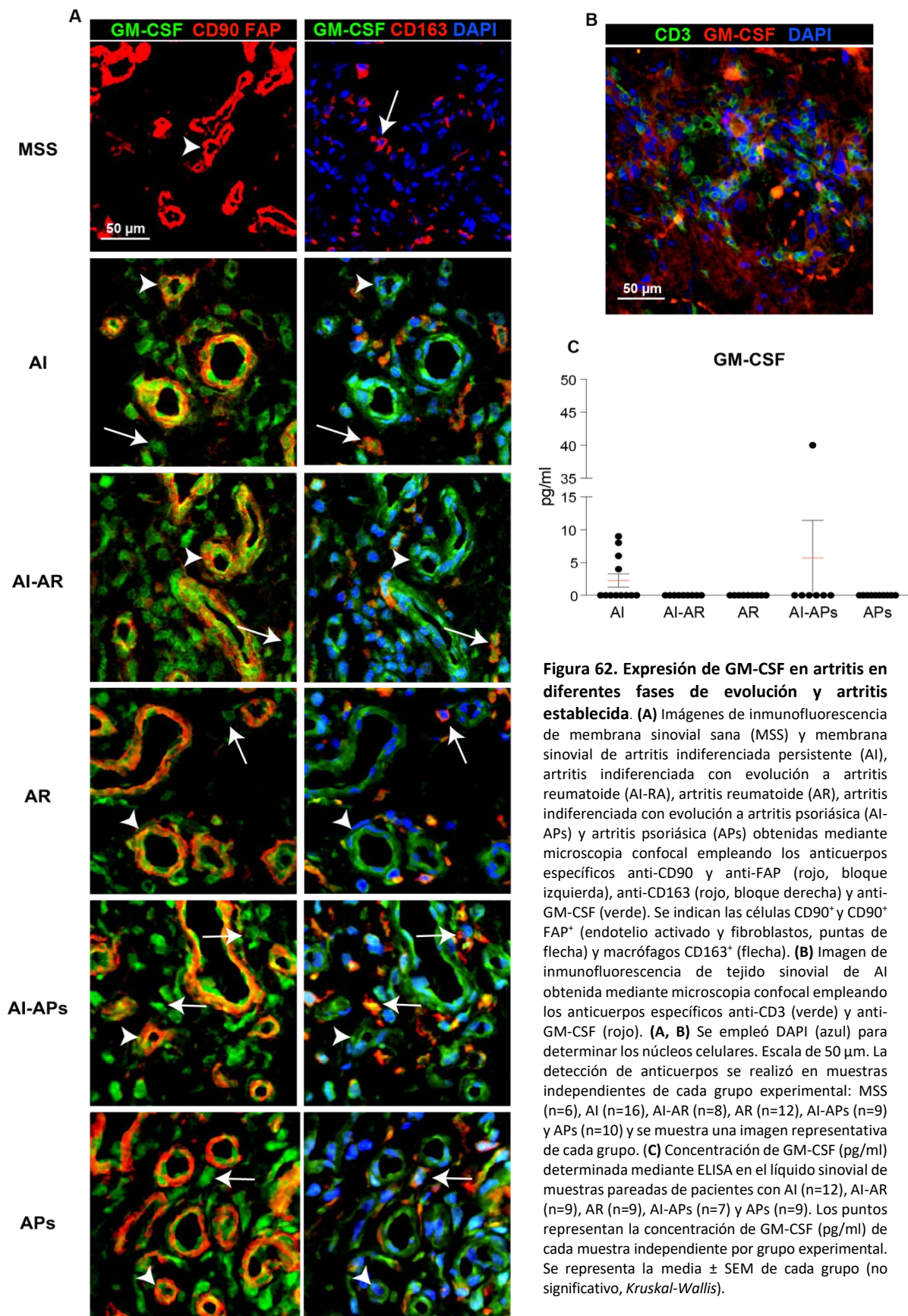


Figura 61. Selección del *sublining* como región de interés de estudio de la membrana sinovial de los diferentes grupos de artritis inflamatorias. (A, B) Imágenes de inmunofluorescencia del tejido sinovial de artritis indiferenciada persistente (AI) (A) y artritis reumatoide (AR) (B) obtenidas mediante microscopía confocal empleando los anticuerpos específicos anti-CD90 y anti-FAP (blanco), anti-activina A (verde) y anti-CD163 (rojo). Se empleó DAPI (azul) para determinar los núcleos celulares. Se indican las capas de la membrana sinovial *lining* y *sublining*. La región de interés de estudio fue el *sublining* (cuadrado amarillo), un área estandarizada ubicada a 50 μm del *lining*.

Dado el papel que tiene la citoquina GM-CSF en la patología de AR^{110,111,115}, se determinó su expresión en la membrana sinovial de pacientes con AI, AI-RA, AR, AI-APs y APs. Como control se empleó la membrana sinovial de articulación sana (MSS) sin inflamación. El análisis de inmunofluorescencia reveló la expresión de GM-CSF en células CD90⁺ y CD90⁺ FAP⁺ (endotelio activado y fibroblastos, puntas de flecha) y en macrófagos CD163⁺ (flechas) (Figura 62A) del estroma sinovial de todos los grupos artritis. No se detectó expresión de GM-CSF en linfocitos T CD3⁺ (Figura 62B), ni en células endoteliales CD90⁺, fibroblastos CD90⁺ FAP⁺ o macrófagos CD163⁺ de MSS. Estos resultados indican que fibroblastos CD90⁺ FAP⁺, células endoteliales CD90⁺ y macrófagos CD163⁺ del *sublining* son las fuentes celulares de expresión de GM-CSF en la membrana sinovial de AI en evolución (AI-AR y AI-APs) y en fases establecidas (AI persistente, AR y APs). A continuación, se cuantificó la expresión de GM-CSF en muestras pareadas de líquido sinovial. A excepción de cuatro muestras de pacientes con AI persistente y una muestra de AI-APs, los niveles de expresión de GM-CSF en líquido sinovial resultaron indetectables (Figura 62C).



M \emptyset respecto a M-M \emptyset reveló un enriquecimiento positivo significativo en el conjunto de genes definidos como marcadores específicos de GM-M \emptyset (*GM-M \emptyset -specific markers*, GSE68061) ³⁶⁹ (NES:2.40, FDR: 0.000) con los genes *INHBA*, *MMP12* y *CSF-1* (M-CSF) en su *leading edge*.

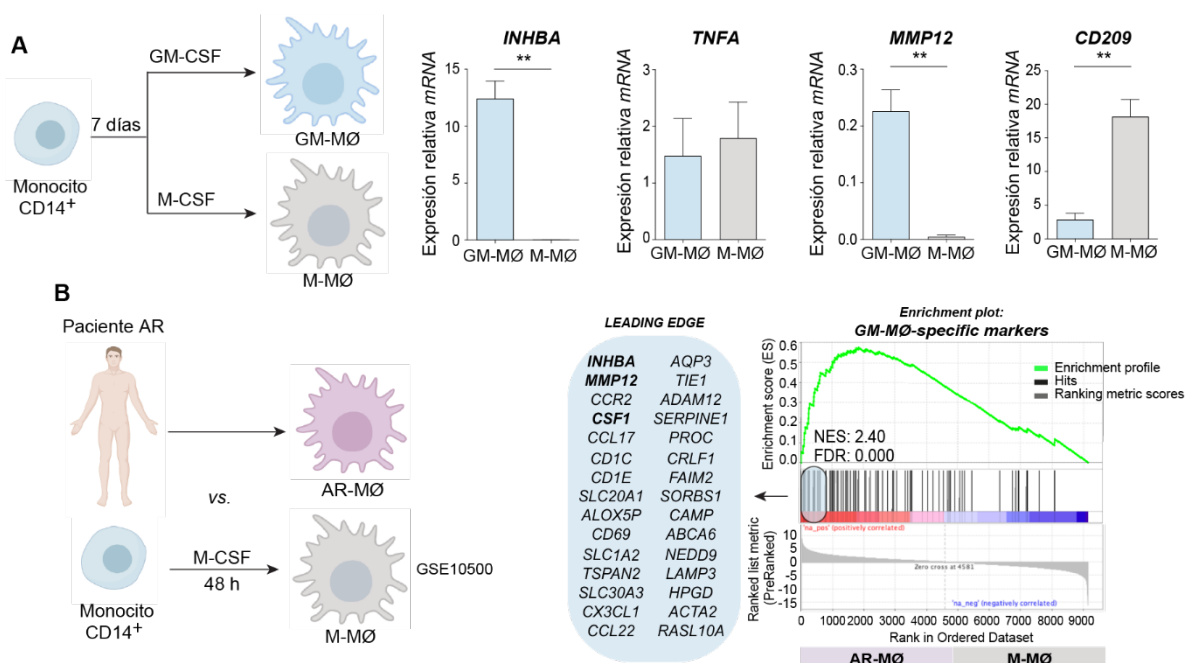
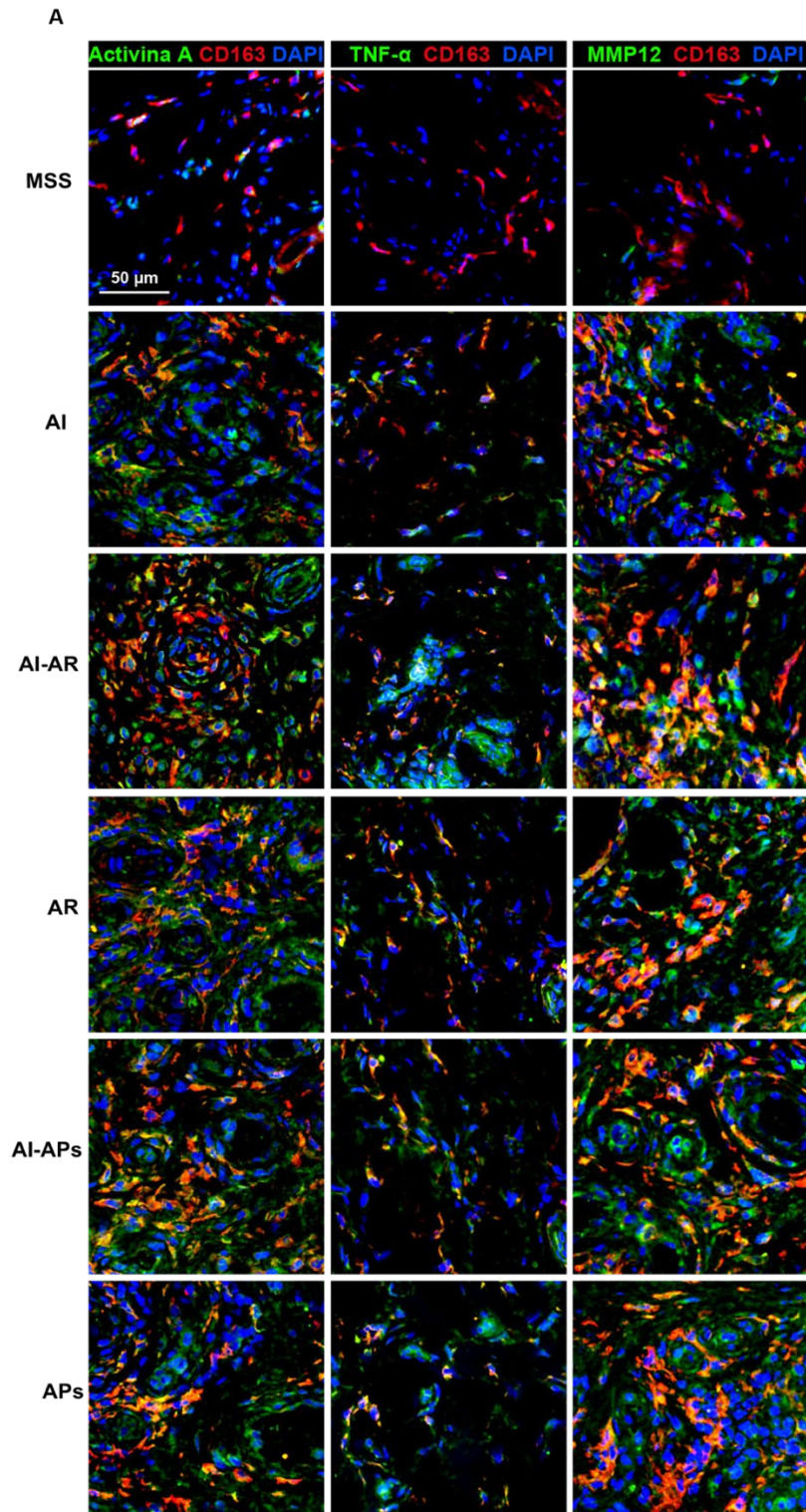


Figura 64. Expresión de marcadores de polarización en macrófagos de artritis reumatoide y macrófagos diferenciados *in vitro*. (A) Representación esquemática del diseño experimental. Monocitos CD14⁺ purificados de sangre periférica de donantes sanos (*buffy coat*) se diferenciaron a macrófagos durante 7 días con GM-CSF (GM-M \emptyset) o M-CSF (M-M \emptyset) y se determinaron los niveles de expresión del *mRNA* de *INHBA*, *TNFA*, *MMP12* y *CD209*. Los resultados se muestran como expresión relativa que indica la detección de cada *mRNA* en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia *TBP*. Se indica la media \pm SEM de 4 donantes independientes (** $p < 0.01$, *t-Student*). (B) Análisis de GSEA de la lista rankeada del análisis *limma* del transcriptoma de macrófagos de la membrana sinovial de artritis reumatoide (RA-M \emptyset) frente a macrófagos derivados de monocitos con M-CSF (M-M \emptyset) (GSE10500) ³⁶⁶ en el conjunto de genes definidos *GM-M \emptyset -specific markers* (GSE68061) ³⁶⁹. Se indican los valores de NES (*Normalized Enrichment Score*) y FDR (*False Discovery Rate*). El perfil de enriquecimiento se muestra en verde. Se indican algunos de los genes diferencialmente expresados de la región *leading edge*.

Se analizó la expresión de activina A, MMP12 y TNF- α mediante inmunofluorescencia en la membrana sinovial de AI, AI-AR, AI-APs, AR y APs y en membrana sinovial sana (MSS) (Figura 65A-65D). La expresión de activina A, MMP12 y TNF- α se detectó en macrófagos CD163⁺ del *sublining* de la membrana sinovial de artritis indiferenciada en evolución (AI-AR, AI-AP) y establecidas (AI, AR y AP) pero no en macrófagos CD163⁺ de MSS (Figura 65A), lo que indica que activina A, MMP12 y TNF- α son marcadores de inflamación. Conjuntamente, se cuantificó la fluorescencia de activina A, MMP12 y TNF- α en macrófagos mediante la cuantificación de la fluorescencia de la proteína de interés en membrana (ver protocolo en *Materiales y Métodos*, apartado 6.4, Figura 37). Los macrófagos CD163⁺ de AI, evolucionada o persistente, mostraron niveles de expresión similares de activina A y TNF- α a los obtenidos en AR y APs y la expresión de activina A y TNF- α en todas las fases de artritis fue significativamente más alta que la obtenida en macrófagos CD163⁺ de MSS (Figura 65B y 65C). La expresión de MMP12 resultó significativamente mayor en AR y AI persistente que en membrana sinovial sana y respecto a los diferentes grupos de artritis, AI persistente mostró mayor expresión de MMP12 que en evolución (AI-AR y AI-APs) y AR respecto a AI-AR (Figura 65D). En conjunto, estos resultados indican que el estado de polarización de macrófagos es similar en la membrana sinovial de artritis en evolución y establecida con una predominancia de expresión de marcadores proinflamatorios asociados a la polarización de macrófagos por GM-CSF (activina A, MMP12 y TNF- α) en comparación con tejido sinovial sano.



Dos subgrupos de macrófagos ($CD163^+ CD209^{high}$ y $CD163^+ CD209^{low}$) se expresan en tejido sinovial de AI, AR y APs

En relación CD209, marcador característico de la polarización de macrófagos por M-CSF (M-M ϕ)¹⁰⁴, se detectó por inmunofluorescencia la expresión de CD209, tanto en macrófagos $CD163^+$ de la membrana sinovial sana (MSS) como en la membrana sinovial de todos los grupos experimentales de artritis (Figura 66A). La cuantificación de la expresión de CD209 en macrófagos $CD163^+$ mostró significativamente mayor expresión de CD209 en la membrana sinovial de AR y APs que en AI (Figura 66B).

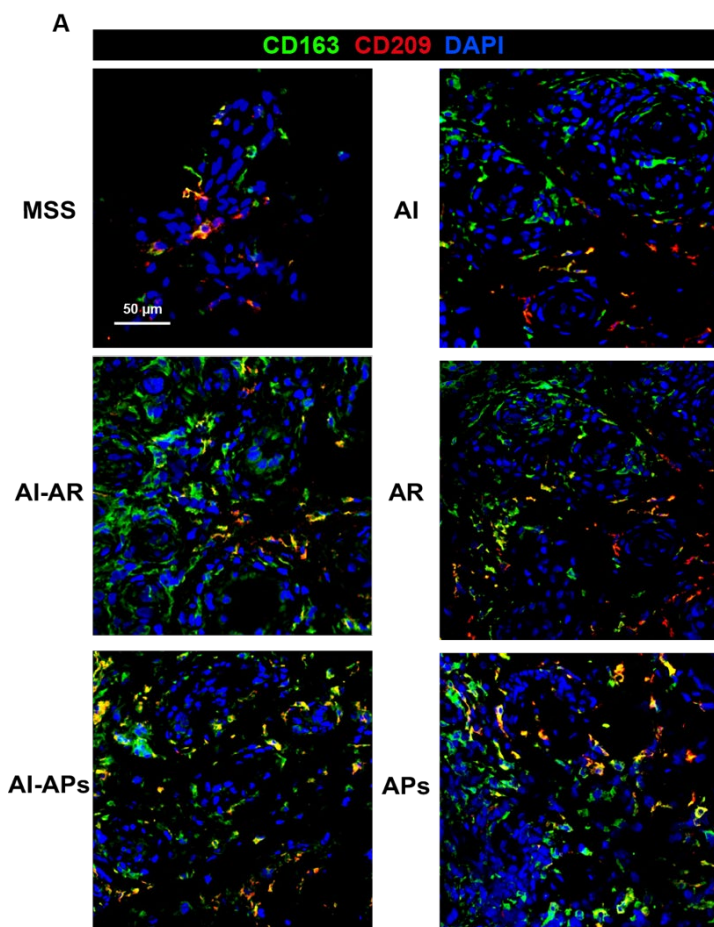
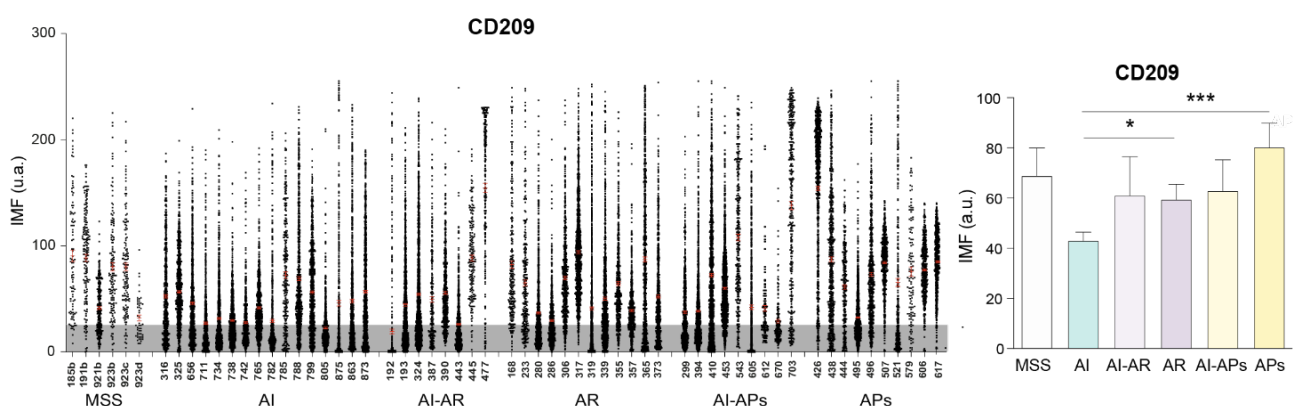


Figura 66. Expresión de CD209 en macrófagos $CD163^+$ de membrana sinovial sana, artritis en diferentes fases de evolución y artritis establecida.

(A) Imágenes de inmunofluorescencia de MSS y membrana sinovial de AI, AI-AR, AR, AI-APs y APs obtenidas mediante microscopía confocal empleando los anticuerpos específicos anti- $CD163$ (verde) y anti- $CD209$ (rojo). Se empleó DAPI (azul) para teñir los núcleos celulares. La detección de anticuerpos se llevó a cabo en muestras independientes de cada grupo experimental y se muestra una imagen representativa de cada grupo. Escala de 50 μ m. **(B)** Cuantificación de la expresión de $CD209$ en macrófagos $CD163^+$ de MSS y membrana sinovial de AI, AI-AR, AR, AI-APs y APs. Se indica la intensidad media de fluorescencia (IMF) como unidades arbitrarias (u.a.) y la media \pm SEM de cada grupo experimental (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *Kruskal-Wallis*). El dot plot representa la cuantificación de la IMF (u.a.) de $CD209$ en cada macrófago $CD163^+$ de las muestras independientes de tejido sinovial cada grupo experimental. Se cuantificaron entre 150 y 300 células en cada muestra de tejido en 3-4 campos por donante elegidos al azar. Se consideran células positivas aquellas con IMF > 25 u.a. (fondo gris IMF < 25 u.a., células negativas). **(A-B)** MSS (n=6), AI (n=16), AI-AR (n=8), AR (n=12), AI-APs (n=9) y APs (n=10).



Se identificaron dos subgrupos de macrófagos CD163⁺ en base a su expresión diferencial de CD209: el subgrupo CD163⁺ CD209^{high} (IMF CD209 > 34 u.a.) y el subgrupo CD163⁺ CD209^{low} (IMF CD209 < 34 u.a.) (**Figura 67A**) y el porcentaje de expresión de células CD163⁺ CD209⁺ en MSS y en la membrana sinovial de APs fue significativamente mayor que el obtenido en el tejido sinovial de AI (74% y 70% vs. 46% células CD163⁺ CD209⁺) (**Figura 67B**). Conjuntamente, estos resultados indican que el número de macrófagos CD163⁺ CD209⁺ es mayor en artritis psoriásica que en artritis indiferenciada.

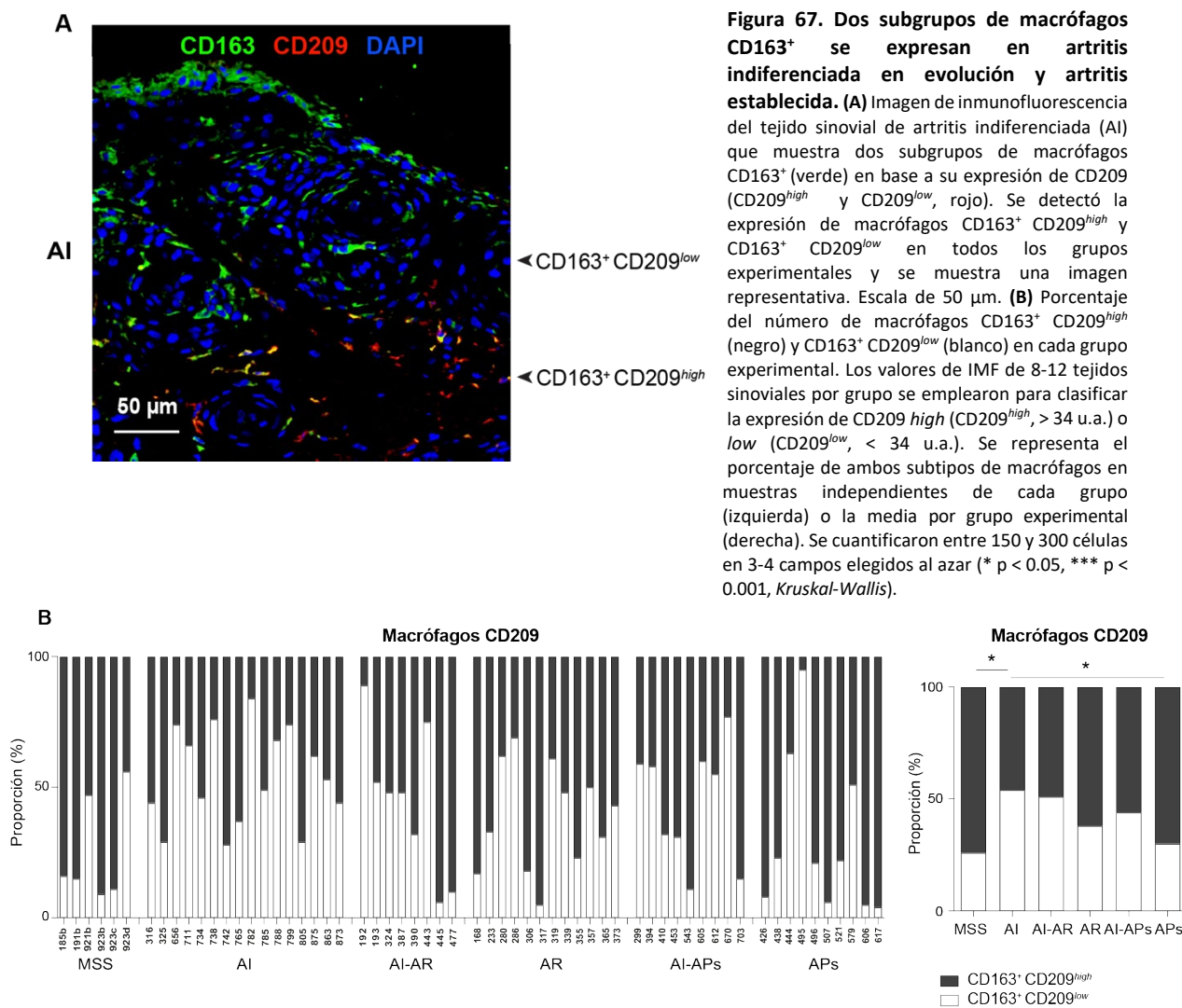


Figura 67. Dos subgrupos de macrófagos CD163⁺ se expresan en artritis indiferenciada en evolución y artritis establecida. (A) Imagen de inmunofluorescencia del tejido sinovial de artritis indiferenciada (AI) que muestra dos subgrupos de macrófagos CD163⁺ (verde) en base a su expresión de CD209 (CD209^{high} y CD209^{low}, rojo). Se detectó la expresión de macrófagos CD163⁺ CD209^{high} y CD163⁺ CD209^{low} en todos los grupos experimentales y se muestra una imagen representativa. Escala de 50 μm. **(B)** Porcentaje del número de macrófagos CD163⁺ CD209^{high} (negro) y CD163⁺ CD209^{low} (blanco) en cada grupo experimental. Los valores de IMF de 8-12 tejidos sinoviales por grupo se emplearon para clasificar la expresión de CD209 *high* (CD209^{high}, > 34 u.a.) o *low* (CD209^{low}, < 34 u.a.). Se representa el porcentaje de ambos subtipos de macrófagos en muestras independientes de cada grupo (izquierda) o la media por grupo experimental (derecha). Se cuantificaron entre 150 y 300 células en 3-4 campos elegidos al azar (* p < 0.05, *** p < 0.001, *Kruskal-Wallis*).

La densidad de macrófagos en tejido sinovial de AI en evolución es mayor que en AI persistente

La densidad de macrófagos en AR y APs correlaciona con la actividad de la enfermedad y el incremento del número de macrófagos en el tejido sinovial se asocia al grado de erosión de las articulaciones^{316–319,349,350}. Por ello, se determinó la densidad de macrófagos CD163⁺ (número macrófagos CD163⁺ por mm² de tejido sinovial) en la membrana sinovial de AI, AI-AR, AR, AI-APs, APs y en membrana sinovial sana (MSS) (**Figura 68A** y **68B**). La densidad de macrófagos resultó significativamente mayor en todos los grupos experimentales de artritis que en MSS (203 macrófagos CD163⁺/mm²), indicando la acumulación de macrófagos en tejido patológico. Respecto a las

diferentes fases de artritis, AR (505 macrófagos CD163⁺/mm²) y APs (478 macrófagos CD163⁺/mm²) mostraron menor densidad de macrófagos que AI-AR (630 macrófagos CD163⁺/mm²) y AI-APs (622 macrófagos CD163⁺/mm²). Además, la densidad de macrófagos en AI persistente (318 macrófagos CD163⁺/mm²) resultó significativamente menor que en AI-AR y AI-APs (**Figura 68A**). Estos resultados indican que, el tejido sinovial inflamado tiene mayor número de macrófagos que en condiciones homeostáticas y que AI en evolución (AI-AR, AI-APs) se caracteriza por tener una mayor densidad macrófagos que AI persistente.

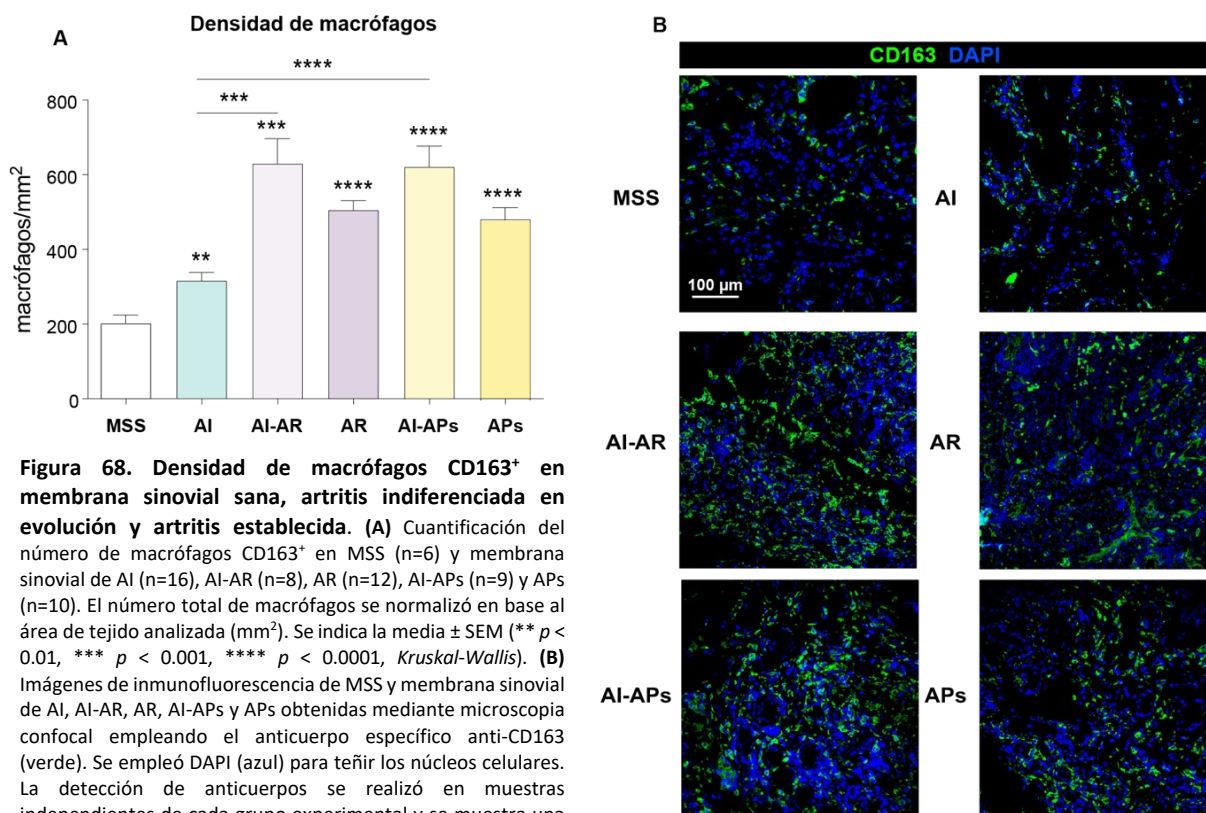


Figura 68. Densidad de macrófagos CD163⁺ en membrana sinovial sana, artritis indiferenciada en evolución y artritis establecida. (A) Cuantificación del número de macrófagos CD163⁺ en MSS (n=6) y membrana sinovial de AI (n=16), AI-AR (n=8), AR (n=12), AI-APs (n=9) y APs (n=10). El número total de macrófagos se normalizó en base al área de tejido analizada (mm²). Se indica la media ± SEM (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, *Kruskal-Wallis*). (B) Imágenes de inmunofluorescencia de MSS y membrana sinovial de AI, AI-AR, AR, AI-APs y APs obtenidas mediante microscopia confocal empleando el anticuerpo específico anti-CD163 (verde). Se empleó DAPI (azul) para teñir los núcleos celulares. La detección de anticuerpos se realizó en muestras independientes de cada grupo experimental y se muestra una imagen representativa de cada grupo. Escala de 100 µm.

AI, AR y APs muestran una predominancia de un patotipo sinovial *linfo-mieloide* y *mieloide-difuso*

La heterogeneidad en la composición celular del tejido sinovial en pacientes con artritis permite definir tres categorías histológicas o patotipos: *linfo-mieloide*, con predominancia de células B y macrófagos; *mieloide-difuso*, con predominancia de células de linaje mieloide, y *pauci-inmue*, con predominancia de células estromales³¹⁴. Para determinar el patotipo predominante en AI, AI-AR, AI-APs, AR y APs, tal y como se describen en las referencias indicadas^{314,379} se realizó la tinción de linfocitos T (CD3), linfocitos B (CD20), células plasmáticas (CD138) y macrófagos (CD68) mediante inmunohistoquímica en el tejido sinovial de cada grupo experimental. Los resultados mostraron que, en todos los grupos experimentales de artritis, los patotipos más frecuentes fueron *linfo-mieloide* y *mieloide-difuso*, en un rango de 40-50% de pacientes, mientras que el patotipo *pauci-inmune* solo representó entre 8-12% de pacientes. Además, la prevalencia relativa del patotipo *linfo-mieloide* en la cohorte de pacientes con AR (n=12) fue mayor que en su fase indiferenciada (AI-AR, n=8) (75% vs. 50) (**Tabla 17**).

| | PATOTIPOS SINOVIALES | | | | | |
|------------------------|----------------------|----------------------|----------------|--------------|-----------------|---------------|
| | AI naïve (n=7) | AI + FAMEsc (n=9) | AI-AR (n=8) | AR (n=12) | AI-APs (n=9) | APs (n=10) |
| Linfo-mieloide | 3 (42.9) | 3 (33.4) | 4 (50) | 9 (75) | 3 (44.5) | 4 (40) |
| Mieloide-difuso | 4 (57.1) | 3 (55.6) | 3 (37.5) | 2 (16.6) | 4 (44.5) | 5 (50) |
| Pauci-inmune | 0 | 1 (11) | 1 (12.5) | 1 (8.4) | 1 (11) | 1 (10) |

Tabla 17. Patotipo del tejido sinovial de los diferentes grupos de artritis inflamatoria del estudio. Representación de los patotipos del tejido sinovial (*linfo-mieloide*, *mieloide-difuso*, *pauci-inmune*) de pacientes con AI naïve (AI sin tratamiento) y AI FAMEsc (AI en tratamiento con fármacos modificadores de la enfermedad sintéticos convencionales), AI-AR, AR, AI-APs y APs. Se indica el número y el porcentaje (entre paréntesis) de muestras de cada grupo experimental.

En conjunto, los resultados del *Capítulo III* indican que la citoquina GM-CSF se expresa en células endoteliales CD90⁺, fibroblastos CD90⁺ FAP⁺ y macrófagos CD163⁺ del *sublining* de la membrana sinovial y que, al contrario que en tejido sinovial sano, macrófagos CD163⁺ expresan marcadores asociados con la polarización por GM-CSF y con un perfil proinflamatorio en todas las fases de artritis. Sin embargo, la expresión de CD209, asociado con la polarización de macrófagos antiinflamatorios, se da tanto en artritis como en tejido sinovial sano, y, es menor en la membrana sinovial de AI persistente que en AR y APs. Además, destacan algunas diferencias entre AI persistente y sus fases en evolución: a) mayor expresión de activina A en el líquido sinovial de AI-AR respecto AI; b) menor expresión de MMP12 en la membrana sinovial de AI en evolución (AI-AR y AI-AP) que AI persistente y en AI-AR respecto a AR; y, c) mayor densidad de macrófagos en tejido sinovial de AI-AR y AI-APs que en AI persistente. Globalmente, los resultados confirman el papel de GM-CSF como un fuerte conductor de la polarización de macrófagos en diferentes fases de artritis y sugieren su potencial como diana terapéutica no solo en AR y APs, sino también en artritis indiferenciada.

D I S C U S I Ó N

MTX promueve inmunidad entrenada *in vivo*

El MTX en monoterapia es el fármaco de primera línea en pacientes con artritis reumatoide (AR) que no se han tratado anteriormente con fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME *naive*). Además, el MTX también se emplea en combinación con otros FAMEs como segunda línea terapéutica²³⁷. A pesar de que el porcentaje de pacientes que responde a MTX es similar al de otros FAMEs (el 30% de los pacientes son respondedores o entran en remisión), en algunos pacientes genera intolerancia y en otros, resistencia. Se desconocen las causas de la falta de respuesta clínica al fármaco y no se han validado marcadores de respuesta de utilidad clínica³⁸⁰. En este sentido, entender y conocer al detalle el mecanismo de acción del MTX como fármaco antiinflamatorio e inmunomodulador en AR es sumamente relevante, ya que podría desenmascarar todas estas cuestiones y permitir la mejora de su eficacia e, incluso, el diseño de una nueva clase de FAMEs. Tal y como se comentó en la *Introducción* (ver apartado 4.2.5), se han postulado algunos mecanismos que explicarían la acción antiinflamatoria del MTX como la restauración de la expresión de genes del metabolismo del folato alterados en AR, el aumento de la liberación de adenosina extracelular con efecto inmunosupresor, la inhibición de reacciones de metilación y de la acumulación de poliaminas, la supresión de función de la alarmina HMGB1, el desacoplamiento de la enzima NOS o el aumento de la expresión de *lincRNA-p21*^{232,381,382}. Incluso se ha propuesto recientemente que el efecto del MTX en la microbiota del hospedador disminuye la respuesta inmune, explicando así los efectos antiinflamatorios³⁸³. De todas estas propuestas, la que presenta mayor relevancia es la hipótesis del efecto antiinflamatorio que induce la liberación de la adenosina (**Figura 18**). Por ejemplo, la inhibición de NFκB por MTX en fibroblastos sinoviales (FLS) es dependiente de adenosina²³². Aun así, muchos datos sobre la adenosina son contradictorios y no pueden explicar todos los efectos del MTX como fármaco inmunomodulador y antiinflamatorio en AR. Asimismo, el desacoplamiento de NOS y aumento de *lincRNA-p21* hacen referencia al mecanismo de acción antiinflamatorio del MTX en linfocitos T²³².

Los macrófagos resultan la mayor población de leucocitos infiltrados durante la inflamación sinovial y desempeñan un papel crítico en la patología de la artritis reumatoide. En este contexto, nuestro grupo de investigación ha demostrado que la respuesta a MTX depende del estado de activación del macrófago. Así, el MTX modula la expresión génica de macrófagos proinflamatorios, diferenciados en presencia de GM-CSF (GM-MØ). Este tipo de macrófagos expresan mayores niveles de la enzima timidilato sintasa (TS) y acumulan mayores niveles de poliglutamatos de MTX (MTX-Pgl) que macrófagos antiinflamatorios¹⁹¹. La acción antiinflamatoria del MTX en estas células se debe a que el MTX es capaz de condicionar a GM-MØ a la adquisición de un estado de *tolerancia* inmunológica frente a estímulos proinflamatorios. La preestimulación con MTX reprograma a GM-MØ *in vitro* de manera que responden de forma atenuada a derivados de patógenos (LPS, LTA), TNF-α y al líquido sinovial de pacientes con AR y disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias lo que contribuye a la acción antiinflamatoria del fármaco (**Figura 20**)¹⁸⁶. La *tolerancia cruzada* de MTX a LPS se ha verificado en un modelo de sepsis murino *in vivo* donde ratones tratados durante 7 días con MTX muestran una menor producción de IL-6 y TNF-α en suero en respuesta a LPS. El mecanismo de *tolerancia cruzada* inducido por MTX en GM-MØ está mediado por un aumento de la expresión de A20, regulador negativo de la señalización de NFκB y descrito como gen de susceptibilidad en AR^{266,267}. La trascendencia fisiopatológica de estos resultados se apoya en muestras de pacientes con AR, donde la expresión del gen *TNFAIP3* (que codifica para A20) en PBMCs es mayor en pacientes que responden a la terapia con MTX que en pacientes no respondedores¹⁸⁶.

El *Capítulo I* de esta tesis aborda el Ensayo Clínico en Fase I “*Estudio de la acción tolerogénica de metotrexato sobre macrófagos como mecanismo de acción en enfermedades mediadas por mecanismos inmunes*” (número EudraCT: 2017-002902-11; código de protocolo: METOMAC) que se realizó como consecuencia de los resultados anteriormente descritos con el objetivo de verificar si la hipótesis de que la acción antiinflamatoria de MTX deriva de su capacidad de inducir un estado de *tolerancia* en el sistema inmunitario innato, se confirmaba en sujetos sanos *ex vivo*. El análisis de la cinética de dicho efecto nos ha permitido determinar el tiempo-respuesta de los posibles efectos de memoria inmune innata inducidos por MTX con el objetivo de realizar un posterior estudio observacional en pacientes con AR que fuesen a iniciar tratamiento con MTX en monoterapia. Así, a partir de la administración de una única dosis de MTX oral a seis sujetos sanos varones y la extracción de 100 ml de sangre periférica antes (basal) y después de la administración de MTX (3, 24 y 120h post-MTX) se determinaron los niveles de citoquinas en sangre periférica, monocitos y macrófagos de cada una de las muestras. Los resultados derivados de este estudio han revelado que, en comparación con los niveles basales, 5 días después de la toma de MTX disminuye la expresión de IL-6, IL-1 β e IL-10 (en plasma) y TNF- α (en monocitos CD14⁺) en respuesta a LPS. Además, 5 días después de la toma de MTX los monocitos presentan un perfil transcripcional menos proinflamatorio y más profibrótico y reparador.

El MTX se considera un profármaco, un compuesto que tiene que sufrir una modificación bioquímica para dar lugar a su forma activa. En el interior celular, la enzima FPGS poliglutamila el MTX y los poliglutamatos de MTX (MTX-Pgl) son la forma activa del fármaco. La retención de MTX-Pgl en el interior celular es mayor que el tiempo de vida del fármaco en plasma. El MTX-Pgl se detecta en tejidos durante semanas²⁵¹ y durante largos periodos de tiempo en el hígado y en precursores mieloides de médula ósea³⁸⁴. Los datos descritos en la literatura sobre la farmacocinética de MTX en pacientes con AR indican que el MTX presenta una vida media de 6 horas en sangre y alcanza concentraciones plasmáticas máximas que varían desde 0.3 a 1.6 $\mu\text{mol/L}$ entre 0.75-2 horas después de su administración por vía oral y no se detecta en suero tras 18 horas^{249,250,385}. Estos datos coinciden con los parámetros farmacocinéticos de MTX obtenidos en el Ensayo Clínico METOMAC. Nuestros resultados muestran que 1 hora después de la toma de 20 mg de MTX se detecta la máxima concentración de MTX en plasma (Cmax) y que ésta oscila entre 0.486 (sujeto #6) y 0.976 μmol (sujeto #4) en función del sujeto (**Tabla 12 y Anexos**). Del mismo modo, a partir de 24 horas después de la toma no se detecta MTX en plasma.

La medición de la expresión de citoquinas en sangre periférica tras 15h de estimulación con LPS reveló que 5 días después de la toma de MTX disminuía la producción de IL-6, IL-1 β e IL-10 y que esta disminución no se producía como consecuencia de una reducción del número de células inmunes productoras de las mismas. Estos resultados indican que la toma de MTX no induce leucopenia en sangre, pero atenúa la respuesta de leucocitos a LPS, lo que es compatible con que MTX induce un estado de *tolerancia cruzada* a LPS *in vivo* en sangre periférica. Tal y como se comentó en la *Introducción* (ver apartado 4.2.5), el mecanismo de acción antiinflamatoria del MTX se ha descrito en linfocitos T (**Figura 19**). En este tipo celular el MTX disminuye la expresión de *RELA* que codifica la subunidad p65 de NF κ B. La disminución del dímero activo de NF κ B (p50-p65) implica una menor transcripción de sus genes diana como *IL6*, *IL1B* y *TNFA*^{229,232}. Lo que induce a pensar que el efecto de disminución diferencial entre citoquinas en plasma y en monocitos en respuesta a LPS, pueda deberse a que en plasma el MTX, además de actuar en monocitos, induce un efecto antiinflamatorio en otras células del torrente sanguíneo entre las que se incluyen los linfocitos.

La secuenciación del transcriptoma y la comparación del perfil génico mediante *RNAseq* de monocitos aislados a nivel basal y post-MTX (3h, 24h y 120h) con las condiciones $adjp < 0.05$ y $Log_2|FC| > 1$ mostró que ningún gen varió su expresión de forma significativa entre las diferentes condiciones. Sin embargo, el análisis *GSEA* reveló que, respecto a nivel basal, 5 días (120h) después de la toma de MTX disminuye la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria, genes implicados en la ruta de señalización de NFκB en respuesta al *TNF*, y, de genes involucrados en la respuesta a IFN (*IFNA* e *IFNG*), todas ellas rutas relacionadas con la respuesta inmune innata durante la inflamación y, en concreto, con la respuesta inflamatoria a LPS. Asimismo, el perfil transcripcional de 120h post-MTX vs. Basal reveló un enriquecimiento positivo en genes que aumentan su expresión en respuesta a *TGFB1*. La ruta de señalización de TGF-β está estrechamente relacionada con la regeneración y reparación de tejidos, funciones características de macrófagos con un perfil regulador y antiinflamatorio compatible con un fenotipo *tolerizado*¹⁶³. Estos resultados confirman que la respuesta inmune de los monocitos disminuye después de la toma de MTX, que presentan un perfil transcripcional menos proinflamatorio y más sesgado hacia funciones profibróticas y reparadoras, característico de un perfil antiinflamatorio, y compatible con la adquisición de un estado de tolerancia transcripcional a LPS. El efecto de MTX en monocitos se ha descrito en diferentes líneas celulares monocíticas, donde el MTX, además de promover apoptosis, induce un aumento dosis-dependiente de la expresión de citoquinas proinflamatorias IL-1β, TNF e IL-6 a través de un mecanismo dependiente de NFκB y de la adenosina³⁸⁶. Respecto su acción antiinflamatoria en AR, se ha descrito que el MTX estimula la producción de TIMS por monocitos *in vitro*, inhibidores endógenos de MMP²²⁹, y en monocitos de pacientes con AR disminuye la expresión de los receptores FcγRI e IIa³⁸⁷. Al analizar los niveles de expresión del *mRNA* de *TNFAIP3*, aunque no resultaron estadísticamente significativos, se observó una tendencia en el aumento de expresión de A20 en monocitos 120h post-MTX respecto a monocitos aislados a nivel basal (**Figura 43 y Anexos**). Dado el efecto inhibitorio de A20 a diferentes niveles de la ruta de señalización por TLR4¹⁸⁶, este dato apoyaría una menor sensibilidad a LPS en monocitos 120h post-MTX, compatible con un estado de *tolerancia cruzada* a LPS.

Además del pequeño tamaño muestral, la variabilidad de la respuesta clínica a MTX entre sujetos (la expresión de citoquinas en plasma y monocitos de cada uno de los sujetos se muestra en **Anexos**) podría explicar la falta de significación estadística de los datos analizados. Tanto a nivel de efectos de toxicidad como de eficacia del fármaco existe una gran heterogeneidad interpersonal en la respuesta a MTX. Entre el 30-50% de los pacientes no responden al tratamiento o su eficacia disminuye tras tratamientos prolongados e incluso, acaban desarrollando resistencia al fármaco²³¹. La variabilidad de los efectos del MTX entre pacientes se debe a factores específicos de la enfermedad como la duración, el grado de severidad y de actividad de la enfermedad pero también contribuyen factores genéticos e intrínsecos del paciente como sexo, edad, etnia o comorbilidad asociada a la enfermedad e incluso la propia microbiota influye en la respuesta clínica al fármaco^{229,383}. La resistencia a antifolatos poliglutamilables se asocia, entre otros mecanismos, con una pérdida o disminución de la actividad de la enzima FPGS. En el contexto del MTX, la FPGS tiene especial relevancia al resultar la enzima clave en el metabolismo intracelular del fármaco y en la formación de los MTX-Pgl en pacientes con AR³⁸⁸. Un estudio reciente ha descrito la asociación de alteraciones en el *splicing* de la FPGS con la respuesta a MTX en pacientes con AR. La retención del intrón 8 de la FPGS (8PR FPGS) da lugar a una forma de la proteína truncada y a una enzima disfuncional. Aunque resulta un estudio preliminar, se ha asociado la variante 8PR FPGS con una menor respuesta a MTX en pacientes con AR en base al índice DAS44³⁸⁹. Diferentes polimorfismos y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes que codifican para el transporte intracelular de

MTX (RFC, ABCB1 y ABCG2), genes de enzimas del metabolismo del folato (MTHFR, DHFR, ATIC) y enzimas implicadas en la ruta de la adenosina (ADA) se han asociado con la respuesta a MTX en diferentes enfermedades ²²⁹. Distintas variantes en los genes que codifican las enzimas TYMS, DHFR, MTHFR y MTHFD1 se asocian con la farmacodinámica y respuesta a MTX en el tratamiento del cáncer, así como, variantes de MTR, TLR4, ATIC, ADA y ADORA2A se asocian con respuestas al fármaco en enfermedades inflamatorias. Los polimorfismos del gen *SLCO1B1*, rs4149081 y rs11045879, se han asociado con el aclaramiento de MTX y la toxicidad gastrointestinal. Las variantes en *SLC19A1*, *ABCB1* y *ABCG2* están asociadas con la respuesta a MTX en pacientes con AR y variantes en *ABCG2* con la resistencia al fármaco ³⁹⁰. En este sentido, el impacto de las variantes genéticas en la farmacocinética y el transporte de metotrexato podría explicar la ausencia de significación estadística de alguno de nuestros datos debido a la falta o menor respuesta de algún sujeto del estudio al MTX.

La memoria inmune innata o *inmunidad entrenada* se basa en la alteración del estado funcional de las células inmunes innatas que persiste durante semanas, meses e incluso años después de la eliminación del primer estímulo ¹⁴⁵. Las células mieloides presentan una vida media en sangre periférica de pocos días y, sin embargo, los efectos de *inmunidad entrenada* se mantienen y propagan durante largos periodos. En este aspecto, recientemente se ha descrito como funciona la *inmunidad entrenada* a nivel sistémico y como los efectos de reprogramación celular también tienen lugar a nivel de células madre y progenitores mieloides. La hematopoyesis es el proceso dinámico de generación de células sanguíneas leucocitos, eritrocitos y plaquetas que ocurre a lo largo del desarrollo de los vertebrados. Las HSCs son el precursor común a todos los tipos celulares sanguíneos. Tienen capacidad de autorenovación y pluripotencialidad, se localizan en nichos especializados de la médula ósea que mantienen y regulan las células madre en un microambiente óptimo. Durante la hematopoyesis pierden su capacidad de autorenovación, dando lugar a progenitores multipotentes (MMPs) que se diferencian en el linaje mieloide y linaje linfoide con el potencial de diferenciación reducido. El precursor común del linaje linfoide es el progenitor linfoide común (CLP) que da lugar a linfocitos T, linfocitos B, ILCs y células NK, mientras que las células mieloides derivan del progenitor mieloide común (CMP) ^{391–395}. La memoria inmune innata que tiene lugar en células progenitoras hematopoyéticas (HSPCs) y progenitores mieloides se conoce como *inmunidad entrenada central*. Los efectos de la vacunación con BCG a nivel de HSPCs han proporcionado la explicación mecánica de los efectos persistentes de la vacuna en las células inmunes innatas circulantes y de muchas de las observaciones epidemiológicas de los beneficios no específicos de la vacunación durante los años posteriores. La vacunación con BCG *in vivo* induce cambios transcripcionales en el compartimento de HSPCs de la médula ósea en individuos sanos, para los que resultan reguladores claves los factores nucleares hepáticos (HNF) 1 y 2. Estas modificaciones transcripcionales van acompañados de un aumento persistente de células respondedoras a estímulos heterólogos. La remodelación epigenética de HSPCs también se transporta a monocitos CD14⁺ periféricos que exhiben un estado persistente de *inmunidad entrenada* tras tres meses después de la vacunación. Además, la *inmunidad entrenada* inducida por la vacunación no se acompaña de cambios en las frecuencias de células mieloides o de poblaciones de progenitores mieloides dentro de la sangre periférica o de los compartimentos de la médula ósea ¹⁵⁴. De forma semejante, se ha demostrado como una dieta alta en grasas (*high-fat diet* o *Western diet*) es capaz de inducir una reprogramación epigenética y transcriptómica duradera en células precursoras de monocitos y granulocitos (GMPs) que aumenta la proliferación y la respuesta inmune innata. Esta respuesta se mantiene, incluso, cuando se modifica la dieta, indicando que la dieta alta en grasas induce efectos de *inmunidad entrenada* a largo plazo en células mieloides. Mecánicamente, el inflamosoma NLRP3 y la IL-1 β están implicados en este proceso ³⁹⁶.

Los resultados del Ensayo Clínico METOMAC nos han permitido hipotetizar que, al igual que ocurre con BCG, β -glucano o con la IL1 β producida en respuesta a la *Western diet*^{137,152,396}, MTX puede acceder a la médula ósea y reprogramar a las células madre progenitoras hematopoyéticas para generar monocitos y macrófagos con un perfil metabólico, epigenético y transcripcional *tolerante* que desarrollan una respuesta atenuada o reducida y, por tanto, protectora frente a los estímulos inflamatorios presentes en la membrana sinovial de pacientes con AR (**Figura 69**). Esta hipótesis se apoya en: i) El MTX puede acumularse en precursores mieloides de médula ósea en forma de poliglutamatos (MTX-Pgl) *in vivo e in vitro*^{384,397}; y, ii) Resultados obtenidos en células mieloides inmaduras de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA)³⁹⁷ que abordan la farmacocinética de MTX en células mieloides dentro del compartimento de la médula ósea y de neutrófilos en sangre periférica. Tras la infusión con MTX, las células mieloides inmaduras, en proliferación, retienen mucho más MTX que células mieloides maduras o neutrófilos circulantes. A los 8 días de la infusión se detecta MTX y MTX-Pgl en neutrófilos de sangre periférica. El tiempo de intervalo entre la infusión de MTX y la reaparición de MTX a los 8 días en neutrófilos circulantes días correlaciona con el tiempo en que el fármaco es captado por las células mieloides de la médula ósea en proliferación, se diferencian a células maduras y se liberan a la sangre como neutrófilos. La variabilidad en el tiempo de maduración de las células mieloides en la médula ósea explica que la concentración de MTX en las células mieloides inmaduras durante la infusión no se corresponda con la concentración de MTX en neutrófilos 8 días después³⁹⁷. En este sentido, nuestros resultados nos permiten hipotetizar que el MTX podría acceder a la médula ósea y entrar en precursores mieloides hematopoyéticos donde quedaría retenido mediante poliglutamilación (MTX-Pgl). Así, a partir de los precursores mieloides en proliferación, se generarían monocitos *tolerantes* o *tolerizados*, con un perfil metabólico, epigenético y transcripcional modificado, que comienzan a aparecer en la circulación cinco días después de la toma de MTX.

El Ensayo Clínico METOMAC presenta algunas limitaciones, incluyendo el pequeño tamaño de la muestra con únicamente 6 sujetos, la limitación del volumen de sangre (100 ml) y el ajuste de un momento determinado de la toma de la muestra. Hay que tener en cuenta la dificultad de extrapolar un sistema dinámico a la medición de citoquinas a partir de la muestra de sangre en un momento determinado. Los monocitos se están continuamente renovando a partir de células madre progenitoras hematopoyéticas, su vida media en sangre varía oscila entre 24-72h y se infiltran en los tejidos dando lugar a macrófagos^{4,398}. En este sentido, la muestra de sangre puede contener tanto monocitos sin MTX-Pgl (proviene de progenitores que aún no han internalizado el MTX) como monocitos con MTX-Pgl (recién renovados de médula ósea y que provienen de progenitores mieloides que han internalizado el MTX) que hiporesponden a LPS. Aun así, la importancia de los resultados derivados de este estudio demuestra la capacidad de MTX de inducir *tolerancia cruzada in vivo* y nos han permitido seleccionar el tiempo de 5 días después de la toma de MTX como tiempo-respuesta de visualización de los efectos de la inducción de *inmunidad entrenada* por MTX. Actualmente, y en base a estos resultados, se está desarrollando un estudio observacional (número: IGA-MET-2019-01; código del protocolo: METOMAC-PAC) con muestras de pacientes con AR de reciente comienzo que inician tratamiento con MTX en monoterapia según la práctica clínica habitual en el Servicio de Reumatología del HULP y del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM). El objetivo de este estudio es determinar la influencia entre los niveles de MTX-Pgl intracelulares, el estado inflamatorio de los pacientes con AR y la eficacia clínica de MTX. A los pacientes que participan en el estudio se les extrae sangre en la visita inicial antes de empezar el tratamiento, a los 5 días (tal y como nos indican los resultados del Ensayo Clínico METOMAC) y al mes de iniciar el tratamiento con MTX en monoterapia. De forma similar a los experimentos

realizados en el *Capítulo I*, la actividad inflamatoria de los monocitos de sangre periférica se evalúa mediante la capacidad de producción de citoquinas proinflamatorias tras la estimulación con LPS *ex vivo*. Además, se cuantificarán los niveles de MTX-Pgl en monocitos a los diferentes tiempos tras la toma de MTX. Por su parte, para determinar la eficacia clínica del fármaco *in vivo* se realiza una evaluación ciega de los resultados de los niveles de MTX-Pgl intracelular por un reumatólogo. Se determinará si existe una relación entre los niveles de MTX-Pgl intracelulares, la actividad inflamatoria de monocitos *ex vivo* y la eficacia clínica del fármaco *in vivo*. Por otro lado, se evaluará la posible relación existente entre los niveles de MTX-Pgl intracelular en precursores mieloides de médula ósea y monocitos de sangre periférica y su estado inflamatorio *ex vivo* en ratones C57BL6/J tratados con MTX. Todo ello nos permitirá establecer si existe una relación entre la retención de MTX intracelular y la memoria inmune innata.

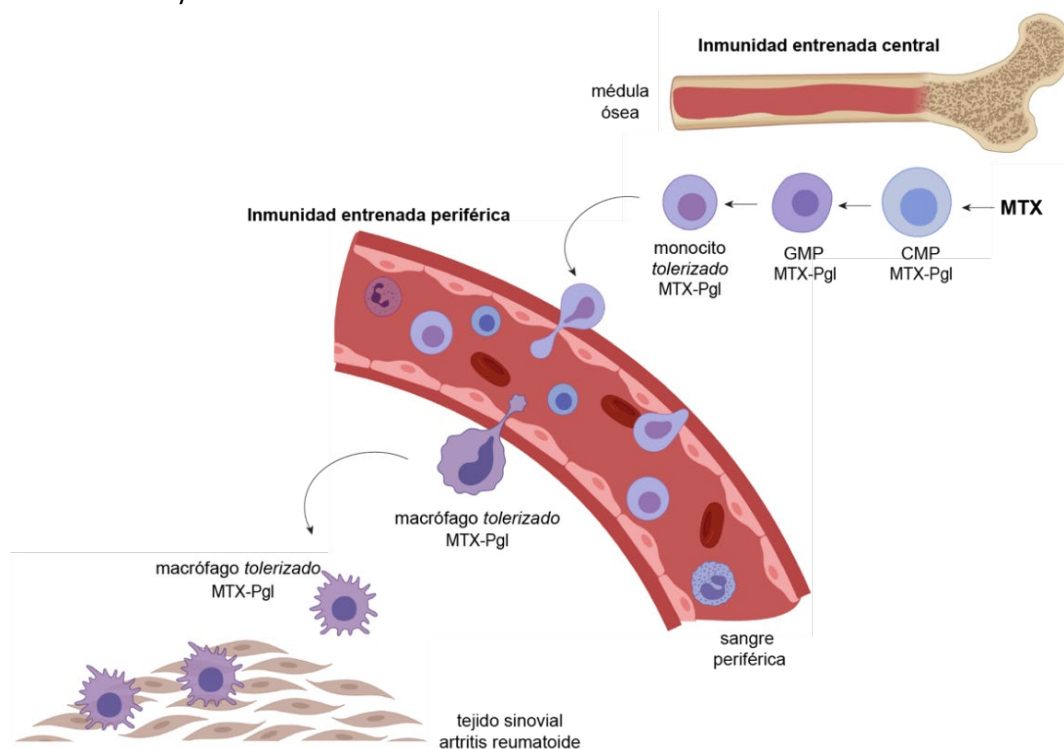


Figura 69. Modelo propuesto del mecanismo de acción de MTX en pacientes con artritis reumatoide. El MTX accede a la médula ósea y se acumula en células progenitoras mieloides mediante poliglutamilación (MTX-Pgl). A partir de la proliferación y diferenciación de CMP a GMP se generarían monocitos con un fenotipo *tolerante* que aparecen en la circulación cinco días después de la toma de MTX. Los monocitos *tolerizados* circulan e infiltran en el tejido sinovial inflamado y se diferencian a macrófagos *tolerantes* que, ante los estímulos inflamatorios y las moléculas de daño presentes en la cavidad sinovial de pacientes con AR, exhiben una respuesta atenuada y menos proinflamatoria que macrófagos residentes lo que contribuiría a la acción antiinflamatoria del fármaco. CMP: progenitor mielode común; GMP: progenitor granulocítico-mielode; MTX-Pgl: poliglutamatos de MTX.

PMX reprograma macrófagos e induce un estado de tolerancia cruzada a LPS

El estado de activación de los macrófagos depende tanto de señales derivadas de su ontogenia como del conjunto de señales del microambiente donde se encuentran. El reconocimiento de factores de diferenciación, citoquinas y metabolitos, así como la respuesta a señales de daño, patógenos o a la activación de linfocitos activa diferentes rutas metabólicas, transcripcionales y postranscripcionales que determinan la adquisición o la pérdida de determinadas funciones efectoras. En este sentido, el metabolismo resulta un determinante esencial de la plasticidad funcional adquirida por los macrófagos bajo la influencia de estímulos derivados de su entorno tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. El metabolismo de un carbono (OCM), también conocido como metabolismo del

folato, es una red de rutas biosintéticas que incluye la biosíntesis de *de novo* de timidilato y purinas, el metabolismo de aminoácidos y reacciones de metilación^{192,197}. La relevancia fisiopatológica del OCM se ilustra mediante el bloqueo de enzimas implicadas en sus diferentes rutas metabólicas con antifolatos como el metotrexato (MTX) o pemetrexed (PMX), fármacos empleados como agentes quimioterapéuticos y, en el caso de MTX, fármaco antirreumático de primera línea en la artritis reumatoide y otras patologías autoinmunes¹⁹⁴. Los resultados del *Capítulo II* ilustran el efecto del OCM en el perfil de expresión génica y funcional de GM-MØ y el efecto antiinflamatorio global de MTX y PMX en este tipo de macrófagos.

El perfil génico de macrófagos diferenciados en presencia de PMX (PMX GM-MØ) reveló un enriquecimiento en genes representativos de la respuesta inflamatoria, genes regulados por NFκB en respuesta a *TNF* y genes implicados en la señalización de p53. Estos datos indican que en condiciones basales, el tratamiento con PMX promueve la adquisición de un perfil más proinflamatorio y dependiente de p53 en macrófagos GM-MØ, efecto que se equipara al anteriormente descrito por MTX en GM-MØ¹⁸⁶.

En el fenómeno de *tolerancia cruzada* o *cross-tolerancia* a LPS las células se exponen a un estímulo inicial diferente de LPS y responden de manera subóptima a la estimulación subsecuente con LPS^{150,185}. La diferenciación de macrófagos presencia de PMX durante 7 días y su posterior estimulación con LPS disminuye la expresión de genes de rutas relacionadas con la respuesta inmune innata durante la inflamación (respuesta a *IFNA* e *IFNG*, señalización de *IL6* vía *STAT3* y señalización de NFκB en respuesta a *TNF*) y aumenta la expresión de genes de la ruta de p53. La implicación de p53 en la modificación transcripcional inducida por PMX, tanto en condiciones basales como en respuesta a LPS, se confirmó en presencia de pifitrina, que disminuyó la expresión de *GDF15*, *LIF* y *CDKN1A*, genes diana de p53^{264,265} y genes de respuesta a MTX¹⁹¹ y PMX en GM-MØ. *CDKN1A* es un gen que codifica para p21 y que modula negativamente la respuesta de macrófagos en inflamación y está implicado en el establecimiento de un estado de tolerancia a LPS en macrófagos³⁹⁹. La deficiencia en p21 aumenta la activación de NFκB en respuesta a LPS y la producción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos^{400,401}. La implicación de p21 en la reprogramación de macrófagos se sitúa a nivel de dímeros de NFκB, regulando el balance entre el dímero activo p65-p50 e inactivo (carente del dominio de activación) p50-p50. La deficiencia en p21 reduce la afinidad del homodímero p50-p50 por el DNA en células estimuladas y, tras la reestimulación con LPS, y resulta en la adquisición de un perfil M2 antiinflamatorio de macrófagos alterado³⁹⁹. Se ha demostrado su valor terapéutico como diana en estados de shock séptico y en la regulación de macrófagos mediante un modelo experimental de AR^{400,401}. El papel de p21 como diana de p53 en la adquisición de un perfil antiinflamatorio y reparativo de macrófagos³⁹⁹ y la menor respuesta inmune a la estimulación con LPS del transcriptoma de PMX GM-MØ vs. GM-MØ confirman y apoyan la inducción de un estado de tolerancia a nivel transcripcional por PMX en macrófagos. Además, los cambios inducidos por PMX en la respuesta a LPS de GM-MØ no solo se reflejaron a nivel transcriptómico sino también a nivel funcional. En respuesta a LPS, GM-MØ se caracterizan por producir gran cantidad de IL-1β, IL-6, IL-12p40, IL-23 y TNF-α^{35,47,91,402}. Nuestros datos muestran como el tratamiento con PMX induce una menor activación de proteínas implicadas en la ruta de TLR4 (p38, JNK, NFκB, STAT1, IRF3) y, por consecuente, una menor producción de citoquinas proinflamatorias diana (IL-6, IL-1β, TNF-α, IFN-β y CXCL10) en respuesta a LPS señalando una modulación del perfil inflamatorio de GM-MØ característica del fenómeno de *tolerancia cruzada*^{150,164,185,186} y similar a los resultados previamente descritos de MTX en GM-MØ¹⁸⁶. Aunque el tratamiento con PMX no disminuyó la activación de la proteína MAPK ERK e indujo de forma sostenida su fosforilación (pERK), este resultado coincide con

los datos descritos previamente en otros sistemas celulares como en la línea celular A549 de cáncer de pulmón. En estas células el PMX induce el bloqueo de la fase S del ciclo celular y la apoptosis celular a través de la activación sostenida de ERK y del complejo Ciclina-A/Cdk2⁴⁰³. Empleando las condiciones $FC > 2$ y $adjp < 0.05$ para identificar genes diferencialmente expresados entre GM-MØ y PMX GM-MØ, no hay diferencias en la expresión de las proteínas ERK (*MAPK1*), JNK (*MAPK8*), P38 (*MAPK14*), *IRF3*, *STAT1* e *IKBA* (*NFKB1A*) (datos no mostrados). Por tanto, dado que la expresión de *MAPK1* es similar entre GM-MØ tratados o no con PMX, asumimos que el aumento de la fosforilación de ERK en PMX GM-MØ refleja mecanismos de regulación postranscripcional fuera de nuestro objetivo de estudio.

La regulación molecular de la señalización de TLR4 durante la TE se asocia con la expresión de proteínas que inhiben la ruta a diferentes niveles^{150,164}. En concreto, la estimulación prolongada con LPS se ha relacionado con la modificación de la expresión o actividad de A20, IRAK-M (*IRAK3*) o SHIP, intermediarios de la señalización por TLR4¹⁶⁴. En macrófagos, la *tolerancia cruzada* inducida por TNF- α a LPS está mediada por GSK3 y atenúa la señalización por TLR4 como consecuencia de un aumento de la expresión de A20 y de I κ B α ¹⁸⁵. La *tolerancia* de MTX por LPS en GM-MØ también está mediada por un aumento en la expresión de *TNFAIP3* (A20)¹⁸⁶. Aunque nuestros resultados indican un aumento de expresión de *TNFAIP3* en presencia de PMX, este cambio no se refleja a nivel de proteína. La inducción de *TNFAIP3* y la subsecuente expresión de su proteína A20 tiene lugar como respuesta fisiológica necesaria para la resolución de la inflamación tras la inducción de NF κ B en respuesta a patógenos⁴⁰⁴. Dado que esta deubiquitinasa representa parte del mecanismo de control homeostático de NF κ B, la expresión de A20 a nivel de proteína está altamente regulada y compleja. Se ha propuesto que varias proteínas de unión a A20 como ABIN y TRAF6 actúan como reguladoras de su actividad. Mutaciones en el dominio de unión a ubiquitinas de las proteínas ABIN afectan a su actividad inhibitoria de NF κ B⁴⁰⁴. Asimismo, la fosforilación de A20 en la Ser 381 por IKK β aumenta su potencial inhibitorio de NF κ B. La desregulación de *TNFAIP3*/A20 se relaciona con el desarrollo y la susceptibilidad a diferentes enfermedades autoinmunes entre las que se encuentra la AR en la que se han asociado los SNPs rs6920220, rs2230926 y rs5029937 con el riesgo de sufrir la enfermedad²⁶⁶. Debido a la importante función de A20 en la prevención de la inflamación excesiva y prolongada en respuesta a endotoxina y TNF, además de evaluar la cinética de expresión de A20 en un mayor número de donantes, sería necesario estudiar en futuros experimentos la especificidad de A20 en la implicación de la tolerancia inducida por PMX en GM-MØ mediante silenciamiento génico. Además, macrófagos carentes de A20 presentan niveles de pro-IL1 β y del adaptador NLRP3 (basales y en respuesta a LPS) aumentados respecto a macrófagos control y se ha demostrado la implicación del inflamosoma NLRP3 en la patogénesis de la artritis *in vivo*⁴⁰⁵. En este contexto, para poder tener un mayor conocimiento del mecanismo de la regulación de la proteína A20 en PMX GM-MØ sería interesante evaluar el efecto de PMX sobre la activación y expresión de diferentes moléculas implicadas en la activación del inflamosoma NLRP3 como la caspasa-1 e IL-1 β en macrófagos, así como la regulación negativa de A20 en la ruta IL-1 β e inflamosoma en PMX GM-MØ y GM-MØ.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que el efecto antiinflamatorio global del PMX es consecuencia de su capacidad para inducir un estado proinflamatorio en GM-MØ y condicionar a los macrófagos de forma que, ante la exposición a un segundo estímulo inflamatorio, como LPS, PMX GM-MØ exhiben una respuesta atenuada (**Figura 70**).

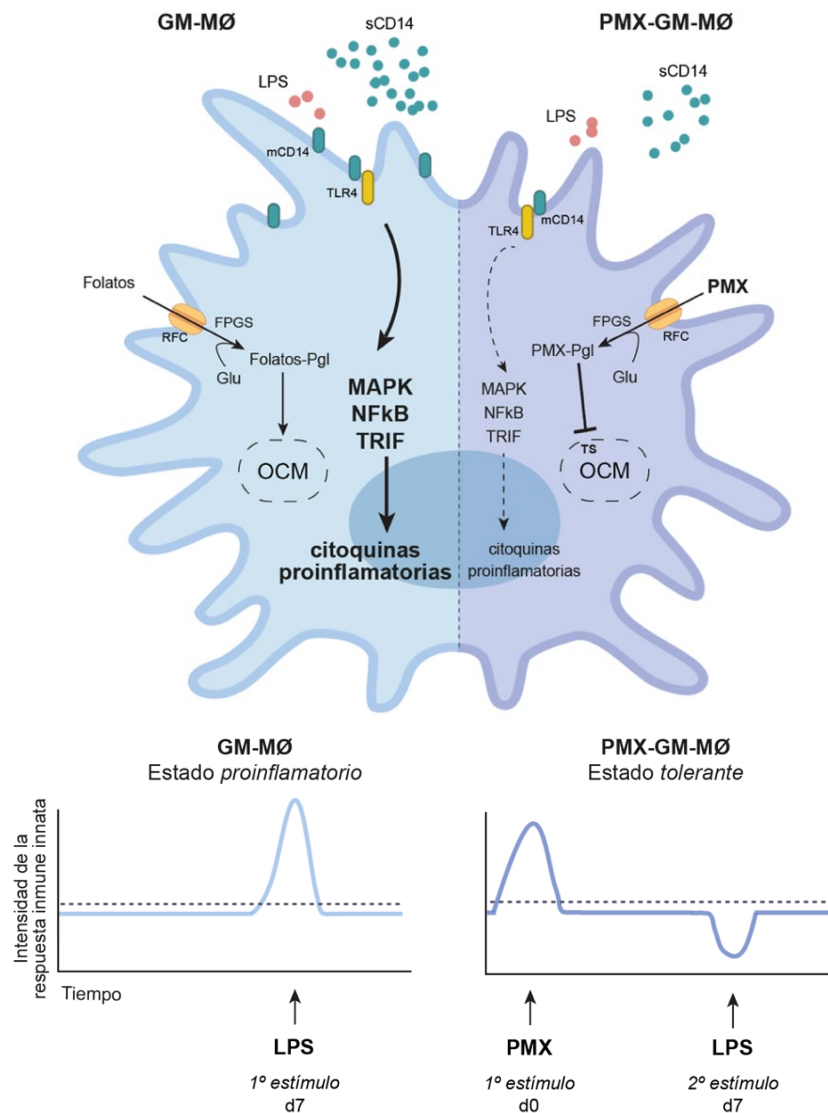


Figura 70. PMX induce un estado de tolerancia cruzada a LPS en GM-MØ. La diferenciación de monocitos a macrófagos con GM-CSF (GM-MØ) durante 7 días en presencia de PMX induce un estado de tolerancia de forma que, ante la estimulación subsecuente con LPS (día 7), los macrófagos responden de forma atenuada y disminuyen la expresión de genes y citoquinas relacionados con la respuesta inflamatoria.

Implicación del metabolismo de un carbono en la memoria inmune innata

Cambios metabólicos y epigenéticos median la activación de diferentes rutas de señalización y transcripción en células inmunes tras la exposición a patógenos. En consecuencia, no sorprende que el metabolismo celular sea un mecanismo principal en la reprogramación de células mieloides que media el establecimiento de la *inmunidad entrenada* o memoria inmune innata¹⁵⁸. Los estudios en reprogramación metabólica están incrementando en los últimos años y existen numerosas evidencias de la implicación de diferentes rutas metabólicas en la inducción de un estado *entrenado* y *tolerizado* o *tolerante*. Tanto el metabolismo de aminoácidos como el de lípidos son relevantes en la inducción de la memoria inmune innata¹⁵⁸. Rutas metabólicas como la glicólisis, glutaminólisis o el metabolismo del colesterol desempeñan un papel fundamental en la producción de citoquinas y modificaciones epigenéticas de células *entrenadas*^{159,165}. Un ejemplo de ello se muestra en monocitos *entrenados* por BCG o β-glucano que exhiben un aumento del ratio de glicólisis aeróbica y producción de lactato^{146,165}. En este sentido, el metabolismo glicolítico junto con la acumulación

de intermediarios de metabolitos del ciclo de *Krebs* controlan la metilación y acetilación de histonas permitiendo la apertura de la cromatina en zonas de genes proinflamatorios aumentando, así, la capacidad de respuesta ante un segundo estímulo ¹⁶⁵. Asimismo, el metaboloma de macrófagos con un fenotipo *entrenado* por β -glucano muestran, además de un aumento de la glicólisis y del metabolismo de la glutamina, un aumento en la síntesis de ácidos grasos y colesterol y la acumulación de fumarato, esencial para los cambios epigenéticos que tienen lugar durante la *inmunidad entrenada* ¹⁵⁹. Otros metabolitos de la síntesis del colesterol como mevalonato están implicados en la *inmunidad entrenada* inducida, además de por β -glucano, por BCG o por partículas de lipoproteínas oxidadas de baja densidad (oxLDL) ¹⁶⁶. En el contexto de *tolerancia*, el metabolito itaconato, producto de la descarboxilación del ciclo de *Krebs*, inhibe la degradación de I κ B α en respuesta a LPS e induce un estado de *tolerancia* en monocitos humanos ¹⁶⁹. En este trabajo ilustramos cómo los antifolatos MTX y PMX son capaces de reprogramar el estado transcripcional y funcional de macrófagos humanos e inducir un estado de *tolerancia* inmunológica, lo que demuestra que el metabolismo de un carbono (OCM) supone otra ruta metabólica más implicada en el establecimiento de la memoria inmune innata.

La especificidad del efecto de los antifolatos MTX y PMX en macrófagos se verificó en presencia de ácido folínico. El ácido folínico (5-formil-tetrahidrofolato o 5-CHO-THF), también conocido como leucovarina, da lugar a 5,10-metenil-THF en una reacción irreversible catalizada por la enzima 5,10-meteniltetrahidrofolato sintasa (MTHFS) y a partir del cual se forman el resto de folatos (**Figura 71**). Tal y como se comentó en la *Introducción* (ver apartado 3.2.), el 10-formil-THF citoplasmático interviene en la ruta biosintética de purinas al ser sustrato de GARFT (anillo imidazol) y de ATIC (intermediario IMP) y el 5,10-metilen-THF, que se reutiliza de manera cíclica, actúa como cofactor de la TS que interviene en la formación de dTMP precursor de dTTP esencial para la síntesis de *ново* de pirimidinas (**Figura 12**) ^{406,407}.

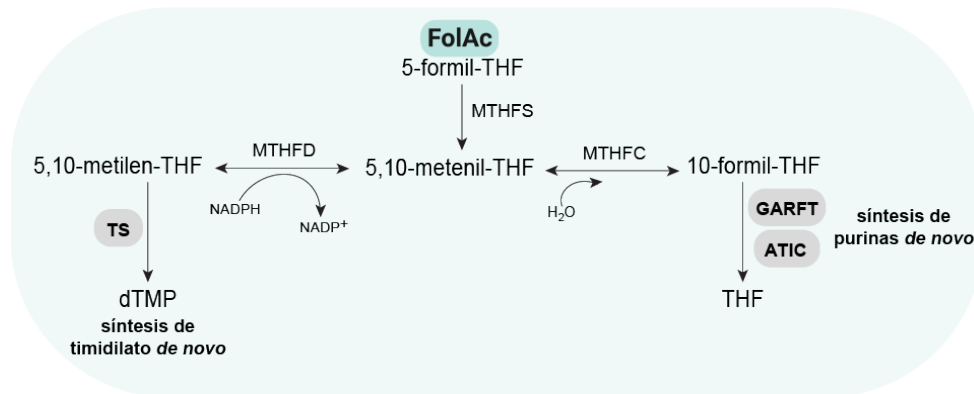


Figura 71. Representación esquemática de la formación de folatos a partir de ácido folínico. MTHFC: 5,10-meteniltetrahidrofolato ciclohidrolasa; MTHFD: 5,10-metilentetrahidrofolato deshidrogenasa; MTHFS: meteniltetrahidrofolato sintasa. Adaptado de ¹⁹⁵.

El transportador de folato reducido (RFC) media la entrada al interior celular de folatos y antifolatos y su transporte es dependiente de la temperatura, independiente de sodio y susceptible a la inhibición competitiva por sustratos. Además de haber empleado la concentración de 5 μ M ácido folínico (100x) en comparación con 50 nM de ambos antifolatos, la dosis de ácido folínico alcanza los niveles de *Vmax* del transportador RFC (*Km* = 1-5 μ M) mientras que la dosis de 50 nM en el caso de PMX se encuentra 20 veces por debajo de la afinidad de RFC por el antifolato PMX (*Km* = 1.1 μ M) ²⁸⁰ (**Figura 24**). Esto es indicativo de que en la condición experimental PMX+FolAc GM-M \emptyset , el ácido folínico compite con PMX por la entrada al interior celular y demuestra que el antifolato tiene que

internalizarse para realizar su acción. Incluso, si se internalizasen cantidades mínimas de PMX, el *pool* de folato intracelular aumentado por la aportación exógena de ácido folínico (5 μ M), competiría como sustrato por la enzima FPGS impidiendo, así, la formación de poliglutamatos de PMX (PMX-Pgl) (Figura 72). Estos datos, junto con el hecho de que la afinidad de PMX en forma de monoglutamato por sus enzimas diana es mínima, y en concreto, para su diana farmacológica principal, la TS ($K_m = 109$ nM vs. 1.3 nM de PMX-Pgl₅) (Figura 24), explican el resultado de la Figura 46C, donde la condición experimental LPS PMX+FolAc GM-M \emptyset iguala las condiciones del control LPS FolAc GM-M \emptyset , macrófagos estimulados con LPS en presencia de ácido folínico.

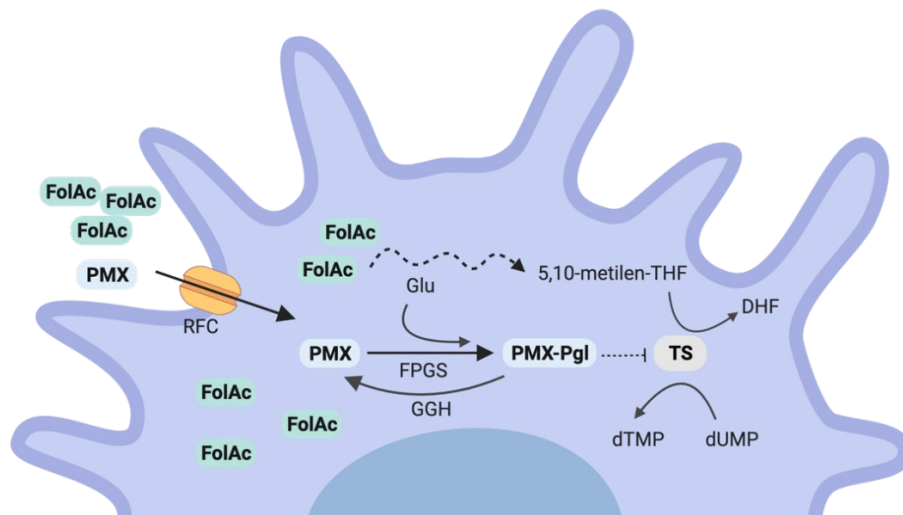


Figura 72. La especificidad del efecto del antifolato PMX en macrófagos se verifica en presencia de ácido folínico. El ácido folínico compete con PMX por la entrada al interior celular y por la formación de poliglutamatos.

La adaptación metabólica de los macrófagos como consecuencia de su respuesta a estímulos del microambiente resulta un componente clave en su polarización y plasticidad fenotípica para llevar a cabo sus funciones durante la homeostasis, inmunidad e inflamación. Así, el metabolismo de macrófagos antiinflamatorios M-M \emptyset se basa en la obtención de energía de la oxidación de ácidos grasos, fosforilación oxidativa y metabolismo de la glutamina mientras que GM-M \emptyset muestran eventos metabólicos que proporcionan energía de forma más rápida a la célula y equivalentes reductores necesarios para su actividad bactericida y proinflamatoria. GM-M \emptyset muestran un incremento en la síntesis de ácidos grasos y la glicólisis anaeróbica se induce tras la activación, aumentando la absorción de glucosa y la conversión de piruvato a lactato^{45,89}. En el contexto de la *inmunidad entrenada*, la disminución de lactato extracelular, del consumo de glucosa y la modulación del metabolismo hacia la fosforilación oxidativa se asocian con el fenómeno de *tolerancia* del sistema inmunitario innato^{167,168} y con el perfil metabólico de macrófagos antiinflamatorios⁸⁹. De forma opuesta, el fenotipo de monocitos *entrenados* por β -glucano se asocia con un aumento del consumo de glucosa, de la producción de lactato y del ratio del ratio de NAD⁺ a su forma reducida NADH¹⁴⁶. En este sentido, como una primera aproximación para determinar si MTX y PMX presentan la capacidad de modificar el metabolismo de GM-M \emptyset , se han realizado ensayos preliminares de medición de la concentración de lactato y glucosa extracelular en el sobrenadante de macrófagos diferenciados en presencia de ambos antifolatos. MTX GM-M \emptyset y PMX GM-M \emptyset presentan significativamente menor concentración de lactato extracelular y un menor consumo de glucosa que GM-M \emptyset , lo que indica un perfil metabólico menos glicolítico en presencia de ambos antifolatos. Asimismo, PMX GM-M \emptyset han revelado una disminución significativa del ratio celular de NADP⁺/NADPH respecto a GM-M \emptyset , que es compatible con un aumento de la capacidad de

transporte de electrones mitocondrial y metabolismo oxidativo ⁴⁰⁸. Aunque estos datos son preliminares resultan reproducibles y sugieren que a nivel basal MTX y PMX modifican el metabolismo glicolítico de GM-MØ, reducen el ratio de glicólisis y promueven una transición metabólica hacia la fosforilación oxidativa asociado con el perfil metabólico de macrófagos M-MØ antiinflamatorios ⁸⁹. Sin embargo, estos datos resultan contradictorios con los datos transcriptómicos que indican un efecto proinflamatorio de PMX y MTX en el perfil génico de GM-MØ, lo que sugiere profundizar en la modulación del perfil bioenergético de macrófagos por ambos antifolatos y analizar la tasa de respiración mitocondrial y la acidificación extracelular mediante *Seahorse*. También se podría ampliar la información sobre sus mecanismos de reprogramación metabólica mediante la determinación del efecto de diferentes moduladores de la respiración mitocondrial y glicólisis sobre los efectos funcionales de MTX y PMX GM-MØ. En el contexto de la *inmunidad entrenada*, la producción del metabolito itaconato es dependiente del gen *IRG1* (*immune-responsive gene 1*), cuya expresión aumenta tras la exposición a LPS. Dado que la expresión de *IRG1* desempeña un papel clave en el estado de inmunosupresión durante la sepsis en humanos ¹⁶⁹, se podría evaluar si la exposición a MTX y PMX durante la diferenciación de macrófagos GM-MØ y la posterior exposición a LPS altera la expresión de los niveles de itaconato o de *IRG1* y, en su caso, determinar la especificidad de los efectos en presencia de ácido folínico. Además, en relación con MTX y AR, diferentes rutas metabólicas y metabolitos de la respiración mitocondrial y del metabolismo de aminoácidos se han relacionado con la respuesta clínica a MTX en pacientes con AR ⁴⁰⁹, lo que plantea que sería interesante profundizar el estudio de estas rutas metabólicas y en el efecto funcional de MTX.

Tras la pandemia mundial de COVID-19 derivada de la infección con SARS-CoV-2, han sido numerosos los esfuerzos que se han realizado para intentar encontrar fármacos potencialmente eficaces para frenar el desarrollo de la enfermedad y mejorar la supervivencia de los pacientes. Además de la *tormenta de citoquinas* representativa de la respuesta inflamatoria exacerbada inicial, algunos estudios han demostrado que pacientes con COVID-19 también muestran un sistema inmunitario exhausto o colapsado caracterizado por una inmunosupresión posterior ⁴¹⁰⁻⁴¹³ que se asemeja a la tolerancia a endotoxinas que ocurre en pacientes con sepsis ^{150,175}. En este sentido, un estudio reciente ha demostrado la capacidad de la glicoproteína *spike* (S) y la proteína de la nucleocápside (N) de SARS-CoV-2 de inducir un fenotipo *tolerante* en PBMCs y monocitos de donantes sanos que se revierte en presencia de anticuerpos específicos anti-S y -N. Este resultado tiene especial relevancia al demostrar que pacientes con COVID-19 que desarrollan infecciones secundarias independientes a SARS-CoV-2 muestran mayores niveles de S y N en plasma ¹⁸⁹. Recientemente se ha descrito la implicación del OCM en la patogenia de SARS-CoV-2. En las células infectadas, SARS-CoV-2 deplecciona la glucosa y el folato e inhibe la traducción de proteínas del hospedador, pero no del *mRNA* viral. Estos resultados sugieren que el virus remodela el OCM a nivel postranscripcional y emplea la síntesis de *ново* de purinas para inducir la síntesis del RNA y la expresión de proteínas no estructurales, la replicación viral y el efecto citopático. La relevancia fisiopatológica del OCM en la infección por SARS-CoV-2 en estos experimentos se ilustra mediante el bloqueo de la replicación viral con antifolatos como MTX ⁴¹⁴. Estos resultados sugieren ampliar la investigación sobre la implicación del OCM del hospedador y la infección por SARS-CoV-2 y, en la posibilidad de la utilización de antifolatos como MTX o PMX, no solo por su mecanismo de acción antiinflamatoria, sino también como posible terapia antiviral frente al actual SARS-CoV-2 y frente a futuros coronavirus.

El 5-MTHF es la forma reducida y biológicamente activa de la vitamina B9 o folato y resulta un cofactor esencial para las enzimas del OCM, donde la transferencia de un átomo de carbono facilita la síntesis de nucleótidos y la metilación del DNA y proteínas⁴⁰⁷. La internalización de folato en macrófagos está mediado por RFC, el transportador de folato acoplado a protones (PCFT) y por el receptor de folato- β (FR- β) que difieren en la afinidad y al pH óptimo al que funcionan²⁰⁵. Mientras que el RFC se expresa principalmente en macrófagos proinflamatorios GM-M \emptyset *in vivo* e *in vitro*, PCFT y FR- β se coexpresan en macrófagos residentes en tejido y M-M \emptyset ^{99,103,415}, y esta expresión diferencial de transportadores de folato en los macrófagos con diferente polarización determina su capacidad para internalizar THF. En este sentido, macrófagos antiinflamatorios M-M \emptyset retienen más folato y captan mayor cantidad de folato a pH neutro y ácido que GM-M \emptyset . El hecho de que la expresión de transportadores de folato y la mayor o menor captación de THF sea polarización dependiente sugiere que los macrófagos juegan un papel importante en la disponibilidad de folatos en condiciones fisiológicas y patológicas⁴¹⁵ y resulta especialmente relevante considerando la habilidad del ácido fólico de actuar como antagonista natural del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR)⁴¹⁶. AhR es un factor de transcripción que regula genes implicados en procesos de detoxificación como los de la familia del citocromo P450 (*CYP1A1*, *CYP1B1*). Se considera un sensor que participa en la detección de cambios y alteraciones que se producen en el microambiente celular derivados de factores externos (medio ambiente y dieta) e internos (metabolismo del hospedador y derivados de la flora comensal) y contribuye al mantenimiento de la homeostasis^{417,418}. AhR se activa por la unión de ligando en respuesta a agonistas exógenos como xenobióticos (dioxina) y en respuesta a ligando naturales endógenos derivados del metabolismo del triptófano (ácido kinurénico o FITCZ), componentes presentes en la dieta (vegetales crucíferos) y otros metabolitos como bilirrubina o leucotrieno⁴¹⁸. En contexto de macrófagos, aunque AhR se expresa durante la diferenciación de macrófagos humanos *in vitro* en presencia de GM-CSF y M-CSF, la expresión de sus genes diana es mayor en M-M \emptyset que GM-M \emptyset y sugiere la activación preferencial de AhR en M-M \emptyset antiinflamatorios (datos no publicados, código TESEO ID 66755). En relación la memoria inmune innata, se ha descrito la implicación de AhR en la inducción de un estado de TE dependiente de la enzima IDO1 y de TGF- β ⁴¹⁹. En consonancia con estos datos, la inhibición de AhR durante la diferenciación de M-M \emptyset disminuye la expresión de genes característicos de su perfil antiinflamatorio (como *FOLR2*), aumenta la expresión citoquinas inflamatorias (Activina A, IL-6 y TNF- α), reduce la producción de IL-10 en respuesta a LPS y modifica el perfil metabólico, aumentando la expresión de genes implicados en la vía glicolítica y la producción del lactato extracelular (datos no publicados, código TESEO ID 66755). En este sentido, dada la implicación de AhR en la inducción de un estado de TE⁴¹⁹, el folato podría contribuir a la memoria inmune innata, además de como cofactor del OCM, como antagonista natural de AhR⁴¹⁶, y revertir el estado de tolerancia mediado por AhR⁴¹⁹.

CD14 media la adquisición de un estado de tolerancia inducida por antifolatos en macrófagos

Los resultados del *Capítulo II* demuestran la implicación de CD14 en el establecimiento del efecto pro-tolerante dependiente del OCM, tanto por PMX como por MTX, en macrófagos humanos. CD14 es una glicoproteína que está anclada a la membrana plasmática (mCD14) por un dominio glicosilfosfatidilinositol (GPI) y se expresa en células de linaje mielóide como monocitos, macrófagos, DCs y microglía. Al carecer de dominio intracelular, mCD14 actúa como correceptor en combinación con proteínas TLR formando los complejos CD14-TLR2 y CD14-TLR4 que resultan mediadores clave de la respuesta inflamatoria⁴²⁰⁻⁴²³. CD14 reconoce productos microbianos entre los que se encuentran LPS, LTA y HSP70³⁷⁴ y moléculas liberadas por células como los lípidos oxidados oxPAPC

⁴²⁴. Los oxPAPC se generan en zonas de daño tisular por la oxidación de lípidos que contienen fosforilcolina de la membrana plasmática de células en proceso de muerte ⁴²⁵, CD14 captura e internaliza estos fosfolípidos y la endocitosis de CD14 media la activación de células dendríticas y macrófagos en respuesta a oxPAPC ⁴²⁴. Así, al actuar como un PRR multiligando, mCD14 regula la respuesta a infección y daño.

En el contexto de la señalización de TLR4, el complejo LBP-LPS favorece la transferencia de LPS al monómero de CD14, que concentra y presenta LPS al complejo TLR4-MD2 de la membrana plasmática. La unión de LPS a TLR4-MD2 hace que éste dimerice y active a las proteínas TIRAP, MyD88 e IRAK ³⁷³. De forma más tardía, CD14 favorece la endocitosis del complejo TLR4-MD2 y controla la internalización de TLR4 en endosomas, que es requerida para la señalización desencadenada por el adaptador TRIF y para la degradación del receptor una vez ha finalizado la cascada inflamatoria ⁴²³. La regulación de la señalización de LPS por CD14-TLR4 es compleja y la función de CD14 como correceptor y PRR difiere en función del quimiotipo de LPS (rLPS o sLPS) y de su concentración ¹⁸⁰. Concentraciones menores de 10 ng/ml de sLPS (*smooth* LPS producido principalmente por *E.coli*) son incapaces de activar ambas rutas de TLR4, MyD88- y TRIF-dependientes, en ausencia de CD14, crucial para la producción de TNF- α en macrófagos ¹⁸⁰. Este dato concuerda con nuestros resultados que muestran una menor expresión de mCD14 y de proteínas implicadas en las rutas de TLR4 MyD88- y TRIF-dependientes, así como, de la de la producción de TNF- α en respuesta a 10 ng/ml de LPS (*E. coli* cepa *O111:B4*) de PMX en GM-M \emptyset . Respecto a TLR4, la expresión diferencial del *mRNA* de TLR4 en presencia o no de PMX en GM-M \emptyset , a diferencia de su similitud en la expresión a nivel de proteína en membrana, requiere de análisis más exhaustivos del efecto de PMX en la endocitosis de LPS-TLR4 en GM-M \emptyset para tener una visión más completa del mecanismo molecular subyacente. Sería interesante determinar, además de analizar la expresión de TLR4 permeabilizando las células, la expresión de proteínas de la ruta de señalización de PLC γ 2-Syk, implicada en la internalización de TLR4 en fagocitos y fibroblastos en respuesta a LPS ⁴²⁶.

Tras el encuentro con LPS, el complejo TLR4-MD2 heterodimeriza y se relocaliza en la membrana plasmática en microdominios de balsas lipídicas donde se localizan, entre otras, proteínas con anclaje GPI como CD14 ¹⁸⁰. A pesar de que la reducción de CD14 por MTX y PMX tiene lugar a nivel de *mRNA*, una de las hipótesis iniciales planteadas al detectar la reducción en la expresión de mCD14 fue que el tratamiento con PMX podría aumentar la internalización de proteínas de la zona de la balsa lipídica. A partir de los datos obtenidos del *RNAseq*, buscamos la expresión de proteínas localizadas en estos microdominios como TLR2 y CD36 relacionadas con la función de mCD14 y con la formación del complejo CD14-CD36-TLR2-LTA. La comparación del perfil génico de PMX GM-M \emptyset vs. GM-M \emptyset muestra una disminución significativa de *TLR2* (-1.13, $p=2.4973E^{-07}$) y de PMX GM-M \emptyset vs. GM-M \emptyset en respuesta a LPS muestra una disminución significativa de *CD36* (-0.61, $p=0.01353375$) y *TLR2* (-1.50, $p=3.20E^{-10}$) (datos no mostrados). El LTA, ácido lipoteicoico presente en bacterias Gram positivas, se internaliza con el complejo CD14-CD36-TLR2 mediante endocitosis independiente a clatrina. Sin embargo, la internalización de LTA-CD14-CD36-TLR2 y formación del endosoma no es necesaria para la señalización en respuesta a LTA y, en concreto, se ha descrito que CD14 no es necesario para la expresión de IFN mediada por la endocitosis de TLR2 ^{374,426}. Estos datos sugieren que la reducción en la expresión de mCD14 en macrófagos tratados con PMX no se produce como consecuencia de un aumento de la internalización de proteínas de la zona de la balsa lipídica. CD14 también se expresa en forma soluble (sCD14) en el medio extracelular ³⁷⁵. sCD14 se genera por varios mecanismos que incluyen la síntesis de *novo*, proteólisis de mCD14 o mediante endocitosis y exocitosis ⁴²². En línea con lo anteriormente expuesto y la expresión diferencial del *mRNA* de *CD14*

en macrófagos tratados o no con PMX, la disminución de sCD14 en PMX GM-MØ posiblemente derive de una disminución directa de la neosíntesis y expresión del gen *CD14*. Aun así, la producción de sCD14 también proviene del clivaje directo de su anclaje GPI a la membrana por fosfolipasas. Este mecanismo se ha descrito en el plasma de pacientes con sepsis que presentan concentraciones aumentadas de sCD14⁴²⁷. En este sentido, se podría analizar la expresión diferencial de proteasas, metaloproteasas o captasinas en PMX GM-MØ, MTX GM-MØ y GM-MØ y la concentración de sCD14 en presencia de inhibidores específicos de las mismas.

En células que no expresan CD14 en membrana, como células endoteliales y epiteliales, sCD14 es capaz de transferir LPS al complejo MD2-TLR4 e inducir la respuesta inflamatoria^{374,428}. En macrófagos, sCD14 forma el complejo de membrana con TLR4 e induce una cascada de señalización que implica la activación de NFκB y del complejo del inflamosoma y estimula la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1β, IL-8 y TNF-α de forma independiente a LPS⁴²². En este contexto, para confirmar la implicación de CD14 en la adquisición de un estado de *tolerancia cruzada* a LPS inducido por PMX y MTX en macrófagos empleamos la adición de sCD14 recombinante que restauró la sensibilidad a LPS en PMX GM-MØ y MTX GM-MØ. Este resultado amplía y refuerza el conocimiento sobre el mecanismo de la acción de MTX en GM-MØ, confirmando que su efecto antiinflamatorio es consecuencia de su capacidad para reprogramar a macrófagos hacia un estado de *tolerancia cruzada* a estímulos proinflamatorios mediado por un aumento de la expresión de A20¹⁸⁶ y por una disminución de CD14. El MTX induce estrés celular y liberación de ATP que mediante CD39 y CD73 aumenta la producción de adenosina extracelular con efecto inmunosupresor (**Figura 18**). Recientemente se ha descrito que la activación del receptor P2X7 (P2X7R) por ATP extracelular induce la activación del inflamosoma NLRP3 (70) y la liberación de CD14 en vesículas extracelulares. La ausencia de CD14 compromete la producción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos⁴³⁰, lo que apoya a la disminución de la expresión de CD14 como mecanismo de la acción antiinflamatoria de MTX en macrófagos.

Nuestros resultados demuestran que el bloqueo del OCM por ambos antifolatos (MTX y PMX) media la pérdida de expresión del gen y proteína de CD14. La relevancia fisiológica de estos resultados se incrementa, además, porque MTX y PMX no modifican la expresión de CD14 en macrófagos diferenciados con M-CSF (M-MØ), con perfil de polarización antiinflamatorios^{47,91,94,96,97}. Este dato apoyaría que MTX y PMX exhiban selectividad por macrófagos proinflamatorios^{69,91} y que la especificidad de ambos antifolatos por GM-MØ está estrechamente ligada a su capacidad para inhibir la enzima TS, dado que GM-MØ presentan mayores niveles de expresión de TS que M-MØ. Además, la formación de MTX-Pgl en GM-MØ es mayor (MTX-Pgl₂ y MTX-Pgl₃) que en M-MØ¹⁸⁶, lo que permite sugerir que una mayor poliglutamilación intracelular de PMX en GM-MØ favorecería la selectividad de PMX por este tipo de macrófagos, a falta de confirmar en futuros experimentos.

Identificación de CD14 soluble como un potencial biomarcador de respuesta a metotrexato en pacientes con artritis reumatoide

sCD14 se considera un DAMP implicado en el mantenimiento de la inflamación tisular^{422,431}. En pacientes con sepsis⁴³², infecciones bacterianas^{422,433}, neumonía^{434,435}, enfermedades inflamatorias crónicas como lupus eritematoso⁴²⁷ y COVID-19⁴³⁶ se ha detectado la concentración elevada de sCD14 en el suero, y también en el suero y en el lavado bronqueoalveolar de pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda⁴³⁷. En relación con células mieloides, se ha descrito la sobreproducción de sCD14 por macrófagos derivados de monocitos de pacientes con fibrosis

quística, enfermedad caracterizada por una inflamación persistente ⁴³¹. En el contexto de la AR, algunos estudios evidencian la implicación de sCD14 en la patogénesis de la enfermedad. Los niveles de sCD14 son mayores en el líquido sinovial, suero y plasma de pacientes con AR en comparación con pacientes de osteoartritis y controles sanos ⁴³⁸⁻⁴⁴¹. Además, los niveles de sCD14 en suero de pacientes con AR correlacionan significativamente con los niveles de IL-6 y PCR y junto con los valores DAS28 y PCR, disminuyen en respuesta al tratamiento con iTNF- α (infliximab y etanercept) ⁴⁴². A su vez, se ha sugerido que los niveles de sCD14 en orina de pacientes con AR tienen un valor diagnóstico comparable al de mediciones en suero con un valor más predictivo para la actividad de la enfermedad ⁴⁴³. Sin embargo, apenas existen trabajos que describan el papel de sCD14 en la patogénesis de AR, a excepción de un estudio que describe su implicación como un activador endógeno proinflamatorio en fibroblastos aislados de pacientes con AR (FLS-AR). sCD14 aumenta la proliferación de FLS y la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y mediadores de inflamación (IL-6, IL-8, ICAM-1, IL-1 β , GM-CSF, CXCL10 y TNF- α) vía TLR4 en ausencia de LPS y su efecto se incrementa en presencia de TNF- α e IL-17A, citoquinas que desempeñan un papel clave en la patogénesis de AR.

Tal y como se comentó en la *Introducción* (ver apartado 5.2.2), se han descrito recientemente tres categorías histológicas de acuerdo con el enriquecimiento del tipo celular presente en el sinovio de pacientes con artritis de reciente comienzo. En el patotipo *pauci-inmune* predominan los fibroblastos, en el patotipo *mieloide* o *mieloide-difuso*, células mieloides y, el patotipo *linfo-mieloide*, presenta macrófagos, células B y T. La infiltración persistente y la alta acumulación de células plasmáticas en el sinovio característica del patotipo linfoide se asocia con mayor actividad de la enfermedad y destrucción articular ³¹⁴. En este contexto, el análisis de expresión de CD14 en los tres patotipos (<https://peac.hpc.qmul.ac.uk/>) muestra que su expresión es mayor en el patotipo linfoide que en el patotipo mieloide ($p=3.1e-03$) o fibroide ($p=1.9e-07$) y se correlaciona positivamente con la actividad de la enfermedad (DAS28-VSG: $r=0.37$, $p=0.00072$; y, DAS28-PCR: $r=0.33$, $p=0.0028$) ⁴²⁹. La modulación de la expresión de CD14 por antifolatos apoya la acción antiinflamatoria de MTX en AR y permite sugerir que el tratamiento con MTX en pacientes con AR podría inducir menores niveles de sCD14 y mCD14 en células mieloides y menor respuesta a DAMPs, lo que disminuiría globalmente la inflamación. En línea con esta hipótesis, nuestros resultados muestran cómo la concentración de sCD14 disminuye en el plasma de pacientes con AR de reciente comienzo tras el tratamiento con MTX (15-25 mg/semana) durante 6 meses y correlacionan positivamente con la actividad de la enfermedad medida mediante DAS28 y PCR (cohorte de inicio). Los resultados son especialmente relevantes cuando se validan y amplían en otra cohorte de pacientes (cohorte de validación) formada por pacientes con AR respondedores y no respondedores a MTX, donde los niveles de sCD14 sérico disminuyen tras 6 meses de tratamiento con MTX únicamente en los pacientes respondedores al fármaco y correlacionan positivamente con el DAS28 (**Figura 73**).

Los niveles basales de sCD14 de los pacientes respondedores a MTX resultaron significativamente más altos que los de pacientes no respondedores a MTX y controles sanos y el parámetro Δ sCD14 resultó significativamente mayor en pacientes con AR respondedores a MTX. Estos resultados sugerían estudiar a ambas variables como posibles predictoras de la respuesta clínica a MTX, una herramienta que actualmente no existe pese a ser el fármaco de referencia en AR ⁴⁴⁴. El cálculo de los *odds ratio* (OR) en base a los puntos de corte seleccionados del análisis de curvas ROC y el ajuste de los OR en base a otras variables que modifican la respuesta a MTX (sexo, edad y DAS28) confirmaron que Δ sCD14 y sCD14 basal predicen de forma muy significativa la respuesta a

MTX. En concreto, pacientes con AR con niveles basales séricos de sCD14 superiores a 2460 ng/ml resultan 25.49 veces más probables ser respondedores a MTX y pacientes con un valor de Δ sCD14 superior a 188 ng/ml son 40.35 veces más probables ser respondedores a MTX. Por tanto, aunque son datos preliminares que se deben validar y ampliar en cohortes más grandes, podemos confirmar que la determinación de los niveles séricos de sCD14 podría ser una herramienta útil en la práctica clínica habitual para predecir la respuesta a MTX en pacientes con artritis reumatoide.

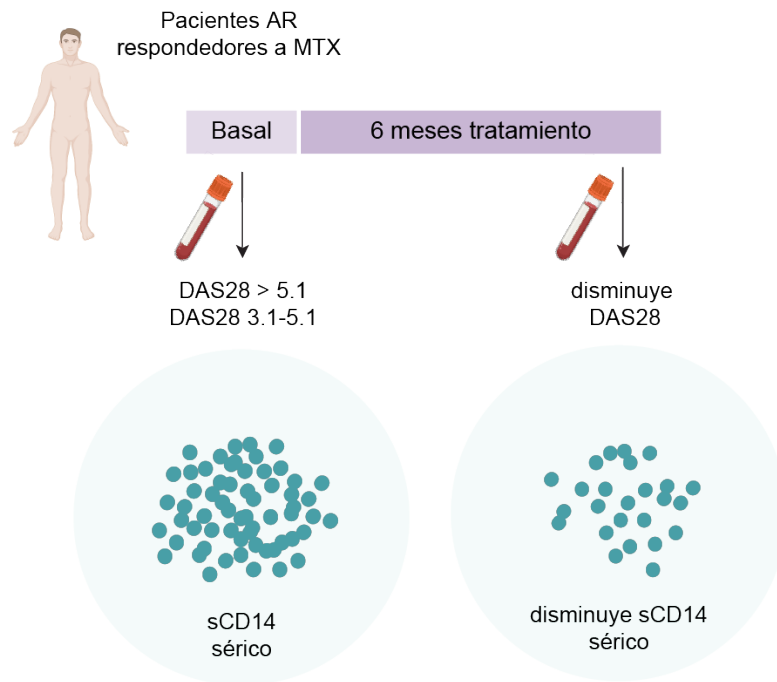


Figura 73. Los niveles de sCD14 sérico disminuyen en pacientes con artritis reumatoide respondedores a la terapia con MTX. Los niveles de actividad de la enfermedad se midieron con el índice DAS28. Todos los pacientes seleccionados en la visita basal presentaron niveles de actividad moderados (DAS28 3.1-5.1) o altos (DAS28 > 5.1). Tras 6 meses de tratamiento con 15-25 mg a la semana de MTX en monoterapia los niveles de CD14 soluble (sCD14) disminuyen en el suero de pacientes con artritis reumatoide respondedores a la terapia con MTX y correlacionan positivamente con el DAS28. Los criterios de respuesta clínica a MTX tras seis meses del tratamiento se describen en la **Tabla 2**.

Según las recomendaciones EULAR 2010 para el tratamiento de pacientes con AR²⁴¹, todos los pacientes deben ser tratados con MTX tan pronto como se establezca el diagnóstico clínico de la enfermedad y la probabilidad de obtener una respuesta favorable al fármaco y una menor progresión de la enfermedad es mayor cuanto menor sea el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta el inicio del tratamiento^{241,445}. En este sentido, considerando la importancia de la *ventana de oportunidad* para lograr una remisión temprana de la enfermedad, podría ser de interés seleccionar a los pacientes con mayores OR de sCD14 como pacientes respondedores a MTX. Antes de iniciar la terapia con MTX, niveles basales bajos de sCD14 (ng/ml) podrían identificar a pacientes no respondedores al fármaco en los que se emplearía como estrategia terapéutica un FAMEs con un mecanismo de acción diferente al MTX, evitando así el sobretratamiento innecesario. Además, dado que existe una superposición suficiente de los niveles basales de sCD14 entre pacientes respondedores y no a MTX, también podría ser útil medir la variación de los niveles de sCD14 a lo largo del seguimiento de la enfermedad para los casos en los que disminuya la respuesta y en casos dudosos de desarrollo de resistencia al fármaco.

En referencia a la respuesta clínica al fármaco, se han intentado definir marcadores clínicos y de laboratorio que sean útiles en predecir la respuesta a MTX en pacientes con AR pero hasta la

fecha no se ha validado ningún factor o biomarcador predictivo. Algunas variables como HAQ, BMI o NAD altos, bajos niveles de folato en eritrocitos, SNPs en los genes *ABCB1* y *ABCC3*, valores de FR negativo, tabaco, e incluso la ausencia del consumo de alcohol, se han asociado con una peor respuesta al fármaco^{446,447}. Aun así, los marcadores identificados no se reproducen entre estudios y algunos resultados resultan contradictorios como es el caso de la asociación entre una peor respuesta a MTX y altos niveles de DAS28^{446,447} o bajos niveles de DAS28⁴⁴⁸. Recientemente se ha identificado una disminución del ácido úrico en los pacientes con AR que responden al MTX⁴⁰⁹ y algunos grupos han intentado definir metabolitos o determinadas enzimas metabólicas implicados en la respuesta clínica a MTX. Un estudio reciente propone a la homocistina, la enzima glicerol-3-fosfatasa y los ácidos 1,3-/2,3-difosfoglicéricos como marcadores predictivos de una respuesta insuficiente a MTX, aunque estos datos son preliminares y no se han validado en cohortes externas⁴⁰⁹. En cuanto a células T, *Peres* y colaboradores⁴⁴⁹ han demostrado que la disminución de la expresión de CD39 en células Treg podría considerarse un biomarcador de resistencia a MTX en AR mientras que el trabajo de *Gupta* y colaboradores⁴⁵⁰ han identificado la frecuencia de linfocitos Treg CD39⁺ como biomarcador de la respuesta al tratamiento con MTX en AR tras 4 meses de terapia. Además de presentar diferentes criterios para la definición de la respuesta clínica a MTX y un tiempo variable después del tratamiento con el fármaco, todos estos estudios mencionados han sido por lo general pequeños, lo que ha supuesto la obtención de una variedad de resultados diferentes y, a veces, contradictorios. Aunque nuestro estudio clínico también presenta un pequeño tamaño muestral y requiere ampliar el número de pacientes de la cohorte de validación, proporciona el mecanismo molecular que respalda la modulación de sCD14 por antifolatos. Así, la relevancia de los resultados del *Capítulo II* muestran la implicación de CD14 en la respuesta a MTX, no solo como un nuevo mecanismo de su acción antiinflamatoria de MTX en la AR, sino también como una herramienta clínica eficaz para predecir o evaluar la respuesta a MTX en pacientes con AR.

PMX como antifolato con efecto antiinflamatorio

El propósito final de este estudio era ampliar el conocimiento sobre la implicación del OCM en la memoria inmune innata y comparar el efecto de la acción reprogramadora de macrófagos de los antifolatos MTX y PMX. Con analogía al MTX, el PMX también actúa selectivamente en macrófagos diferenciados con GM-CSF que expresan la TS (GM-MØ TS⁺), similares a los que se encuentran en la cavidad sinovial de la AR¹⁹¹, mientras que no tiene efecto en macrófagos diferenciados con M-CSF (M-MØ). Además, el PMX es capaz de aumentar la expresión de algunos genes regulados por MTX, como *CCL2*, *LIF*, *MET* y *GDF15*, relacionados con la respuesta inflamatoria y la enfermedad reumática en este tipo de macrófagos¹⁹¹. Dado que los resultados del *Capítulo II* indican que ambos antifolatos son capaces de inducir *inmunidad entrenada* nos permiten hipotetizar que el PMX podría ser estudiado como potencial terapia alternativa en AR.

El PMX es un fármaco quimioterapéutico empleado para el tratamiento de carcinomas de pulmón considerado como uno de los antifolatos clásicos. En la actualidad, todos los estudios del PMX en desarrollo abordan el ámbito de quimioterapia, específicamente abordan el uso del fármaco en mesotelioma, linfoma nervioso central y NSCLC^{451,452}. En este sentido este trabajo también proporciona evidencias que pueden extrapolarse al potencial del efecto del PMX en el contexto del estroma tumoral y de macrófagos residentes de tumor (TAMs). Sin embargo, el PMX no está aprobado para el tratamiento de la AR y hasta el momento no existen ensayos clínicos evaluando esta posibilidad ni informes clínicos sobre la evolución de pacientes con AR en quimioterapia con PMX.

El MTX constituye el FAME de primera elección en el tratamiento de la AR y las recomendaciones EULAR para el manejo de la enfermedad (**Figura 15**) indican “*Si el objetivo del tratamiento no se logra con la primera estrategia de FAMEsc (MTX o leflunomida/sulfasalazina para pacientes con una contraindicación para MTX), en ausencia de factores de mal pronóstico, se deben considerar otros FAMEsc*” y “*Si el objetivo del tratamiento no se logra con la primera estrategia de FAMEsc, cuando están presentes factores de mal pronóstico, se debe considerar la adición de un FAMEb o un FAMEs dirigido*”²³⁷. Teniendo en cuenta las recomendaciones EULAR, el hecho de que ambos antifolatos modifiquen de forma similar el fenotipo de macrófagos y que la administración de PMX sea vía intravenosa, especulamos que la posibilidad de testar el PMX como fármaco en el tratamiento de AR es muy reducida. No obstante, tal y como se muestra en la **Figura 24** (ver *Introducción*, apartado 4.4.), el PMX presenta una serie de parámetros cinéticos que suponen una ventaja farmacológica frente al MTX entre los que se incluyen una mayor afinidad por los transportadores que median la internalización de antifolatos que el MTX (RFC y PCFT) y una mayor cinética de poliglutamilación. Esto implica que una retención y semivida intracelular de más larga de PMX-Pgl lo que supone una acción del fármaco prolongada y mayor tiempo de inhibición de sus enzimas diana^{268,278}. Además, el PMX presenta mayor capacidad inhibitoria de la TS resultando ésta su principal diana^{194,268}, y este dato tiene especial relevancia al demostrar la implicación de TS en la disminución de CD14 por PMX y en su efecto antiinflamatorio global en GM-MØ en respuesta al ligando de TLR4 LPS.

Uno de los primeros estudios del uso de PMX en enfermedades inflamatorias crónicas se da en un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratas²³⁸, donde la inyección de colágeno tipo II produce el desarrollo de una artritis poliarticular severa que se asemeja a la artritis reumatoide en humano⁴⁵³. En este modelo se evidencia el potencial terapéutico del PMX como fármaco antiartrítico, ya que el tratamiento con PMX reduce los niveles de TNF- α e IL-17 en suero y la infiltración articular de células inflamatorias. Otro estudio en pacientes de AR ha descrito como el PMX es capaz de disminuir la producción de TNF- α de linfocitos T⁴⁵⁴. Estos estudios indican una acción antiinflamatoria del PMX *ex vivo* e *in vivo* pero su efectividad no se ha estudiado en células del sistema inmunitario innato. Este trabajo supone, a nuestro conocimiento, el primer estudio que evidencia que el PMX ejerce un gran efecto de reprogramación de macrófagos humanos, lo que abre una nueva vía de estudio y sugiere ampliar la investigación de este fármaco más allá del límite de su utilidad clínica actual.

GM-CSF como un fuerte conductor de la polarización de macrófagos hacia un perfil proinflamatorio en artritis indiferenciada persistente y en evolución

En la valoración clínica de la artritis indiferenciada (AI) resulta clave la determinación del pronóstico del paciente, si la artritis remitirá, se mantendrá con una actividad limitada o si evolucionará a una artritis definida y erosiva como la artritis reumatoide (AR) o artritis psoriásica (APs), para poder implantar un tratamiento eficaz. La identificación de pacientes que progresan o evolucionan a AR (AI-AR) o a APs (AI-APs) resulta fundamental para desarrollar una estrategia terapéutica temprana, prevenir el sobretratamiento innecesario e incluso modificar el curso de la enfermedad y frenar la progresión a la fase definida⁴⁵⁵. Sin embargo, se carece de biomarcadores validados de diagnóstico y clasificación temprana de AI y el diagnóstico diferencial entre AR y APs en las etapas iniciales de la AI resulta complejo debido a la falta de criterios específicos de clasificación. En este sentido, la búsqueda de biomarcadores que permitan una clasificación temprana de pacientes de AI ha aumentado recientemente el interés en el estudio del tejido sinovial inflamado o sinovitis como

diana principal de las enfermedades articulares inflamatorias³⁰⁷. Los macrófagos contribuyen a la sinovitis y a la destrucción de la articulación mediante la producción de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación que, además de su acción directa, inducen la síntesis de otros mediadores solubles que amplifican la señal^{46,313}. Dado que el estado de polarización de macrófagos es estímulo-dependiente, y que en el contexto de sinovitis se detectan tanto citoquinas proinflamatorias (TNF- α) como antiinflamatorias (IL-10)^{41,315} la identificación de marcadores moleculares que identifiquen las funciones efectoras de los macrófagos sinoviales durante las diferentes fases de evolución de la artritis resulta relevante para el desarrollo potencial de terapias inmunomoduladoras y antiinflamatorias. Los resultados del *Capítulo III* de la tesis suponen el primer estudio que analiza la expresión de la citoquina GM-CSF y su fuente celular de producción, así como la densidad y estado de polarización de macrófagos en la sinovitis de las enfermedades inmunes articulares más prevalentes, AR y APs, y sus fases indiferenciadas.

A diferencia de la membrana sinovial sana, nuestros resultados muestran la expresión generalizada de GM-CSF en la membrana sinovial de artritis indiferenciada en evolución (AI-AR y AI-APs) y artritis establecida (AI, AR y APs). Al contrario que M-CSF, los niveles de GM-CSF en la circulación sistémica son indetectables en condiciones homeostáticas pero se inducen en condiciones de inflamación y daño artrítico^{83,456}. Tal y como se comentó en la *Introducción* (ver apartado 1.5.1.), existen multitud de estudios que evidencian el papel de GM-CSF como mediador de inflamación tisular^{50,83,107} y que sugieren su implicación en el inicio y desarrollo de la artritis^{75,109,110}. La señalización de GM-CSF a través de su receptor GM-CSFR (CD116), sobreexpresado en macrófagos CD68 y CD163 del sinovio de pacientes con AR y APs¹¹⁰, desencadena la activación de vías la señalización que involucran JAK2/STAT5, NF κ B, ERK y PI3K-Akt y la producción de mediadores inflamatorios que activan a fibroblastos (FLS) y macrófagos, la diferenciación de células T efectoras e inducen angiogénesis^{72,73}. FLS, macrófagos y células adyacentes producen, a su vez, GM-CSF y otras citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-23 o TNF- α constituyendo una red de comunicación y retroalimentación positiva entre inmunidad innata y adaptativa. Esta coregulación celular interdependiente en la que GM-CSF estimula aún más la producción de GM-CSF de manera autocrina y paracrina explicaría la implicación de GM-CSF el desarrollo de la inflamación crónica y autoinmunidad^{72,83,456,457}.

CD90 (Thy-1) es una proteína con anclaje GPI que se expresa en células endoteliales activadas, fibroblastos y un subgrupo de células madre CD34⁺ periféricas⁴⁵⁸. Los fibroblastos del tejido sinovial CD90⁺ se considera el subgrupo de fibroblastos patogénicos implicados en la destrucción ósea y en el reclutamiento del resto de células inmunes al sinovio. Se ha descrito que la proporción de fibroblastos CD90⁺ es mayor en la membrana sinovial de pacientes con AR que en pacientes con osteoartritis (OA)⁴⁵⁹. Nuestros resultados apoyan el fenotipo patogénico de los fibroblastos CD90⁺ FAP⁺ GM-CSF⁺ en la membrana sinovial tanto de AI persistente como de sus formas en evolución y artritis establecidas. Aunque publicaciones recientes han demostrado la expresión de GM-CSF por linfocitos Th1, Th17 y exTh17 de tejido sinovial de APs mediante citometría de flujo y el número de linfocitos de cada subgrupo correlaciona con el grado de actividad de la enfermedad medida con el índice DAPSA (*Disease Activity Psoriatic Arthritis*)⁴⁶⁰, no hemos podido confirmar la expresión de GM-CSF por células CD3⁺ o CD4⁺ en las muestras de membrana sinovial de APs ni de ningún otro grupo experimental. También se determinó la expresión de GM-CSF en muestras pareadas de líquido sinovial (LS) de todos los grupos de artritis, solo detectamos GM-CSF en el LS de una muestra de AI-APs y de cuatro pacientes de AI persistente. El grupo experimental de AI persistente estaba compuesto por pacientes en tratamiento con FAMEsc (AI FAMEsc, n=7) y

pacientes que no habían empezado tratamiento en el momento de la artroscopia (AI *naïve*, n=9) (Tabla 16). En las muestras de LS de AI donde se detectó la expresión de GM-CSF se correspondían con pacientes AI *naïve*, lo que explicaría y apoyaría la expresión de GM-CSF en el contexto de inflamación^{72,73,456}.

Al contrario que la expresión de GM-CSF, se detectó expresión de activina A en LS de todos los grupos experimentales de artritis. La activina A contribuye a la polarización de macrófagos proinflamatorios por GM-CSF (GM-MØ) y limita la adquisición de un fenotipo antiinflamatorio inducido por M-CSF^{90,91}. En el contexto de la AR, los niveles de activina A son mayores en el líquido y membrana sinovial de pacientes con AR activa que en controles sanos^{99,461,462} y contribuye a la polarización de macrófagos del líquido sinovial⁹⁹. La activina A se encuentra elevada en fases iniciales de otras enfermedades inflamatorias y exhibe un efecto dual en inflamación en función de su concentración y del contexto celular⁴⁶³. Como otros miembros de la familia del TGF-β, muestra funciones proinflamatorias o antiinflamatorias en función de su concentración^{93,463,464}. En el contexto de nuestro estudio, la concentración de activina A entre pacientes del mismo grupo experimental resultó variable (rango entre 0.2-72 ng/ml) pero todos los niveles se encuentran en su actividad proinflamatoria⁴⁶³. La comparativa entre los diferentes grupos experimentales reveló una mayor concentración de activina A en LS de AI-AR significativamente mayor que en AI persistente. Este resultado, a falta de confirmar en cohortes de pacientes más amplias, nos permite especular que un aumento de la concentración de activina A en LS podría ser un marcador de transición de fase indiferenciada a fase establecida de AR.

Los marcadores proinflamatorios activina A, MMP12 y TNF-α se detectaron en todas las muestras analizadas de artritis en comparación con el tejido sinovial sano, lo que apoya, nuevamente, la influencia de GM-CSF en el contexto de inflamación. De esta forma, los resultados del *Capítulo III* confirman los resultados descritos de nuestro grupo en membrana y líquido sinovial de AR⁹⁹ y se extienden a la sinovitis de APs y sus respectivas fases indiferenciadas (AI-AR y AI-APs) junto con AI persistente y sugiere que el perfil de polarización de macrófagos en la membrana sinovial de todas las fases de artritis del estudio es predominantemente proinflamatorio. Los macrófagos son la fuente principal de MMP12³¹¹ que contribuye significativamente a la destrucción articular a partir de la degradación de fibronectina y proteoglicanos de la matriz extracelular y cartílago y de la activación de otras metaloproteinasas como MMP2 y MMP3. El resultado más relevante en relación con la expresión de MMP12 es que los macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de pacientes con artritis indiferenciada en evolución (AI-AR y AI-APs) presentan menores niveles de expresión de MMP12 que macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de pacientes con AI persistente. A falta de confirmar en cohortes de pacientes más grandes, el resultado permite especular que una disminución en la expresión de MMP12 en macrófagos CD163⁺ del *sublining* de la membrana sinovial podría emplearse como un marcador distintivo de transición entre la artritis indiferenciada y establecida (AR y APs).

La AR y APs son enfermedades inflamatorias crónicas cuya patogénesis difiere debido a la diferente implicación de los sistemas inmunitarios innato y adaptativo en cada una ellas, y que se ilustra por los diferentes fármacos biológicos empleados en su tratamiento. Así, mientras que ustekinumab, inhibidor del eje IL-17/IL-23, se emplea en APs y no en AR³⁴⁷, fármacos anti-CD20 como rituximab o anti-IL-6R como sarilumab o tocilizumab son eficientes en AR pero no en APs³⁴⁷. La justificación preclínica para emplear a GM-CSF como diana terapéutica en condiciones de inflamación y autoinmunidad es sólida y un gran número de ensayos clínicos que evalúan el efecto

del bloqueo de GM-CSF o su receptor, GM-CSFR, han mostrado respuestas clínicas favorables sin condicionantes de seguridad ⁴⁶⁵. En este contexto, nuestros resultados confirman y apoyan la idea de que GM-CSF funciona como un fuerte conductor de la polarización de macrófagos proinflamatorios e inmunoestimuladores ^{84,91,402} en artritis en diferentes fases de evolución y artritis establecidas, lo que sugiere y plantea a GM-CSF como una potencial diana terapéutica no solo en AR ¹²⁰, sino también en APs, sus fases indiferenciadas y AI persistente. Respecto al receptor de GM-CSF, mavrilimumab, un anticuerpo IgG4 dirigido contra GM-CSFR- α , muestra eficiencia clínica sobre el daño articular en AR. Recientemente se ha descrito su eficacia en pacientes de COVID-19 severo y actualmente están en desarrollo nuevos ensayos clínicos para su evaluación (NCT04399980 y NCT04397497) ⁴⁶⁵. En este sentido, acorde a nuestros resultados, también podría evaluarse el efecto clínico de este anti-GM-CSFR en pacientes con AI y con APs.

Dos poblaciones de macrófagos CD209 se expresan en artritis indiferenciada, artritis reumatoide y artritis psoriásica

CD209 (DC-SIGN) es una lectina de tipo C transmembrana que se expresa en células mieloides. DC-SIGN se expresa en DCs mieloides *in vivo* ⁴⁶⁶, DCs derivadas de monocitos ⁴⁶⁷ y macrófagos polarizados con IL-4 *in vitro* ⁴⁶⁸. La citoquina M-CSF induce la diferenciación de macrófagos CD209⁺ *in vitro* con un perfil antiinflamatorio e inmunosupresor que producen altos niveles de IL-10 en respuesta a PAMPS ¹⁰⁴. La expresión de CD209 también se induce por IL-4 e IL-13 y se inhibe por estímulos proinflamatorios como TNF- α o LPS ⁴⁶⁸. M-CSF induce la expresión de CD209 en macrófagos residentes de tejido ^{415,468} que resultan indispensables en la homeostasis y el desarrollo del tejido, así como en la resolución de la inflamación, mantenimiento y reparación tras el daño tisular ³⁸. CD209 reconoce y une carbohidratos de tipo manosa de bacterias y hongos. La unión del ligando con su receptor activa la fagocitosis en macrófagos y potencia la producción de IL-10 ¹⁰⁴. Los resultados del *Capítulo III* muestran la expresión de CD209 tanto en macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de artritis establecida (AI, AR, APs) o en evolución (AI-AR, AI-APs) como en macrófagos de membrana sinovial sana y sugieren la presencia de macrófagos antiinflamatorios e inmunoreguladores en condiciones fisiológicas y en inflamación.

Aun así, en tejidos inflamados los macrófagos también pueden presentar una gran heterogeneidad de perfiles de polarización cuya adquisición depende de las señales del microambiente tisular. En el contexto de la artritis, estudios recientes empleando tecnología *single cell* han descrito nuevos biomarcadores que discriminan entre macrófagos proinflamatorios y macrófagos con un perfil antiinflamatorio y reparativo ^{324,325,469,470}. *Alivernini* y colaboradores ³²⁴, han demostrado que no todos los macrófagos del tejido sinovial de AR son inflamatorios (MerTK) y que el subgrupo que expresa MerTK (MerTK⁺), expresados mayoritariamente en tejido sinovial sano, están implicados en la remisión de AR. Otro artículo que estudia poblaciones celulares en ratón describe la acción antiinflamatoria y reparadora de macrófagos CX₃CR1⁺TREM⁺, que provienen de la proliferación de macrófagos residentes CX₃CR1⁻, y su implicación en la remisión de AR ³²⁴. En este sentido, la existencia de dos subgrupos de macrófagos en base a la expresión de CD209 (CD163⁺ CD209^{high} y CD163⁺ CD209^{low}) que expresan marcadores proinflamatorios (activina A, MMP12 y TNF- α) permite hipotetizar que la población CD163⁺ CD209^{high} quizás se corresponda con macrófagos en proceso de repolarización hacia un perfil antiinflamatorio y reparativo. Además, forma similar a la población de macrófagos residentes CX₃CR1⁻ o MerTK⁺, expresados en tejido sinovial sano e implicados en la remisión de AR, macrófagos CD163⁺ CD209^{high} expresados preferencialmente en APs podrían estar implicados en la remisión de la enfermedad. Todos estos datos abren una nueva vía de

estudio para profundizar en la que sería interesante evaluar la expresión de marcadores como CX₃CR1⁺ y MerTK⁺ con el objetivo de determinar las funciones efectoras de los macrófagos sinoviales durante las diferentes fases de evolución de la artritis.

El aumento de la densidad de macrófagos como posible indicador de transición de artritis indiferenciada a artritis establecidas

De manera generalizada, el número de macrófagos aumenta al inicio de la sinovitis. Por ejemplo, la AR y APs cursan de forma similar respecto a la infiltración masiva de macrófagos en la membrana sinovial^{339,340,378} que se asocia con el daño y la destrucción articular^{316,317,349}. El número de macrófagos del *sublining* se considera un potencial biomarcador de la respuesta al tratamiento. En APs, el tratamiento efectivo con anti-TNF^{351,352,471} o anti-CTLA-4⁴⁷² reduce el número de macrófagos del tejido sinovial y, en pacientes con AR, el número de macrófagos del *sublining* difiere entre tratamiento efectivo o no³²¹, disminuyendo en respuesta al tratamiento con anti-TNF³²² y con corticoides intraarticulares³²³. Nuestros datos muestran que la densidad de macrófagos CD163⁺ es significativamente mayor en el tejido sinovial de AI en evolución (AI-AR y AI-APs) que en AI persistente. Este resultado concuerda con que una mayor proporción de pacientes del grupo AI (7 de n=16, 44%) recibían terapia con FAMEsc en comparación con pacientes del grupo AI-AR (2 de n=8, 25%), pero resultó inesperado en el contexto de APs, donde la proporción de pacientes de AI-APs en tratamiento con FAMEsc fue significativamente mayor a la de pacientes de APs (**Tabla 16**). Aun así, el 56% de los pacientes AI no habían empezado tratamiento con FAMEsc en el momento de obtención de la biopsia sinovial (*AI naïve*) y, a nivel global, AI presenta menor densidad de macrófagos CD163⁺ que AI-AR y AI-APs y sus formas establecidas, AR y APs. Por lo que, aunque el tratamiento con FAMEsc puede interferir en los resultados debido a los efectos inmunomoduladores de los fármacos, este factor se puede comparar de forma global en todos los grupos experimentales. Los resultados indican una menor densidad de macrófagos CD163⁺ en pacientes con AI persistente que en las fases en evolución, AI-AR y AI-APs, o AR y APs establecidas. De forma cautelosa, y acorde a resultados recientes de Cuervo A. y colaboradores²⁸⁸, nuestros datos permiten sugerir que un aumento de la densidad de macrófagos CD163⁺ en el *sublining* de la membrana sinovial podría emplearse como indicador de artritis indiferenciada que evoluciona a fases establecidas de AR y APs. Por último, aunque algunos autores han correlacionado indicadores de la actividad de la enfermedad como PCR, VSG y NAT con el número de macrófagos CD163⁺ en la membrana sinovial de AR^{319,320} y APs³⁵⁰, nuestros datos, posiblemente debido al pequeño tamaño de la cohorte, no mostraron correlación significativa entre la densidad de macrófagos CD163⁺ y actividad de la enfermedad medida con el DAS28 en los grupos experimentales del estudio (**Tabla 18**).

| CD163 ⁺ - DAS28 | AI (n=16) | AI-AR (n=9) | AR (n=12) | AI-APs (n=9) | APs (n=10) |
|-----------------------------------|--------------|----------------|--------------|-----------------|---------------|
| coeficiente de correlación | 0.085 | 0.143 | 0.046 | 0.310 | 0.167 |
| p-valor | 0.753 | 0.736 | 0.887 | 0.417 | 0.668 |

Tabla 18. Correlación entre la densidad de macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de artritis en diferentes fases de evolución y artritis establecida y la actividad de la enfermedad. El grado de actividad de la enfermedad se midió mediante el índice DAS28 (*Disease Activity Score 28*) (no significativo, test de *Spearman*).

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones que incluyen el diseño retrospectivo y el tamaño muestral. La cohorte de pacientes AI se recluta desde el año 2000 lo que explica que los

criterios ACR empleados para la clasificación de AR se corresponden con los de 1987²⁸¹ y los resultados de este estudio no pueden aplicarse a los criterios ACR2010²⁴¹. Aun así, la relevancia clínica y la potencia de este estudio se refiere fundamentalmente al seguimiento y evolución de los pacientes con AI hasta que son clasificados en AR o APs o se mantienen en AI persistente.

De forma global, nuestros datos han puesto de manifiesto la importancia de la expresión generalizada de GM-CSF en fases de artritis en evolución (AI-AR y AI-APs) y establecidas (AI, AR y APs) y sugieren el papel de GM-CSF desde el inicio de la sinovitis articular en la artritis. Asimismo, constatan la relevancia del perfil proinflamatorio y de la densidad de macrófagos en la etiopatogenia de AR, APs, AI y sus fases indiferenciadas. En base al objetivo de identificar posibles biomarcadores de diagnóstico y clasificación temprana de AI, hemos identificado que la densidad de macrófagos y la expresión de MMP12 en membrana sinovial difieren entre pacientes con AI persistente y sus fases en evolución (AI-AR y AI-APs), lo que sugiere que ambos marcadores podrían emplearse como indicadores de transición entre AI y fases establecidas de AR y AP. Además, el líquido sinovial de pacientes con AI-AR presenta mayor expresión de activina A que el de pacientes con AI persistente, sugiriendo el papel de la activina A como biomarcador de transición entre AI y AR.

C O N C L U S I O N E S

1. Metotrexato (MTX) *in vivo* induce la adquisición de un estado de tolerancia cruzada a LPS en leucocitos y monocitos 5 días después de su administración a sujetos sanos.
2. MTX *in vivo* promueve la adquisición de un perfil transcripcional menos proinflamatorio y más profibrótico y reparador en monocitos 5 días después de su administración a sujetos sanos.
3. Pemetrexed (PMX) promueve la adquisición de un perfil transcripcional proinflamatorio y una firma génica dependiente de p53 en macrófagos polarizados por GM-CSF (GM-MØ).
4. PMX induce un estado de tolerancia transcripcional y funcional a LPS en GM-MØ.
5. El bloqueo del metabolismo de un carbono (OCM) por los antifolatos MTX y PMX induce un estado de tolerancia en GM-MØ mediado por CD14.
6. La concentración de CD14 soluble (sCD14) en suero disminuye significativamente en pacientes con artritis reumatoide (AR) respondedores a MTX tras 6 meses de tratamiento y correlaciona con el índice DAS28 (*Disease Activity Score 28*), mientras que no cambia en pacientes con AR no respondedores a MTX.
7. La concentración basal de sCD14 en suero es significativamente mayor en pacientes con AR respondedores a MTX que en pacientes no respondedores a MTX y controles sanos.
8. Δ sCD14 es significativamente mayor en pacientes con AR respondedores a MTX que en no respondedores a MTX.
9. GM-CSF se expresa en células endoteliales CD90⁺, fibroblastos CD90⁺ FAP⁺ y macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de artritis establecidas (artritis indiferenciada persistente, AI; artritis reumatoide, AR; y, artritis psoriásica, APs) y artritis en diferentes fases de evolución (artritis indiferenciada con evolución a artritis reumatoide, AI-AR; y, artritis indiferenciada con evolución a artritis psoriásica, AI-APs).
10. Macrófagos CD163⁺ de la membrana sinovial de artritis en evolución y establecida presentan una predominancia de expresión de marcadores proinflamatorios asociados a la polarización de macrófagos por GM-CSF (activina A, MMP12 y TNF- α), lo que indica la existencia de macrófagos proinflamatorios desde fases tempranas de AI.
11. Dos poblaciones de macrófagos (CD163⁺ CD209^{high} y CD163⁺ CD209^{low}) se detectan tanto en artritis en evolución y establecida como en tejido sinovial sano.
12. La membrana sinovial de artritis indiferenciada en evolución (AI-AR y AI-APs) presenta mayor densidad de macrófagos CD163⁺ y menor expresión de MMP12 que la membrana sinovial de AI persistente; y, el líquido sinovial de pacientes con AI-AR presenta mayor concentración de activina A que el líquido sinovial de pacientes con AI persistente.
13. AI, AR, APs y sus fases indiferenciadas muestran una predominancia de un patotipo sinovial linfo-mieloide y mieloide-difuso.

B I B L I O G R A F Í A

1. **van Furth, R. et al.** The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ.* (1972). PMID: 4538544
2. **Hume, D. A. et al.** The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol.* (2002). PMID:12377929
3. **Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W.** Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* (2013). doi:10.1038/nature12034
4. **Hume, D. A., Irvine, K. M. & Pridans, C.** The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. *Trends Immunol.* (2019). doi:10.1016/j.it.2018.11.007
5. **Hoeffel, G. & Ginhoux, F.** Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell Immunol.* (2018). doi:10.1016/j.cellimm.2018.01.001
6. **Ginhoux, F. & Guilliams, M.** Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity* (2016). doi:10.1016/j.immuni.2016.02.024
7. **Hoeffel, G. et al.** C-Myb+ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity* (2015). doi:10.1016/j.immuni.2015.03.011
8. **Bain, C. C. et al.** Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice. *Nat Immunol.* (2014). doi:10.1038/ni.2967
9. **Kierdorf, K. & Prinz, M.** Microglia: Same same, but different. *J Exp Med.* (2019). doi:10.1084/jem.20191535
10. **Thion, M. S., Ginhoux, F. & Garel, S.** Microglia and early brain development: An intimate journey. *Science* (2018). doi:10.1126/science.aat0474
11. **Li, Q. & Barres, B. A.** Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* (2018). doi: 10.1038/nri.2017.125
12. **Greter, M. et al.** Stroma-Derived Interleukin-34 Controls the Development and Maintenance of Langerhans Cells and the Maintenance of Microglia. *Immunity* (2012). 10.1016/j.immuni.2012.11.001
13. **Tan, S. Y. S. & Krasnow, M. A.** Developmental origin of lung macrophage diversity. *Dev.* (2016). doi:10.1242/dev.129122
14. **Rosales, C. & Uribe-Querol, E.** Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Res Int.* (2017). doi:10.3389/fimmu.2020.01066
15. **Flannagan, R. S., Jaumouillé, V. & Grinstein, S.** The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol.* (2012). doi:10.1146/annurev-pathol-011811-132445
16. **Lawrence, T. & Natoli, G.** Transcriptional regulation of macrophage polarization: Enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol.* (2011). doi:10.1038/nri3088
17. **Biswas, S. K. & Mantovani, A.** Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metabolism* (2012). doi:10.1016/j.cmet.2011.11.013
18. **Sreejit, G., Fleetwood, A. J., Murphy, A. J. & Nagareddy, P. R.** Origins and diversity of macrophages in health and disease. *Clin Transl Immunology* (2020). doi:10.1002/cti2.1222
19. **Mantovani, A. et al.** The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* (2004). doi:10.1016/j.it.2004.09.015
20. **Curfs, J. H. A. J., Meis, J. F. G. M. & Hoogkamp-Korstanje, J. A. A.** A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev.* (1997). doi:10.1016/j.it.2004.09.015
21. **Kany, S., Vollrath, J. T. & Relja, B.** Cytokines in inflammatory disease. *Int J Mol Sci.* (2019). doi:10.3390/ijms20236008
22. **Shapouri-Moghaddam, A. et al.** Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* (2018). doi:10.1002/jcp.26429
23. **Muntjewerff, E. M., Meesters, L. D. & van den Bogaart, G.** Antigen Cross-Presentation by Macrophages. *Front Immunol.* (2020). doi:10.3389/fimmu.2020.01276
24. **Hume, D. A.** Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth. *J Immunol.* (2008). doi:10.4049/jimmunol.181.9.5829
25. **Locati, M., Curtale, G. & Mantovani, A.** Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol.* (2020). doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718
26. **Liao, X. et al.** Distinct roles of resident and nonresident macrophages in nonischemic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2018). doi: 10.1073/pnas.1720065115
27. **Misharin, A. V. et al.** Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med.* (2017). doi:10.1084/jem.20162152
28. **Sager, H. B. et al.** Proliferation and recruitment contribute to myocardial macrophage expansion in chronic heart failure. *Circ Res.* (2016). doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309001

29. **Lavin, Y., Mortha, A., Rahman, A. & Merad, M.** Regulation of macrophage development and function in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol.* (2015). doi:10.1038/nri3920
30. **De Sousa, J. R., Vasconcelos, P. F. D. C. & Quresma, J. A. S.** Functional aspects, phenotypic heterogeneity, and tissue immune response of macrophages in infectious diseases. *Infect Drug Resist.* (2019). doi:10.2147/IDR.S208576
31. **Deckers, J., Hammad, H. & Hoste, E.** Langerhans cells: Sensing the environment in health and disease. *Front Immunol.* (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.00093
32. **Subramanian, V. & Ferrante, A. W.** Obesity, inflammation, and macrophages. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.* (2009). doi:10.1159/000209979
33. **Kawai, T. & Akira, S.** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat Immunol.* (2010). doi:10.1038/ni.1863
34. **Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I. & Kagan, J. C.** Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. *Annu Rev Immunol.* (2015). doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112240
35. **Murray, P. J. et al.** Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* (2014). doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
36. **Mosser, D. M. & Edwards, J. P.** Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* (2008). doi:10.1038/nri2448
37. **Ruytinx, P., Proost, P., Van Damme, J. & Struyf, S.** Chemokine-induced macrophage polarization in inflammatory conditions. *Front Immunol.* (2018). doi:10.3389/fimmu.2018.01930
38. **Kim, S. Y. & Nair, M. G.** Macrophages in wound healing: activation and plasticity. *Immunol Cell Biol* (2019). doi:10.1111/imcb.12236
39. **Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B. & Ley, K.** Macrophage polarization: Different gene signatures in M1(Lps+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively activated macrophages. *Front Immunol.* (2019). doi:10.3389/fimmu.2019.01084
40. **Watanabe, S., Alexander, M., Misharin, A. V. & Budinger, G. R. S.** The role of macrophages in the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* (2019). doi:10.1172/JCI124615
41. **Yang, X., Chang, Y. & Wei, W.** Emerging role of targeting macrophages in rheumatoid arthritis: Focus on polarization, metabolism and apoptosis. *Cell Prolif.* (2020). doi:10.1159/000056357
42. **Cendrowicz, E., Sas, Z., Bremer, E. & Rygiel, T. P.** The role of macrophages in cancer development and therapy. *Cancers (Basel)* (2021). doi:10.1111/cpr.12854
43. **Gratchev, A., Schledzewski, K., Guillot, P. & Goerdt, S.** Alternatively activated antigen-presenting cells: Molecular repertoire, immune regulation, and healing. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* (2001). doi:10.1038/nri978
44. **Gordon, S. & Martinez, F. O.** Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity* (2010). doi: 10.1016/j.immuni.2010.05.007
45. **Yunna, C., Mengru, H., Lei, W. & Weidong, C.** Macrophage M1/M2 polarization. *Eur J Pharmacol.* (2020). doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090
46. **Ross, E. A., Devitt, A. & Johnson, J. R.** Macrophages: The Good, the Bad, and the Gluttony. *Front Immunol.* (2021). doi:10.3389/fimmu.2021.708186
47. **Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A. & Cook, A. D.** 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.* (2007). doi:10.4049/jimmunol.178.8.5245
48. **Verreck, F. A. W. et al.** Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004). doi: 10.1073/pnas.0400983101
49. **Burgess, A. W. & Metcalf, D.** The nature and action of granulocyte - macrophage colony stimulating factors. *Blood* (1980). doi:10.1182/blood.v56.6.947.947
50. **Hamilton, J. A., Cook, A. D. & Tak, P. P.** Anti-colony-stimulating factor therapies for inflammatory and autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov.*(2016). doi:10.1038/nrd.2016.231
51. **Stanley, E. R. & Heard, P. M.** Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem.* (1977). doi:10.1016/S0021-9258(17)40265-1
52. **Stanley, E. R., Chen, D. M. & Lin, H. S.** Induction of macrophage production and proliferation by a purified colony stimulating factor. *Nature* (1978). doi:10.1038/274168a0

53. **Metcalf, D., & Nicola, N.** *The Hemopoietic Colony-stimulating Factors: From Biology to Clinical Applications*. Cambridge: Cambridge University Press (1995). doi:10.1017/CBO9780511663376
54. **Hume, D. A. & MacDonald, K. P. A.** Therapeutic applications of macrophage colony-stimulating factor-1 (CSF-1) and antagonists of CSF-1 receptor (CSF-1R) signaling. *Blood* (2012). doi:10.1182/blood-2011-09-379214
55. **Ushach, I. & Zlotnik, A.** Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J Leukoc Biol.* (2016). doi:10.1189/jlb.3RU0316-144R
56. **Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J.** The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* (2003). doi:10.1038/nm0603-669
57. **Tanaka, S. et al.** Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest.* (1993). doi:10.1172/JCI116179
58. **Dai, X. M., Zong, X. H., Sylvestre, V. & Stanley, E. R.** Incomplete restoration of colony-stimulating factor 1 (CSF-1) function in CSF-1-deficient *Csf1^{op}/Csf1^{op}* mice by transgenic expression of cell surface CSF-1. *Blood* (2004). doi:10.1182/blood-2003-08-2739
59. **Roth, P. & Stanley, E. R.** The biology of CSF-1 and its receptor. *Current Topics in Microbiology and Immunology* (1992). doi:10.1007/978-3-642-77377-8_5
60. **Mun, S. H., Park, P. S. U. & Park-Min, K. H.** The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Exp Mol Med.*(2020). doi:10.1038/s12276-020-0484-z
61. **Varol, C., Mildner, A. & Jung, S.** Macrophages: Development and tissue specialization. *Annu Rev Immunol.* (2015). doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112220
62. **Cassetta, L. & Pollard, J. W.** Targeting macrophages: Therapeutic approaches in cancer. *Nat Rev Drug Discov.*(2018). doi: 10.1038/nrd.2018.169
63. **Greter, M. et al.** GM-CSF Controls Nonlymphoid Tissue Dendritic Cell Homeostasis but Is Dispensable for the Differentiation of Inflammatory Dendritic Cells. *Immunity* (2012). doi: 10.1016/j.immuni.2012.03.027
64. **Martinez, F. O. & Gordon, S.** The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: Time for reassessment. *F1000Prime Rep.* (2014). doi: 10.12703/P6-13
65. **Baghdadi, M. et al.** Interleukin-34, a comprehensive review. *J Leukoc Biol.* (2018). doi: 10.1002/JLB.MR1117-457R
66. **Dai, X. M. et al.** Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* (2002). doi: 10.1182/blood.v99.1.111
67. **Wiktor-Jedrzejczak, W. et al.** Correction by CSF-1 of defects in the osteopetrotic op/op mouse suggests local, developmental, and humoral requirements for this growth factor. *Exp Hematol.* (1991). PMID:1915705
68. **Asagiri, M. & Takayanagi, H.** The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* (2007). doi: 10.1016/j.bone.2006.09.023
69. **Sierra-Filardi, E. et al.** CCL2 Shapes Macrophage Polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-Dependent Gene Expression Profile. *J Immunol.* (2014). doi: 10.4049/jimmunol.1302821
70. **Hamilton, J. A., Stanley, E. R., Burgess, A. W. & Shadduck, R. K.** Stimulation of macrophage plasminogen activator activity by colony-stimulating factors. *J Cell Physiol.* (1980). doi:10.1002/jcp.1041030309
71. **Handman, E. & Burgess, A. W.** Stimulation by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor of *Leishmania tropica* killing by macrophages. *J Immunol.* (1979). PMID:312818
72. **Hamilton, J. A.** GM-CSF in inflammation. *J Exp Med* (2019). doi:10.1084/jem.20190945
73. **Hamilton, J. A.** GM-CSF-Dependent Inflammatory Pathways. *Front Immunol.* (2019). doi:10.3389/fimmu.2019.02055
74. **Young, A. et al.** Cutting Edge: Suppression of GM-CSF Expression in Murine and Human T Cells by IL-27. *J Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1200131
75. **Shi, Y. et al.** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: What we do and don't know. *Cell Research* (2006). doi:10.1038/sj.cr.7310017
76. **Sagawa, K. et al.** Suppression by IL-10 and IL-4 of cytokine production induced by two-way autologous mixed lymphocyte reaction. *Cytokine* (1996). doi:10.1006/cyto.1996.0068
77. **Martinez-Moczygemba, M. & Huston, D. P.** Biology of common β receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol.* (2003). doi:10.1016/S0091

78. **Shibata, Y. et al.** GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* (2001). doi:10.1016/s1074-7613(01)00218-7
79. **Schneider, C. et al.** Induction of the nuclear receptor PPAR- γ 3 by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages. *Nat Immunol.* (2014). doi:10.1038/ni.3005
80. **Trapnell, B. C. & Whitsett, J. A.** GM-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol* (2002). doi:10.1146/annurev.physiol.64.090601.113847
81. **Stanley, E. et al.** Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994). doi:10.1073/pnas.91.12.5592
82. **Sallese, A. et al.** Targeting cholesterol homeostasis in lung diseases. *Sci Rep.* (2017). doi:10.1038/s41598-017-10879-w
83. **Becher, B., Tugues, S. & Greter, M.** GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity* (2016). doi:10.1016/j.immuni.2016.10.026
84. **Akagawa, K. S.** Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int J Hematol.* (2002). doi:10.1189/jlb.0105015
85. **Verreck, F. A. W., de Boer, T., Langenberg, D. M. L., van der Zanden, L. & Ottenhoff, T. H. M.** 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.* (2006). doi:10.1189/jlb.0105015
86. **Li, G., Kim, Y.-J. & Broxmeyer, H. E.** Macrophage Colony-Stimulating Factor Drives Cord Blood Monocyte Differentiation into IL-10 high IL-12 absent Dendritic Cells with Tolerogenic Potential. *J Immunol.* (2005). doi:10.4049/jimmunol.174.8.4706
87. **Puig-Kröger, A. et al.** Folate receptor β is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory Macrophages. *Cancer Res.* (2009). doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2050
88. **de las Casas-Engel, M. et al.** Serotonin Skews Human Macrophage Polarization through HTR2B and HTR7. *J Immunol.* (2013). doi:10.4049/jimmunol.1201133
89. **Izquierdo, E. et al.** Reshaping of Human Macrophage Polarization through Modulation of Glucose Catabolic Pathways. *J Immunol.* (2015). doi:10.4049/jimmunol.1403045
90. **Escibese, M. M. et al.** The Prolyl Hydroxylase PHD3 Identifies Proinflammatory Macrophages and Its Expression Is Regulated by Activin A. *J Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1201064
91. **Sierra-Filardi, E. et al.** Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* (2011). doi:10.1182/blood-2010-09-306993
92. **Phillips, D. J., de Kretser, D. M. & Hedger, M. P.** Activin and related proteins in inflammation: Not just interested bystanders. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2009). doi:10.1016/j.cytogfr.2009.02.007
93. **Chen, Y. G. et al.** Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Bio Med* (2006). doi:10.1177/153537020623100507
94. **Lacey, D. C. et al.** Defining GM-CSF- and Macrophage-CSF-Dependent Macrophage Responses by In Vitro Models. *J Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1103426
95. **Paine, R. et al.** Impaired functional activity of alveolar macrophages from GM-CSF-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* (2001). doi:10.1152/ajplung.2001.281.5.L1210
96. **González-Domínguez, É. et al.** Atypical Activin A and IL-10 Production Impairs Human CD16 + Monocyte Differentiation into Anti-Inflammatory Macrophages. *J Immunol.* (2016). doi:10.4049/jimmunol.1501177
97. **Fleetwood, A. J., Dinh, H., Cook, A. D., Hertzog, P. J. & Hamilton, J. A.** GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on Type I interferon signaling. *J Leukoc Biol.* (2009). doi:10.1189/jlb.1108702
98. **González-Domínguez, E. et al.** CD163L1 and CLECSA discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *J Leukoc Biol.* (2015). doi:10.1189/jlb.3HI1114-531R
99. **Palacios, B. S. et al.** Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin a-dependent pro-inflammatory profile. *J Pathol.* (2015). doi:10.1002/path.4466

100. **Van Overmeire, E. et al.** M-CSF and GM-CSF receptor signaling differentially regulate monocyte maturation and macrophage polarization in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* (2016). doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0869
101. **Cuevas, V. D. et al.** MAFB Determines Human Macrophage Anti-Inflammatory Polarization: Relevance for the Pathogenic Mechanisms Operating in Multicentric Carpotarsal Osteolysis. *J Immunol.* (2017). doi:10.4049/jimmunol.1601667
102. **Kikuchi, K. et al.** Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation. *J Immunol.* (2018). doi:10.4049/jimmunol.1800040
103. **Samaniego, R. et al.** Folate Receptor β (FR β) Expression in Tissue-Resident and Tumor-Associated Macrophages Associates with and Depends on the Expression of PU.1. *Cells* (2020). doi:10.3390/cells9061445
104. **Domínguez-Soto, A. et al.** 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.* (2011). doi:10.4049/jimmunol.1000475
105. **Sierra-Filardi, E., Vega, M. A., Sánchez-Mateos, P., Corbí, A. L. & Puig-Kröger, A.** Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology* (2010). doi:10.1016/j.imbio.2010.05.020
106. **Cook, A. D. et al.** Regulation of systemic and local myeloid cell subpopulations by bone marrow cell-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* (2011). doi:10.1002/art.30354
107. **Wicks, I. P. & Roberts, A. W.** Targeting GM-CSF in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol.* (2016). doi:10.1038/nrrheum.2015.161
108. **Williamson, D. J., Begley, C. G., Vadas, M. A. & Metcalf, D.** The detection and initial characterization of colony-stimulating factors in synovial fluid. *Clin Exp Immunol.* (1988). PMID:3260840
109. **De Vries, E. G. E. et al.** Flare-up of rheumatoid arthritis during GM-CSF treatment after chemotherapy. *The Lancet* (1991). doi:10.1016/0140-6736(91)90594-f
110. **Greven, D. E. A. et al.** Preclinical characterisation of the GM-CSF receptor as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2015). doi:10.1136/annrheumdis-2014-205234
111. **Cook, A. D., Braine, E. L., Campbell, I. K., Rich, M. J. & Hamilton, J. A.** 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.* (2001). PMID:9759887
112. **Campbell, I. K. et al.** Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J Immunol.* (1998). PMID:9759887
113. **Monaghan, K. L. & Wan, E. C. K.** The Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Murine Models of Multiple Sclerosis. *Cells* (2020). doi:10.3390/cells9030611
114. **Hirota, K. et al.** Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis. *Immunity* (2018). doi:10.1016/j.immuni.2018.04.009
115. **Al-Mossawi, M. H. et al.** Unique transcriptome signatures and GM-CSF expression in lymphocytes from patients with spondyloarthritis. *Nat Commun.* (2017). doi:10.1038/s41467-017-01771-2
116. **Achuthan, A. et al.** Granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces CCL17 production via IRF4 to mediate inflammation. *J Clin Invest.* (2016). doi:10.1172/JCI87828
117. **Lee, M.-C. et al.** GM-CSF– and IRF4-Dependent Signaling Can Regulate Myeloid Cell Numbers and the Macrophage Phenotype during Inflammation. *J Immunol.* (2019). doi:10.4049/jimmunol.1801549
118. **Guo, X. et al.** Pharmacodynamic biomarkers and differential effects of TNF- and GM-CSF-targeting biologics in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* (2019). doi:10.1111/1756-185X.13395
119. **Cook, A. D. et al.** TNF and granulocyte macrophage-colony stimulating factor interdependence mediates inflammation via CCL17. *JCI insight* (2018). doi:10.1172/jci.insight.99249
120. **Avci, A. B., Feist, E. & Burmester, G. R.** Targeting GM-CSF in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* (2016). PMID:27586802
121. **Burmester, G. R. et al.** A randomised phase IIb study of mavrilimumab, a novel GM-CSF receptor alpha monoclonal antibody, in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2017). doi:10.1136/annrheumdis-2016-210624

122. **Burmester, G. R. et al.** Mavrimumab, a Fully Human Granulocyte–Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor α Monoclonal Antibody: Long-Term Safety and Efficacy in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* (2018). doi:10.1002/art.40420
123. **Huizinga, T. W. J. et al.** Phase 1b randomized, double-blind study of namilumab, an anti-granulocyte macrophage colony-stimulating factor monoclonal antibody, in mild-to-moderate rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* (2017). doi:10.1186/s13075-017-1267-3
124. **Taylor, P. C. et al.** Efficacy and safety of namilumab, a human monoclonal antibody against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ligand in patients with rheumatoid arthritis (RA) with either an inadequate response to background methotrexate therapy or an inadequate response or intolerance to an anti-TNF (tumour necrosis factor) biologic therapy: A randomized, controlled trial. *Arthritis Res Ther.* (2019). doi:10.1186/s13075-019-1879-x
125. **Papp, K. A. et al.** Granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) as a therapeutic target in psoriasis: randomized, controlled investigation using namilumab, a specific human anti-GM-CSF monoclonal antibody. *Br J Dermatol.* (2019). doi:10.1111/bjd.17195
126. **Molfino, N. A. et al.** Phase 2, randomised placebo-controlled trial to evaluate the efficacy and safety of an anti-GM-CSF antibody (KB003) in patients with inadequately controlled asthma. *BMJ Open* (2016). doi:10.1136/bmjopen-2015-007709
127. **Behrens, F. et al.** MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte - Macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: Results of a phase Ib/IIa randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Ann Rheum Dis.* (2015). doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204816
128. **Parkin, J. & Cohen, B.** An overview of the immune system. *Lancet* (2001). doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7
129. **Sonnenberg, G. F. & Hepworth, M. R.** Functional interactions between innate lymphoid cells and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* (2019). doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7
130. **Gourbal, B. et al.** Innate immune memory: An evolutionary perspective. *Immunol Rev.* (2018). doi:10.1111/imr.12647
131. **Fu, Z. Q. & Dong, X.** Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. *Annu Rev Plant Biol.* (2013). doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105606
132. **Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M. & Schneider, D. S.** A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathog.* (2007). doi:10.1371/journal.ppat.0030026
133. **Rodrigues, J., Brayner, F. A., Alves, L. C., Dixit, R. & Barillas-Mury, C.** Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Science* (2010). doi:10.1126/science.1190689
134. **Moret, Y. & Siva-Jothy, M. T.** Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc Biol Sci.* (2003). doi:10.1098/rspb.2003.2511
135. **Netea, M. G. et al.** Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol.* (2020). doi:10.1038/s41577-020-0285-6.
136. **J W van 't Wout, R Poell, R van Furth.** The Role of BCG/PPD-Activated Macrophages in Resistance against Systemic Candidiasis in Mice. *Scand J Immunol.* (1992). doi:10.1111/j.1365-3083.1992.tb03132.x
137. **Kaufmann, E. et al.** BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate Immunity against Tuberculosis. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2017.12.031
138. **Arts, R. J. W. et al.** BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe* (2018). doi:10.1016/j.chom.2017.12.010
139. **Walk, J. et al.** Outcomes of controlled human malaria infection after BCG vaccination. *Nat Commun.* (2019). doi:10.1038/s41467-019-08659-3
140. **Sun, J. C., Beilke, J. N. & Lanier, L. L.** Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* (2009). doi:10.1038/nature07665
141. **Kleinnijenhuis, J. et al.** BCG-induced trained immunity in NK cells: Role for non-specific protection to infection. *Clin Immunol.* (2014). doi:10.1016/j.clim.2014.10.005
142. **Jensen, K. J. et al.** Heterologous immunological effects of early BCG vaccination in low-birth-weight infants in guinea-bissau: A randomized-controlled trial. *J Infect Dis.* (2015). doi:10.1093/infdis/jiu508

143. **Hong, M. et al.** Trained immunity in newborn infants of HBV-infected mothers. *Nat Commun.* (2015). doi:10.1038/ncomms7588
144. **Divangahi, M. et al.** Trained immunity, tolerance, priming and differentiation: distinct immunological processes. *Nat Immunol.* (2021). doi:10.1038/s41590-020-00845-6
145. **Netea, M. G. et al.** Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* (2016). doi:10.1126/science.aaf1098
146. **Cheng, S. C. et al.** mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* (2014). doi:10.1126/science.1250684
147. **Quintin, J. et al.** *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe* (2012). doi:10.1016/j.chom.2012.06.006
148. **Lee, J. et al.** Epigenetic modification and antibody-dependent expansion of memory-like NK cells in human cytomegalovirus-infected individuals. *Immunity* (2015). doi:10.1016/j.immuni.2015.02.013
149. **Schlums, H. et al.** Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity* (2015). doi:10.1016/j.immuni.2015.02.008
150. **Biswas, S. K. & Lopez-Collazo, E.** Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* (2009). doi:10.1016/j.it.2009.07.009
151. **Bekkering, S., Dominguez-Andres, J., Joosten, L. A. B., Riksen, N. P. & Netea, M. G.** Trained Immunity: Reprogramming Innate Immunity in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.*(2021). doi:10.1146/annurev-immunol-102119-073855
152. **Mitroulis, I. et al.** Modulation of Myelopoiesis Progenitors Is an Integral Component of Trained Immunity. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2017.11.034
153. **Chavakis, T., Mitroulis, I. & Hajishengallis, G.** Hematopoietic progenitor cells as integrative hubs for adaptation to and fine-tuning of inflammation. *Nat Immunol.* (2019). doi:10.1038/s41590-019-0402-5
154. **Cirovic, B. et al.** BCG Vaccination in Humans Elicits Trained Immunity via the Hematopoietic Progenitor Compartment. *Cell Host Microbe* (2020). doi:10.1016/j.chom.2020.05.014
155. **Zhong, C., Yang, X., Feng, Y. & Yu, J.** Trained Immunity: an underlying driver of inflammatory atherosclerosis. *Front Immunol.* (2020). doi:10.3389/fimmu.2020.00284
156. **Riksen, N. P. & Netea, M. G.** Immunometabolic control of trained immunity. *Mol Aspects Med.* (2021). doi:10.1016/j.mam.2020.100897
157. **Fanucchi, S., Domínguez-Andrés, J., Joosten, L. A. B., Netea, M. G. & Mhlanga, M. M.** The Intersection of Epigenetics and Metabolism in Trained Immunity. *Immunity* (2021). doi:10.1016/j.immuni.2020.10.011
158. **Domínguez-Andrés, J., Joosten, L. A. & Netea, M. G.** Induction of innate immune memory: the role of cellular metabolism. *Curr Opin Immunol.* (2019). doi:10.1016/j.coi.2018.09.001
159. **Arts, R. J. W. et al.** Glutaminolysis and Fumarate Accumulation Integrate Immunometabolic and Epigenetic Programs in Trained Immunity. *Cell Metab.* (2016). doi:10.1016/j.cmet.2016.10.008
160. **Novakovic, B. et al.** β -Glucan Reverses the Epigenetic State of LPS-Induced Immunological Tolerance. *Cell* (2016). doi:10.1016/j.cell.2016.09.034
161. **Saeed, S. et al.** Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science* (2014). doi:10.1126/science.1251086
162. **Foster, S. L., Hargreaves, D. C. & Medzhitov, R.** Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* (2007). doi:10.1038/nature05836
163. **Liu, D., Cao, S., Zhou, Y. & Xiong, Y.** Recent advances in endotoxin tolerance. *J Cell Biochem.* (2019). doi:10.1002/jcb.27547
164. **Seeley, J. J. & Ghosh, S.** Molecular mechanisms of innate memory and tolerance to LPS. *J Leukoc Biol.* (2017). doi:10.1189/jlb.3MR0316-118RR
165. **Arts, R. J. W. et al.** Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep.* (2016). doi:10.1016/j.celrep.2016.11.011
166. **Bekkering, S. et al.** Metabolic Induction of Trained Immunity through the Mevalonate Pathway. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2017.11.025
167. **Stienstra, R., Netea-Maier, R. T., Riksen, N. P., Joosten, L. A. B. & Netea, M. G.** Specific and Complex Reprogramming of Cellular Metabolism in Myeloid Cells during Innate Immune Responses. *Cell Metabolism* (2017). doi:10.1016/j.cmet.2017.06.001.
168. **Haschemi, A. et al.** The sedoheptulose kinase CAR1L directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab.* (2012). doi:10.1016/j.cmet.2012.04.023.

169. **Domínguez-Andrés, J. et al.** The Itaconate Pathway Is a Central Regulatory Node Linking Innate Immune Tolerance and Trained Immunity. *Cell Metab.* (2019). doi:10.1016/j.cmet.2018.09.003
170. **Cheng, S. C. et al.** Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nat Immunol.* (2016). doi:10.1038/ni.3398
171. **Shalova, I. N. et al.** Human monocytes undergo functional re-programming during sepsis mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Immunity* (2015). doi:10.1016/j.immuni.2015.02.001
172. **Foster, S. L. & Medzhitov, R.** Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Nature* (2009). doi:10.1038/nature05836
173. **Cavaillon, J. M. & Adib-Conquy, M.** Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Critical Care* (2006). doi:10.1186/cc5055
174. **Dobrovolskaia, M. A. & Vogel, S. N.** Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* (2002). doi:10.1016/s1286-4579(02)01613-1
175. **Monneret, G., Venet, F., Pachot, A. & Lepape, A.** Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: A new skin for the old ceremony. *Mol Med* (2008). doi:10.2119/2007-00102.Monneret
176. **del Fresno, C. et al.** Potent Phagocytic Activity with Impaired Antigen Presentation Identifying Lipopolysaccharide-Tolerant Human Monocytes: Demonstration in Isolated Monocytes from Cystic Fibrosis Patients. *J Immunol.* (2009). doi:10.4049/jimmunol.0803350
177. **Wolk, K., Kunz, S., Crompton, N. E. A., Volk, H. D. & Sabat, R.** Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance. *J Biol Chem.* (2003). doi:10.1074/jbc.M207714200
178. **Wolk, K., Döcke, W.-D., von Baehr, V., Volk, H.-D. & Sabat, R.** Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* (2000). doi:10.1182/blood.V96.1.218.013k04_218_223
179. **Di Gioia, M. & Zanoni, I.** Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response. *Mol Immunol.* (2015). doi:10.1016/j.molimm.2014.05.008
180. **Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K. & Kwiatkowska, K.** Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* (2015). doi:10.1007/s00018-014-1762-5
181. **Gilmore, T. D.** Introduction to NF- κ B: Players, pathways, perspectives. *Oncogene* (2006). doi:10.1038/sj.onc.1209954
182. **Häcker, H. et al.** Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* (2006). doi:10.1038/nature04369
183. **Skaug, B. et al.** Direct, Noncatalytic Mechanism of IKK Inhibition by A20. *Mol Cell* (2011). doi:10.1016/j.molcel.2011.09.015
184. **Shembade, N. & Harhaj, E. W.** Regulation of NF- κ B signaling by the A20 deubiquitinase. *Cell Mol Immunol.* (2012). doi:10.1038/cmi.2011.59
185. **Park, S. H., Park-Min, K. H., Chen, J., Hu, X. & Ivashkiv, L. B.** Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nat Immunol.* (2011). doi:10.1038/ni.2043
186. **Municio, C. et al.** Methotrexate limits inflammation through an A20-dependent cross-tolerance mechanism. *Ann Rheum Dis.* (2018). doi:10.1136/annrheumdis-2017-212537
187. **Liu, Y. Y. et al.** High-molecular-weight hyaluronan - A possible new treatment for sepsis-induced lung injury: A preclinical study in mechanically ventilated rats. *Crit. Care* (2008). doi:10.1186/cc6982
188. **Kwon, A. H., Qiu, Z., Nagahama, H., Kaibori, M. & Kamiyama, Y.** Fibronectin suppresses apoptosis and protects mice from endotoxic shock. *Transplant Proc* (2004). doi:10.1111/1523-1747.ep12332650
189. **Avendaño-Ortiz, J. et al.** SARS-CoV-2 Proteins Induce Endotoxin Tolerance Hallmarks: A Demonstration in Patients with COVID-19. *J Immunol.* (2021). doi: 10.4049/jimmunol.2001449
190. **Domínguez-Soto, Á. et al.** IVIg Promote Cross-Tolerance against Inflammatory Stimuli In Vitro and In Vivo. *J Immunol.* (2018). doi:10.4049/jimmunol.1701093
191. **Municio, C. et al.** Methotrexate selectively targets human proinflammatory macrophages through a thymidylate synthase/p53 axis. *Ann Rheum Dis.* (2016). doi:10.1136/annrheumdis-2015-208736
192. **Ducker, G. S. & Rabinowitz, J. D.** One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metabolism* (2017). doi:10.1016/j.cmet.2016.08.009
193. **Fan, J. et al.** Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13236

194. **Gonen, N. & Assaraf, Y. G.** Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resist Updat.* (2012). doi:10.1016/j.drug.2012.07.002
195. **Lan, X., Field, M. S. & Stover, P. J.** Cell cycle regulation of folate-mediated one-carbon metabolism. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* (2018). doi:10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x
196. **Locasale, J. W.** Serine, glycine and one-carbon units: Cancer metabolism in full circle. *Nat Rev Cancer* (2013). doi:10.1038/nrc3557
197. **Shuvalov, O. et al.** One-carbon metabolism and nucleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.15053
198. **Lyon, P., Strippoli, V., Fang, B. & Cimmino, L.** B vitamins and one-carbon metabolism: Implications in human health and disease. *Nutrients* (2020). doi:10.3390/nu12092867
199. **Warzyszynska, J. E. & Kim, Y.-I. J.** Folate in Human Health and Disease. *eLS* (2014). doi:10.1002/9780470015902.a0002268.pub2.
200. **Hanson, A. D. & Gregory, J. F.** Synthesis and turnover of folates in plants. *Curr Opin Plant Biol* (2002). doi:10.1016/s1369-5266(02)00249-2
201. **White, R. H.** Analysis and characterization of the folates in the nonmethanogenic archaeobacteria. *J Bacteriol.* (1988). doi:10.1128/jb.170.10.4608-4612.1988
202. **Levin, I., Giladi, M., Altman-Price, N., Ortenberg, R. & Mevarech, M.** An alternative pathway for reduced folate biosynthesis in bacteria and halophilic archaea. *Mol Microbiol.* (2004). doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04339.x
203. **de Crécy-Lagard, V., El Yacoubi, B., de la Garza, R. D., Noiriél, A. & Hanson, A. D.** Comparative genomics of bacterial and plant folate synthesis and salvage: Predictions and validations. *BMC Genomics* (2007). doi:10.1186/1471-2164-8-245
204. **Rossi, M., Amaretti, A. & Raimondi, S.** Folate production by probiotic bacteria. *Nutrients* (2011). doi:10.3390/nu3010118
205. **Zhao, R., Matherly, L. H. & Goldman, I. D.** Membrane transporters and folate homeostasis: Intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med.* (2009). doi:10.1017/S1462399409000969
206. **Zhao, R., Diop-Bove, N., Visentin, M. & Goldman, I. D.** Mechanisms of Membrane Transport of Foliates into Cells and Across Epithelia. *Annu Rev Nutr.* (2011). doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145133
207. **Qiu, A. et al.** Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell* (2006). doi:10.1016/j.cell.2006.09.041
208. **Zhao, R. & Goldman, I. D.** The molecular identity and characterization of a Proton-Coupled Folate Transporter - PCFT; biological ramifications and impact on the activity of pemetrexed. *Cancer Metastasis Rev.* (2007). doi:10.1007/s10555-007-9047-1
209. **Matherly, L. H., Hou, Z. & Deng, Y.** Human reduced folate carrier: Translation of basic biology to cancer etiology and therapy. *Cancer Metastasis Rev* (2007). doi:10.1007/s10555-007-9046-2
210. **Elnakat, H. & Ratnam, M.** Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: Implications in targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* (2004). doi:10.1016/j.addr.2004.01.001
211. **Kamen, B. A. & Smith, A. K.** A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. *Adv Drug Deliv Rev.* (2004). doi:10.1016/j.addr.2004.01.002
212. **Shen, J. et al.** Folate receptor- β constitutes a marker for human proinflammatory monocytes. *J Leukoc Biol.* (2014). doi:10.1189/jlb.2AB0713-372R
213. **Shane, B.** Folylpolyglutamate Synthesis and Role in the Regulation of One-Carbon Metabolism. *Vitam Horm.* (1989). doi:10.1016/s0083-6729(08)60397-0
214. **Baugh, C. M., Krumdieck, C. L. & Nair, M. G.** Polyglutamate metabolites of methotrexate. *Biochem Biophys Res Commun.* (1973). doi:10.1016/0006-291x(73)90949-2
215. **Schirch, V. & Strong, W. B.** Interaction of folylpolyglutamates with enzymes in one-carbon metabolism. *Arch Biochem Biophys.* (1989). doi:10.1016/0003-9861(89)90120-3
216. **Wielinga, P. et al.** The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res.* (2005). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2810
217. **Volk, E. L. & Schneider, E.** Wild-type breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) is a methotrexate polyglutamate transporter. *Cancer Res.* (2003). PMID:14500392

218. **Schneider, E. & Ryan, T. J.** Gamma-glutamyl hydrolase and drug resistance. *Clin Chim Acta* (2006). doi:10.1016/j.cca.2006.05.044
219. **Assaraf, Y. G.** The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat.* (2006). doi:10.1016/j.drug.2006.09.001
220. **Ifergan, I. & Assaraf, Y. G.** Chapter 4 Molecular Mechanisms of Adaptation to Folate Deficiency. *Vitam Horm.*(2008). doi:10.1016/S0083-6729(08)00404-4
221. **Jeeja, M. C. et al.** Folic acid supplementation on homocysteine levels in children taking antiepileptic drugs: A randomized controlled trial. *J Pharmacol Pharmacother.* (2014). doi:10.4103/0976-500X.130048
222. **Heijer, M. Den et al.** Vitamin supplementation reduces blood homocysteine levels: A controlled trial in patients with venous thrombosis and healthy volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1998). doi:10.1161/01.atv.18.3.356
223. **Grapp, M. et al.** Molecular characterization of folate receptor 1 mutations delineates cerebral folate transport deficiency. *Brain* (2012). doi:10.1093/brain/awr122
224. **Schubert, J., Schmidt, R. & Syska, E.** B group vitamins and cleft lip and cleft palate. *Int J Oral Maxillofac Surg* (2002). doi:10.1054/ijom.2001.0212
225. **Socha, D. S., DeSouza, S. I., Flagg, A., Sekeres, M. & Rogers, H. J.** Severe megaloblastic anemia: Vitamin deficiency and other causes. *Cleve Clin J Med.* (2020). doi:10.3949/ccjm.87a.19072
226. **Allegra, C. J. et al.** Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. *J Biol Chem.* (1985). PMID:2410416
227. **Baggott, J. E., Vaughn, W. H. & Hudson, B. B.** Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide. *Biochem J.* (1986). doi:10.1042/bj2720339
228. **Shin, C. et al.** Ly231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes. *Cancer Res.* (1997). PMID:9067281
229. **Bedoui, Y. et al.** Methotrexate an old drug with new tricks. *Int J Mol Sci.* (2019). doi:10.3390/ijms20205023
230. **Assaraf, Y. G.** Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev* (2007). doi:10.1007/s10555-007-9049-z
231. **Yu, J. & Zhou, P.** The advances of methotrexate resistance in rheumatoid arthritis. *Inflammopharmacology* (2020). doi:10.1007/s10787-020-00741-3
232. **Cronstein, B. N. & Aune, T. M.** Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* (2020). doi:10.1038/s41584-020-0373-9
233. **Farber, S., Diamond, L. K., Mercer, R. D., Sylvester, R. F. & Wolff, J. A.** Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin). *N Eng J Med.* (1948). doi:10.1056/NEJM194806032382301
234. **Williams, H. J. et al.** Comparison of low-dose oral pulse methotrexate and placebo in the treatment of rheumatoid arthritis. A Controlled Clinical Trial. *Arthritis Rheum.* (1985). doi:10.1002/art.1780280702
235. **Kremer, J. M. & Lee, J. K.** The safety and efficacy of the use of methotrexate in long-term therapy for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (1986). doi:10.1002/art.1780290702
236. **Weinblatt, M. E.** Methotrexate in rheumatoid arthritis: a quarter century of development. *Trans of Am Clin Climatol Assoc* (2013). PMID:23874006
237. **Smolen, J. S. et al.** EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis.* (2020). doi:10.1136/annrheumdis-2019-216655
238. **Brown, P. M., Pratt, A. G. & Isaacs, J. D.** Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. *Nat Rev Rheumatol.* (2016). doi:10.1038/nrrheum.2016.175
239. **Morgan, S. L. et al.** Supplementation with folic acid during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.*(1994). doi:10.7326/0003-4819-121-11-199412010-00002
240. **Kremer, J. M., Lawrence, D. A., Hamilton, R. & McInnes, I. B.** Long-term study of the impact of methotrexate on serum cytokines and lymphocyte subsets in patients with active rheumatoid arthritis: Correlation with pharmacokinetic measures. *RMD Open* (2016). doi:10.1136/rmdopen-2016-000287

241. **Aletaha, D. et al.** 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* (2010). doi:10.1136/ard.2010.138461
242. **Goodkin, D. E. et al.** Low-dose (7.5 mg) oral methotrexate reduces the rate of progression in chronic progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol.* (1995). doi:10.1002/ana.410370108
243. **Lémann, M. et al.** Methotrexate in Crohn's disease: Long-term efficacy and toxicity. *Am J Gastroenterol.* (2000). doi:10.1111/j.1572-0241.2000.02190.x
244. **Karahmet, O. Z., Bal, A., Dulgeroglu, D., Bahceci, H. K. & Cakci, A.** Methotrexate treatment in myasthenia gravis. *J Clin Neuromuscul Dis.* (2014). doi:10.1097/CND.0000000000000057
245. **Walling, J.** From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates. *Invest New Drugs.* (2006). doi:10.1007/s10637-005-4541-1
246. **Frei, E. et al.** High dose methotrexate with leucovorin rescue. Rationale and spectrum of antitumor activity. *Am J Med.* (1980). doi:10.1016/0002-9343(80)90105-9
247. **Schiff, M. H. & Sadowski, P.** Oral to subcutaneous methotrexate dose-conversion strategy in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* (2017). doi:10.1007/s00296-016-3621-1
248. **Maksimovic, V. et al.** Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Mol Biol Rep* (2020). doi:10.1007/s11033-020-05481-9
249. **Herman, R. A., Veng-Pedersen, P., Hoffman, J., Koehnke, R. & Furst, D. E.** Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis patients. *J Pharm Sci.* (1989). doi:10.1002/jps.2600780219
250. **Dervieux, T. et al.** HPLC determination of erythrocyte methotrexate polyglutamates after low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem.* (2003). doi:10.1373/49.10.1632
251. **Kremer, J. M., Galivan, J., Streckfuss, A. & Kamen, B.** Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients: Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. *Arthritis Rheum.* (1986). doi:10.1002/art.1780290703
252. **Prasad, P. D., Ramamoorthy, S., Lei Bach, F. H. & Ganapathy, V.** Molecular cloning of the human placental folate transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* (1995). doi:10.1006/bbrc.1995.1096
253. **Wong, S. C., Proefke, S. A., Bhushan, A. & Matherly, L. H.** Isolation of human cDNAs that restore methotrexate sensitivity and reduced folate carrier activity in methotrexate transport-defective Chinese hamster ovary cell. *J Biol Chem.* (1995). doi:10.1074/jbc.270.29.17468
254. **Xin, W., Feng, S., Freisheim, J. H., Gentry, L. E. & Ratnam, M.** Differential stereospecificities and affinities of folate receptor isoforms for folate compounds and antifolates. *Biochem Pharmacol.* (1992). doi:10.1016/0006-2952(92)90089-2
255. **Chabner, B. A. et al.** Polyglutamation of methotrexate: Is Methotrexate a prodrug? *J Clin Invest* (1985). doi:10.1172/JCI112088
256. **Cronstein, B. N. & Sitkovsky, M.** Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*(2017). doi:10.1038/nrrheum.2016.178
257. **Varani, K. et al.** Normalization of A2A and A3 adenosine receptor up-regulation in rheumatoid arthritis patients by treatment with anti-tumor necrosis factor α but not methotrexate. *Arthritis Rheum.* (2009). doi:10.1002/art.24794
258. **Varani, K. et al.** A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release. *Arthritis Res Ther.* (2011). doi:10.1186/ar3527
259. **Stamp, L. K. et al.** Adenosine receptor expression in rheumatoid synovium: A basis for methotrexate action. *Arthritis Res Ther.* (2012). doi:10.1186/ar3871
260. **Zakeri, Z. et al.** Comparison of adenosine deaminase levels in serum and synovial fluid between patients with rheumatoid arthritis and steoarthritis. *Int J Clin Exp Med.* (2012). PMID:22567181
261. **Zamani, B., Jamali, R. & Jamali, A.** Serum adenosine deaminase may predict disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* (2012). doi:10.1007/s00296-011-1912-0
262. **Spurlock, C. F. et al.** Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor κ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology (Oxford)* (2014). doi:10.1093/rheumatology/keu279
263. **Spurlock, C. F., Tossberg, J. T., Matlock, B. K., Olsen, N. J. & Aune, T. M.** Methotrexate inhibits NF- κ B activity via long intergenic (noncoding) RNA-p21 induction. *Arthritis Rheumatol.* (2014). doi:10.1002/art.38805

264. **Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A.** Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2008). doi:10.1038/nrm2395
265. **Lowe, J. M. et al.** P53 and NF- κ B coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Cancer Res.* (2014). doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1070
266. **Shen, N. et al.** Three single nucleotide polymorphisms of TNFAIP3 gene increase the risk of rheumatoid arthritis. *Oncotarget* (2017). doi:10.18632/oncotarget.15265
267. **Zhu, L. et al.** Characteristics of A20 gene polymorphisms and clinical significance in patients with rheumatoid arthritis. *J Transl Med.* (2015). doi:10.1186/s12967-015-0566-1
268. **Chattopadhyay, S., Moran, R. G. & Goldman, I. D.** Pemetrexed: Biochemical and cellular pharmacology, mechanisms, and clinical applications. *Mol Cancer Ther.* (2007). doi:10.1158/1535-7163.MCT-06-0343
269. **Rollins, K. D. & Lindley, C.** Pemetrexed: A multitargeted antifolate. *Clin Ther* (2005). doi:10.1016/j.clinthera.2005.09.010
270. **Omori, Y. & Enatsu, S.** Pemetrexed for treatment of nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* (2018). PMID:30449848
271. **De Gooijer, C. J., Baas, P. & Burgers, J. A.** Current chemotherapy strategies in malignant pleural mesothelioma. *Translational Lung Cancer Research* (2018) doi:10.21037/tlcr.2018.04.10.
272. **Taylor, E. C. et al.** A Dideazatetrahydrofolate Analogue Lacking a Chiral Center at C-6, N-[4-[2-(2-Amino-3,4-dihydro-4-oxo-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5yl)ethyl]benzoyl]-l-glutamic Acid is an Inhibitor of Thymidylate Synthase. *J Med Chem.* (1992). doi:10.1021/jm00101a023
273. **Hazarika, M., White, R. M., Johnson, J. R. & Pazdur, R.** FDA Drug Approval Summaries: Pemetrexed (Alimta[®]). *Oncologist* (2004). doi:10.1634/theoncologist.9-5-482
274. **Ak, G., Metintas, S., Akarsu, M. & Metintas, M.** The effectiveness and safety of platinum-based pemetrexed and platinum-based gemcitabine treatment in patients with malignant pleural mesothelioma. *BMC Cancer* (2015). doi:10.1186/s12885-015-1519-z
275. **Langer, C. J. et al.** Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study. *Lancet Oncol.*(2016). doi:10.1016/S1470-2045(16)30498-3
276. **Gandhi, L. et al.** Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* (2018). doi:10.1056/NEJMoa1801005
277. **Bailly, C., Thuru, X. & Quesnel, B.** Combined cytotoxic chemotherapy and immunotherapy of cancer: modern times. *NAR Cancer* (2020). doi:10.1093/narcan/zcaa002
278. **Habeck, L. L. et al.** Substrate specificity of mammalian folylpolyglutamate synthetase for 5,10-dideazatetrahydrofolate analogs. *Mol Pharmacol.* (1995). PMID:7651366
279. **Racanelli, A. C., Rothbart, S. B., Heyer, C. L. & Moran, R. G.** Therapeutics by cytotoxic metabolite accumulation: Pemetrexed causes ZMP accumulation, AMPK activation, and mammalian target of rapamycin inhibition. *Cancer Res.* (2009). doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4979
280. **Wang, Y., Zhao, R. & Goldman, I. D.** Characterization of a folate transporter in HeLa cells with a low pH optimum and high affinity for pemetrexed distinct from the reduced folate carrier. *Clin Cancer Res.* (2004). doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0645
281. **Arnett, F. C. et al.** The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (1988). doi:10.1002/art.1780310302
282. **Rudwaleit, M. et al.** The Assessment of SpondyloArthritis international Society classification criteria for peripheral spondyloarthritis and for spondyloarthritis in general. *Ann Rheum Dis.* (2011). doi:10.1136/ard.2009.108233
283. **Taylor, W. et al.** Classification criteria for psoriatic arthritis: Development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheum.* (2006). doi:10.1002/art.21972
284. **Olivieri, I. et al.** Early treatment in early undifferentiated arthritis. *Autoimmun Rev.* (2012). doi:10.1016/j.autrev.2011.10.019
285. **Javier Narváez García, F.** Treating undifferentiated arthritis. What, when, how and how long? *Reumatol Clin.* (2009). doi:10.1016/j.reuma.2008.12.007
286. **Quinn, M. A. et al.** Prognostic factors in a large cohort of patients with early undifferentiated inflammatory arthritis after application of a structured management protocol. *Arthritis Rheum.* (2003). doi:10.1002/art.11269
287. **Hitchon, C. A., Peschken, C. A., Shaikh, S. & El-Gabalawy, H. S.** Early undifferentiated arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* (2005). doi:10.1016/j.rdc.2005.07.006

288. **Cuervo, A. et al.** Synovial immunohistological biomarkers of the classification of undifferentiated arthritis evolving to rheumatoid or psoriatic arthritis. *Front Med.* (2021). doi:10.1136/ard.2005.044354
289. **Combe, B. et al.** EULAR recommendations for the management of early arthritis: Report of a task force of the European Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum.* (2007). doi:10.1136/ard.2005.044354
290. **Combe, B. et al.** 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2017). doi:10.1136/annrheumdis-2016-210602
291. **Smolen, J. S. et al.** Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers.* (2018). doi:10.1038/nrdp.2018.1
292. **Van Der Helm-Van Mil, A. H. M. et al.** Validation of a prediction rule for disease outcome in patients with recent-onset undifferentiated arthritis: Moving toward individualized treatment decision-making. *Arthritis Rheum.* (2008). doi:10.1155/2013/548502
293. **Felson, D. T. et al.** American college of rheumatology/European league against rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials. *Arthritis Rheum.* (2011). doi:10.1002/art.30129
294. **Scherer, H. U., Häupl, T. & Burmester, G. R.** The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* (2020). doi:10.1016/j.jaut.2019.102400
295. **Tanaka, Y.** Rheumatoid arthritis. *Inflamm Regen.*(2020). doi:10.1186/s41232-020-00133-8
296. **Karlson, E. W. et al.** Association of environmental and genetic factors and gene-environment interactions with risk of developing rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* (2013). doi:10.1016/j.rdc.2012.04.002
297. **Silverman, G. J. et al.** Cross-reacting idiotypes on cryoprecipitating rheumatoid factor. *Springer Semin Immunopathol.* (1988). doi: 10.1007/BF02054022.
298. **Malmström, V., Catrina, A. I. & Klareskog, L.** The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: From triggering to targeting. *Nat Rev Immunol.* (2017). doi:10.1038/nri.2016.124
299. **Okada, Y., Eyre, S., Suzuki, A., Kochi, Y. & Yamamoto, K.** Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. *Ann Rheum Dis.* (2019). doi:10.1136/annrheumdis-2018-213678
300. **Plenge, R. M. et al.** Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet.* (2007). doi:10.1038/ng.2007.27
301. **Dieguez-Gonzalez, R. et al.** Analysis of TNFAIP3, a feedback inhibitor of nuclear factor- κ B and the neighbor intergenic 6q23 region in rheumatoid arthritis susceptibility. *Arthritis Res Ther.* (2009). doi:10.1186/ar2650
302. **Klein, K. & Gay, S.** Epigenetics in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.*(2015). doi:10.1097/BOR.000000000000128
303. **Smolen, J. S., Aletaha, D. & McInnes, I. B.** Rheumatoid arthritis. *Lancet* (2016). doi:10.1016/S0140-6736(16)30173-8
304. **Meng, W. et al.** DNA methylation mediates genotype and smoking interaction in the development of anti-citrullinated peptide antibody-positive rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* (2017). doi:10.1186/s13075-017-1276-2
305. **Arend, W. P. & Firestein, G. S.** Pre-rheumatoid arthritis: Predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol*(2012). doi:10.1038/nrrheum.2012.134
306. **Bartok, B. & Firestein, G. S.** Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.*(2010). doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00859.x
307. **Orr, C. et al.** Synovial tissue research: A state-of-the-art review. *Nat Rev Rheumatol.* (2017). doi:10.1038/nrrheum.2017.115
308. **Pettit, A. R., Walsh, N. C., Manning, C., Goldring, S. R. & Gravallese, E. M.** RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (2006). doi:10.1093/rheumatology/kel045
309. **Redlich, K. et al.** Osteoclasts are essential for TNF- α -mediated joint destruction. *J Clin Invest.* (2002). doi:10.1172/JCI15582
310. **D. Smith, M.** The Normal Synovium. *Open Rheumatol J.* (2012). doi:10.2174/1874312901105010100
311. **Kinne, R. W., Stuhlmüller, B. & Burmester, G. R.** Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther.* (2007). doi:10.1186/ar2333

312. **Haringman, J. J. et al.** Synovial tissue macrophages: A sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2005). doi:10.1136/ard.2004.029751
313. **Siouti, E. & Andreakos, E.** The many facets of macrophages in rheumatoid arthritis. *Biochem Pharmacol* (2019). doi:10.1016/j.bcp.2019.03.029
314. **Humby, F. et al.** Synovial cellular and molecular signatures stratify clinical response to csDMARD therapy and predict radiographic progression in early rheumatoid arthritis patients. *Ann Rheum Dis.* (2019). doi:10.1136/annrheumdis-2018-214539
315. **Tu, J. et al.** Synovial Macrophages in Rheumatoid Arthritis: The Past, Present, and Future. *Mediators Inflamm.* (2020). doi:10.1155/2020/1583647
316. **Mulherin, D., Fitzgerald, O. & Bresnihan, B.** Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (1996). doi:10.1002/art.1780390116
317. **Tak, P. P. & Bresnihan, B.** The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis: Advances from synovial biopsy and tissue analysis. *Arthritis Rheum.* (2000). doi:10.1002/1529-0131(200012)43:12<2619::AID-ANR1>3.0.CO;2-V
318. **Singh, J. A., Pando, J. A., Tomaszewski, J. & Schumacher, H. R.** Quantitative analysis of immunohistologic features of very early rheumatoid synovitis in disease modifying antirheumatic drug- and corticosteroid- naïve patients. *J Rheumatol.* (2004). PMID:15229944
319. **Tak, P. P. et al.** Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum.* (1997). doi:10.1002/art.1780400206
320. **Hamilton, J. A. & Tak, P. P.** The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* (2009). doi:10.1002/art.24505
321. **Wijbrandts, C. A. et al.** 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.* (2007). doi:10.1002/art.22964
322. **Wijbrandts, C. A. et al.** The clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis is in part dependent on pretreatment tumour necrosis factor α expression in the synovium. *Ann Rheum Dis.* (2008). doi:10.1136/ard.2007.080440
323. **Jahangier, Z. N. et al.** Pretreatment macrophage infiltration of the synovium predicts the clinical effect of both radiation synovectomy and intra-articular glucocorticoids. *Ann Rheum Dis.* (2006). doi:10.1136/ard.2005.042333
324. **Alivernini, S. et al.** Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* (2020). doi:10.1038/s41591-020-0939-8
325. **Kuo, D. et al.** HBEGF⁺ macrophages in rheumatoid arthritis induce fibroblast invasiveness. *Sci Transl Med.* (2019). doi:10.1126/scitranslmed.aau858
326. **Udalova, I. A., Mantovani, A. & Feldmann, M.** Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* (2016). doi:10.1038/nrrheum.2016.91
327. **Tosiek, M. J., Fiette, L., El Daker, S., Eberl, G. & Freitas, A. A.** IL-15-dependent balance between Foxp3 and ROR γ t expression impacts inflammatory bowel disease. *Nat Commun.* (2016). doi:10.1038/ncomms10888
328. **Miossec, P. & Kolls, J.K.** Targeting IL-17 and T H 17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* (2012). doi:10.1038/nrd3794
329. **Corvaisier, M. et al.** IL-26 Is Overexpressed in Rheumatoid Arthritis and Induces Proinflammatory Cytokine Production and Th17 Cell Generation. *PLoS Biol.* (2012). doi:10.1371/journal.pbio.1001395
330. **Ikeuchi, H. et al.** Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: Potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* (2005). doi:10.1002/art.20965
331. **Wang, F. et al.** Interleukin-29 modulates proinflammatory cytokine production in synovial inflammation of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* (2012). doi:10.1186/ar4067
332. **Yang, X. Z., Chang, Y. & Wei, W.** Endothelial Dysfunction and Inflammation: Immunity in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm.* (2016). doi:10.1155/2016/6813016
333. **Kim, H. R. et al.** Macrophage migration inhibitory factor upregulates angiogenic factors and correlates with clinical measures in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* (2007). PMID:17407222
334. **Ma, Y., Hong, F. F. & Yang, S. L.** Role of prostaglandins in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* (2021). PMID:32828139

335. **Vandooren, B. et al.** Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in Peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum.* (2009). doi:10.1002/art.24406
336. **Ambarus, C. A., Noordenbos, T., de Hair, M. J. H., Tak, P. P. & Baeten, D. L. P.** Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display an IL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res Ther.* (2012). doi:10.1186/ar3796
337. **van Riel, P. L. & Renskers, L.** The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* (2016). PMID:27762189
338. **Molina Collada, J., Trives, L. & Castrejón, I.** The Importance of Outcome Measures in the Management of Inflammatory Rheumatic Diseases. *Open Access Rheumatol.* (2021). doi: 10.2147/OARRR.S276980.
339. **FitzGerald, O. & Winchester, R.** Psoriatic arthritis: from pathogenesis to therapy. *Arthritis Res Ther.* (2009). doi:10.1186/ar2580
340. **Celis, R., Cuervo, A., Ramírez, J. & Cañete, J. D.** Psoriatic synovitis: Singularity and Potential Clinical Implications. *Front Med* (2019). doi:10.3389/fmed.2019.00014
341. **Paramarta, J. E. & Baeten, D.** Spondyloarthritis: From unifying concepts to improved treatment. *Rheumatology (Oxford)gy (United Kingdom)* (2014). doi:10.1093/rheumatology/kev407
342. **Cañete, J. D. et al.** Ectopic lymphoid neogenesis in psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2007). doi:10.1136/ard.2006.062042
343. **Fearon, U. et al.** Angiopoietins, growth factors, and vascular morphology in early arthritis. *J Rheumatol.* (2003). PMID:12563678
344. **Fraser, A., Fearon, U., Reece, R., Emery, P. & Veale, D. J.** Matrix Metalloproteinase 9, Apoptosis, and Vascular Morphology in Early Arthritis. *Arthritis Rheum.* (2001). doi:10.1002/1529-0131(200109)44:9<2024::AID-ART351>3.0.CO;2-K
345. **Reece, R. J., Cañete, J. D., Parsons, W. J., Emery, P. & Veale, D. J.** Distinct vascular patterns of early synovitis in psoriatic, reactive, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (1999). doi:10.1002/1529-0131(199907)42:7<1481::AID-ANR23>3.0.CO;2-E
346. **Cañete, J. D.** Biopatología de la membrana sinovial en la artritis psoriásica. *Reumatol Clin.* (2012). doi:10.1016/j.reuma.2011.12.006
347. **Veale, D. J. & Fearon, U.** What makes psoriatic and rheumatoid arthritis so different? *RMD Open* (2015). doi:10.1136/rmdopen-2014-000025
348. **O’Rielly, D. D., Jani, M., Rahman, P. & Elder, J. T.** The Genetics of Psoriasis and Psoriatic Arthritis. *J Rheumatol. Suppl.* (2019). doi:10.3899/jrheum.190119
349. **Ritchlin, C. T., Haas-Smith, S. A., Li, P., Hicks, D. G. & Schwarz, E. M.** Mechanisms of TNF- α - and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest.* (2003). doi:10.1172/JCI16069
350. **Baeten, D. et al.** Infiltration of the synovial membrane with macrophage subsets and polymorphonuclear cells reflects global disease activity in spondyloarthropathy. *Arthritis Res Ther.* (2005). doi:10.1186/ar1501
351. **Kruithof, E. et al.** Histological evidence that infliximab treatment leads to downregulation of inflammation and tissue remodelling of the synovial membrane in spondyloarthropathy. *Ann Rheum Dis.* (2005). doi:10.1136/ard.2003.018549
352. **Baeten, D. et al.** Immunomodulatory effects of anti-tumor necrosis factor α therapy on synovium in spondyloarthropathy: Histologic findings in eight patients from an open-label pilot study. *Arthritis Rheum.* (2001). doi:10.1002/1529-0131(200101)44:1<186::AID-ANR25>3.0.CO;2-B
353. **van de Sande, M. G. & Baeten, D. L.** Immunopathology of synovitis: From histology to molecular pathways. *Rheumatology (Oxford)* (2016). doi:10.1093/rheumatology/kev330
354. **Baeten, D. et al.** Macrophages expressing the scavenger receptor CD163: A link between immune alterations of the gut and synovial inflammation in spondyloarthropathy. *J Pathol.* (2002). doi:10.1002/path.1044
355. **Baeten, D. et al.** Diagnostic classification of spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis by synovial histopathology: A prospective study in 154 consecutive patients. *Arthritis Rheum.* (2004). doi:10.1002/art.20476
356. **Helliwell, P. S. & Taylor, W. J.** Classification and diagnostic criteria for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2005). doi:10.1136/ard.2004.032318

357. **Ritchlin, C. T. Kavanaugh, A. Gladman D.D. et al.** Treatment recommendations for psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2009). doi:10.1136/ard.2008.094946
358. **Ogdie, A., Coates, L. C. & Gladman, D. D.** Treatment guidelines in psoriatic arthritis. *Rheumatol. (United Kingdom)* (2021). doi:10.1093/rheumatology/kez383
359. **Gossec, L. et al.** EULAR recommendations for the management of psoriatic arthritis with pharmacological therapies: 2019 update. *Ann Rheum Dis.* (2020). doi:10.1136/annrheumdis-2020-217159
360. **Prevo, M. L. L. et al.** Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (1995). doi:10.1002/art.1780380107
361. **González-Álvarez, I. et al.** Interleukin 15 levels in serum may predict a severe disease course in patients with early arthritis. *PLoS One* (2011). doi:10.1371/journal.pone.0029492
362. **Verpoort, K. N. et al.** Undifferentiated arthritis - Disease course assessed in several inception cohorts. *Clin Exp Rheumatol.* (2004). PMID:15552509
363. **Langmead, B. & Salzberg, S. L.** Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* (2012). doi:10.1038/nmeth.1923
364. **Li, B. & Dewey, C. N.** RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* (2011). doi:10.1186/1471-2105-12-323
365. **Edgar, R., Domrachev, M. & Lash, A. E.** Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.*(2002). doi:10.1093/nar/30.1.207
366. **Subramanian, A. et al.** Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005). doi:10.1073/pnas.0506580102
367. **Fischer, M.** Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* (2017). doi:10.1038/onc.2016.502
368. **Muse, E. D. et al.** Cell-specific discrimination of desmosterol and desmosterol mimetics confers selective regulation of LXR and SREBP in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2018). doi:10.1073/pnas.1714518115
369. **Yarilina, A., Park-Min, K. H., Antoniv, T., Hu, X. & Ivashkiv, L. B.** TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol.* (2008). doi:10.1038/ni1576
370. **Sztefko, K.** Interferences in immunoassay. *Przeegl Lek.* (2002). PMID:12418292
371. **Beaumont, K. A., Munoz, M. A. & Weninger, W.** Mesenchymal cells hold the key to immune cell recruitment to and migration within melanoma. *J Invest Dermatol.* (2013). doi:10.1038/jid.2013.206
372. **Nomura, F. et al.** Cutting Edge: Endotoxin Tolerance in Mouse Peritoneal Macrophages Correlates with Down-Regulation of Surface Toll-Like Receptor 4 Expression. *J Immunol.* (2000). doi:10.4049/jimmunol.164.7.3476
373. **Kagan, J. C. & Medzhitov, R.** Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. *Cell* (2006). doi:10.1016/j.cell.2006.03.047
374. **Wu, Z., Zhang, Z., Lei, Z. & Lei, P.** CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* (2019). doi:10.1016/j.cytogfr.2019.06.003
375. **Bažil, V. et al.** Biochemical characterization of a soluble form of the 53-kDa monocyte surface antigen. *Eur J Immunol.* (1986). doi:10.1002/eji.1830161218
376. **Gutiérrez-Seijo, A. et al.** CCL20/TNF/VEGFA Cytokine Secretory Phenotype of Tumor-Associated Macrophages Is a Negative Prognostic Factor in Cutaneous Melanoma. *Cancers (Basel)* (2021). doi:10.3390/cancers13163943
377. **Barros, M. H. M., Hauck, F., Dreyer, J. H., Kempkes, B. & Niedobitek, G.** Macrophage polarisation: An immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0080908
378. **Kim, J. M. & Kim, H. Y.** Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Korean Med Assoc.* (2010). doi:10.5124/jkma.2010.53.10.853
379. **Humby, F. et al.** Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med.* (2009). doi:10.1371/journal.pmed.0060001
380. **Abud-Mendoza, C., Martínez-Martínez, M., Monsivais-Urenda, A. & Gonzalez- Amaro, R.** Laboratory biomarkers for guiding therapy with methotrexate in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des.* (2014). doi:10.2174/1381612820666140825123632

381. **Blits, M. et al.** Methotrexate normalizes up-regulated folate pathway genes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (2013). doi:10.1002/art.38094
382. **Friedman, B. & Cronstein, B.** Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* (2019). doi:10.1016/j.jbspin.2018.07.004
383. **Nayak, R. R. et al.** Methotrexate impacts conserved pathways in diverse human gut bacteria leading to decreased host immune activation. *Cell Host Microbe* (2021). doi:10.1016/j.chom.2020.12.008
384. **Koizumi, S., Curt, G. A., Fine, R. L., Griffin, J. D. & Chabner, B. A.** Formation of methotrexate polyglutamates in purified myeloid precursor cells from normal human bone marrow. *J Clin Invest.* (1985). doi:10.1172/JCI111761
385. **Grim, J., Chládek, J. & Martínková, J.** Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methotrexate in non-neoplastic diseases. *Clin Pharmacokinet.* (2003). doi:10.2165/00003088-200342020-00003
386. **Olsen, N. J., Spurlock, C. F. 3rd & Aune, T. M.** Methotrexate induces production of IL-1 and IL-6 in the monocytic cell line U937. *Arthritis Res Ther.* (2014). doi:10.1186/ar4444
387. **Wijngaarden, S., van Roon, J. A. G., van de Winkel, J. G. J., Bijlsma, J. W. J. & Lafeber, F. P.** Down-regulation of activating Fcγ receptors on monocytes of patients with rheumatoid arthritis upon methotrexate treatment. *Rheumatology (Oxford)* (2005). doi:10.1093/rheumatology/keh583
388. **Yamamoto, T., Shikano, K., Nanki, T. & Kawai, S.** Folylpolyglutamate synthase is a major determinant of intracellular methotrexate polyglutamates in patients with rheumatoid arthritis. *Sci Rep.* (2016). doi:10.1038/srep35615
389. **Muller, I. B. et al.** Association of altered folylpolyglutamate synthetase pre-mRNA splicing with methotrexate unresponsiveness in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* (2020) doi:10.1093/rheumatology/keaa428.
390. **Qiu, Q. et al.** Polymorphisms and Pharmacogenomics for the Clinical Efficacy of Methotrexate in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep.* (2017). doi:10.1038/srep44015.
391. **Graf, T. & Trumpp, A.** Haematopoietic stem cells, niches and differentiation pathways. *Nat Rev Immunol.* (2007). <https://docs.abcam.com/pdf/stemcells/hsc.pdf>
392. **Morrison, S. J. & Scadden, D. T.** The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature12984
393. **Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. E.** Hematopoiesis: A human perspective. *Cell Stem Cell.* (2012). doi:10.1016/j.stem.2012.01.006
394. **Eberl, G., Colonna, M., Santo, J. P. D. & McKenzie, A. N. J.** Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science* (2015). doi:10.1126/science.aaa6566
395. **Jacobsen, S. E. W. & Nerlov, C.** Haematopoiesis in the era of advanced single-cell technologies. *Nat Cell Biol* (2019). doi:10.1038/s41556-018-0227-8
396. **Christ, A. et al.** Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming. *Cell* (2018). doi:10.1016/j.cell.2017.12.013
397. **Schröder, H.** Methotrexate kinetics in myeloid bone marrow cells and peripheral neutrophils. *Cancer Chemother Pharmacol.* (1987). doi:10.1007/BF00296254
398. **Yona, S. et al.** Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* (2013). doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001
399. **Rackov, G. et al.** P21 mediates macrophage reprogramming through regulation of p50-p50 NF-κB and IFN-β. *J Clin Invest.* (2016). doi:10.1172/JCI83404
400. **Mavers, M. et al.** Cyclin-dependent kinase inhibitor p21, via its C-terminal domain, is essential for resolution of murine inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* (2012). doi:10.1002/art.33311
401. **Trakala, M. et al.** Regulation of macrophage activation and septic shock susceptibility via p21 (WAF1/CIP1). *Eur J Immunol.* (2009). doi:10.1002/eji.200838676
402. **Hamilton, J. A.** Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* (2008). doi:10.1038/nri2356
403. **Yang, T. Y. et al.** Sustained activation of ERK and Cdk2/cyclin-A signaling pathway by pemetrexed leading to S-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Eur J Pharmacol.* (2011). doi:10.1016/j.ejphar.2011.04.057
404. **Momtazi, G., Lambrecht, B. N., Naranjo, J. R. & Schock, B. C.** Regulators of A20 (TNFAIP3): New drug-able targets in inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2019). doi:10.1152/ajplung.00335.2018

405. **Walle, L. Vande et al.** Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13322
406. **Fox, J. T. & Stover, P. J.** Chapter 1 Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. *Vitam Horm* (2008). doi:10.1016/S0083-6729(08)00401-9
407. **Stover, P. J.** Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease. *Nutr Rev* (2004). doi:10.1111/j.1753-4887.2004.tb00070.x
408. **Tello, D. et al.** Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1 α decreases oxygen consumption by inhibiting complex i activity. *Cell Metab.* (2011). doi:10.1016/j.cmet.2011.10.008.
409. **Gosselt, H. R. et al.** Identification of metabolic biomarkers in relation to methotrexate response in early rheumatoid arthritis. *J Pers Med.* (2020). doi:10.3390/jpm10040271
410. **Merad, M. & Martin, J. C.** Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat Rev Immunol.* (2020). doi:10.1038/s41577-020-0331-4
411. **Vega, M. A. et al.** MAFB and MAF Transcription Factors as Macrophage Checkpoints for COVID-19 Severity. *Front Immunol.* (2020). doi:10.3389/fimmu.2020.603507
412. **Diao, B. et al.** Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front. Immunol.* (2020). doi:10.3389/fimmu.2020.00827
413. **Remy, K. E. et al.** Severe immunosuppression and not a cytokine storm characterizes COVID-19 infections. *JCI Insight* (2020). doi:10.1172/jci.insight.140329
414. **Zhang, Y. et al.** SARS-CoV-2 hijacks folate and one-carbon metabolism for viral replication. *Nat Commun.* (2021). doi:10.1038/s41467-021-21903-z
415. **Samaniego, R. 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). doi:10.1189/jlb.0613345
416. **Kim, D. J., Venkataraman, A., Caroline, P., Wiesler, E. P. & Deblasio, M.** Vitamin B12 and folic acid alleviate symptoms of nutritional deficiency by antagonizing aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2020) doi:10.1073/pnas.2006949117.
417. **Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J. & Coumoul, X.** AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochimie Open* (2018). doi:10.1016/j.biopen.2018.05.001
418. **Rothhammer, V. & Quintana, F. J.** The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol* (2019). doi:10.1038/s41577-019-0125-8
419. **Bessede, A. et al.** Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13323
420. **Pugin, J. et al.** CD14 Is a pattern recognition receptor. *Immunity* (1994). doi:10.1016/1074-7613(94)90093-0
421. **Zanoni, I. & Granucci, F.** Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol.* (2013). doi:10.3389/fcimb.2013.00032
422. **Lévêque, M. et al.** Soluble CD14 acts as a DAMP in human macrophages: Origin and involvement in inflammatory cytokine/chemokine production. *FASEB J.* (2017). doi:10.1096/fj.201600772R
423. **Ciesielska, A., Matyjek, M. & Kwiatkowska, K.** TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci* (2021). doi:10.1007/s00018-020-03656-y
424. **Zanoni, I., Tan, Y., Di Gioia, M., Springstead, J. R. & Kagan, J. C.** By Capturing Inflammatory Lipids Released from Dying Cells, the Receptor CD14 Induces Inflammasome-Dependent Phagocyte Hyperactivation. *Immunity* (2017). doi:10.1016/j.immuni.2017.09.010
425. **Chang, M. K. et al.** Apoptotic cells with oxidation-specific epitopes are immunogenic and proinflammatory. *J Exp Med.* (2004). doi:10.1084/jem.20031763
426. **Zanoni, I. et al.** CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* (2011). doi:10.1016/j.cell.2011.09.051
427. **Yaegashi, Y. et al.** Evaluation of a newly identified soluble CD14 subtype as a marker for sepsis. *J Infect Chemother.* (2005). doi:10.1007/s10156-005-0400-4
428. **Lloyd-Jones, K. L., Kelly, M. M. & Kubes, P.** Varying Importance of Soluble and Membrane CD14 in Endothelial Detection of Lipopolysaccharide. *J Immunol.* (2008). doi:10.4049/jimmunol.181.2.1446
429. **Lewis, M. J. et al.** Molecular Portraits of Early Rheumatoid Arthritis Identify Clinical and Treatment Response Phenotypes. *Cell Rep.* (2019). doi:10.1016/j.celrep.2019.07.091
430. **Idzko, M., Ferrari, D. & Eltzschig, H. K.** Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* (2014). doi:10.1038/nature13085

431. **Ichise Y., Saegusa J., Tanaka-Natsui S., Naka I., Hayashi S., Kuroda R. et al.** Soluble CD14 induces pro-inflammatory cytokines in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like synovial cells via Toll-Like receptor 4. *Cells* (2020). doi: 10.3390/cells9071689
432. **Marcos, V. et al.** Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases. *Respir Res.* (2010). doi:10.1186/1465-9921-11-32.
433. **Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R. & Nuñez, G.** The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* (2009). doi:10.1038/ni.1703.
434. **Lin, B., Noring, R., Steere, A. C., Klempner, M. S. & Hu, L. T.** Soluble CD14 Levels in the Serum, Synovial Fluid, and Cerebrospinal Fluid of Patients with Various Stages of Lyme Disease. *J Infect. Dis.* (2000). doi:10.1086/315357.
435. **Nockher, W. A., Wick, M. & Pfister, H. W.** Cerebrospinal fluid levels of soluble CD14 in inflammatory and non-inflammatory diseases of the CNS: Upregulation during bacterial infections and viral meningitis. *J Neuroimmunol.* (1999). doi:10.1016/S0165-5728(99)00141-1.
436. **Gómez-Rial, J. et al.** Increased Serum Levels of sCD14 and sCD163 Indicate a Preponderant Role for Monocytes in COVID-19 Immunopathology. *Front. Immunol.* (2020). doi:10.3389/fimmu.2020.560381
437. **Egerer, K. et al.** Increased serum soluble CD14, ICAM-1 and E-selectin correlate with disease activity and prognosis in systemic lupus erythematosus. *Lupus* (2000) doi:10.1191/096120300678828749.
438. **Smiljanovic, B. et al.** Synovial tissue transcriptomes of long-standing rheumatoid arthritis are dominated by activated macrophages that reflect microbial stimulation. *Sci Rep.* (2020) doi:10.1038/s41598-020-64431-4.
439. **Smiljanovic, B. et al.** Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. *Ann Rheum Dis.* (2018). doi:10.1136/annrheumdis-2017-211649
440. **Martin, T. R. et al.** Endotoxin, endotoxin-binding protein, and soluble CD14 are present in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Chest* (1994). doi:10.1378/chest.105.3.55s
441. **Yu, S. et al.** Pathological significance of elevated soluble CD14 production in rheumatoid arthritis: In the presence of soluble CD14, lipopolysaccharides at low concentrations activate RA synovial fibroblasts. *Rheumatol Int.* (1998). doi: 10.1007/s002960050041
442. **Bas, S., Gauthier, B. R., Spenato, U., Stingelin, S. & Gabay, C.** CD14 Is an Acute-Phase Protein. *J Immunol.* (2004). doi:10.4049/jimmunol.172.7.4470
443. **Kang, M. J. et al.** Urinary proteome profile predictive of disease activity in rheumatoid arthritis. *J Proteome Res.* (2014). doi:10.1021/pr500467d
444. **Alarcón-Vila, C. et al.** CD14 release induced by P2X7 receptor restricts inflammation and increases survival during sepsis. *Elife* (2020). doi:10.7554/eLife.60849
445. **Smolen, J. S. et al.** EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Ann Rheum Dis.* (2014). doi:10.1136/annrheumdis-2013-204573
446. **Teitsma, X. M. et al.** Inadequate response to treat-to-target methotrexate therapy in patients with new-onset rheumatoid arthritis: Development and validation of clinical predictors. *Ann Rheum Dis.* (2018). doi:10.1136/annrheumdis-2018-213035
447. **De Rotte, M. C. F. J. et al.** Development and validation of a prognostic multivariable model to predict insufficient clinical response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *PLoS One* (2018). doi:10.1371/journal.pone.0208534
448. **Sergeant, J. C. et al.** Prediction of primary non-response to methotrexate therapy using demographic, clinical and psychosocial variables: Results from the UK Rheumatoid Arthritis Medication Study (RAMS). *Arthritis Res Ther.* (2018). doi:10.1186/s13075-018-1645-5
449. **Peres, R. S. et al.** Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2015). doi:10.1073/pnas.1424792112
450. **Gupta, V., Katiyar, S., Singh, A., Misra, R. & Aggarwal, A.** CD39 positive regulatory T cell frequency as a biomarker of treatment response to methotrexate in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* (2018). doi:10.1111/1756-185X.13333

451. **Schaer, D. A. et al.** The folate pathway inhibitor pemetrexed pleiotropically enhances effects of cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* (2019). doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0433
452. **Dietrich, J. et al.** Pemetrexed in Recurrent or Progressive Central Nervous System Lymphoma: A Phase I Multicenter Clinical Trial. *Oncologist* (2020).
453. **Karatas, A. et al.** Pemetrexed Ameliorates Experimental Arthritis in Rats. *Inflammation* (2014). doi:10.1007/s10753-014-0002-3
454. **Williams, R. O.** Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis. *Methods Mol Med.* (2004). doi:10.1385/1-59259-771-8:207
455. **Finckh, A., Liang, M. H., Van Herckenrode, C. M. & De Pablo, P.** Long-term impact of early treatment on radiographic progression in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Arthritis Care Res.* (2006). doi:10.1002/art.22353
456. **Hamilton, J. A.** GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* (2002). doi:10.1016/s1471-4906(02)02260-3
457. **Sonderegger, I. et al.** GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J Exp Med.* (2008). doi:10.1084/jem.20071119
458. **Wandel, E., Saalbach, A., Sittig, D., Gebhardt, C. & Aust, G.** Thy-1 (CD90) Is an Interacting Partner for CD97 on Activated Endothelial Cells. *J Immunol.* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1003944
459. **Mizoguchi, F. et al.** Functionally distinct disease-associated fibroblast subsets in rheumatoid arthritis. *Nat Commun.* (2018). doi:10.1038/s41467-018-02892-y
460. **Wade, S. M. et al.** Association of synovial tissue polyfunctional T-cells with DAPSA in psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2018) doi:10.1136/annrheumdis-2018-214138.
461. **Ota, F. et al.** Activin A induces cell proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (2003). doi:10.1002/art.11249
462. **El-Gendi, S. S. et al.** Value of serum and synovial fluid activin A and inhibin A in some rheumatic diseases. *Int J Rheum Dis.* (2010). doi:10.1111/j.1756-185X.2010.01532.x
463. **Dong, F. & He, X.** Activin A: A potential therapeutic target for characterizing and stopping joint pain early in rheumatoid arthritis patients. *Inflammation* (2014). doi:10.1007/s10753-013-9727-7
464. **Phillips, D. J.** Regulation of activin's access to the cell: Why is mother nature such a control freak? *BioEssays* (2000). doi:10.1002/1521-1878(200008)22:8<689::AID-BIES2>3.0.CO;2-5
465. **Lee, K. M., Achuthan, A. A. & Hamilton, J. A.** GM-CSF: A Promising Target in Inflammation and Autoimmunity. *ImmunoTargets Ther.* (2020). doi:10.2147/ITT.S262566
466. **Relloso, M. et al.** DC-SIGN (CD209) Expression Is IL-4 Dependent and Is Negatively Regulated by IFN, TGF- β , and Anti-Inflammatory Agents. *J Immunol.* (2002). doi:10.4049/jimmunol.168.6.2634
467. **Geijtenbeek, T. B. H. et al.** Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* (2000). doi:10.1016/s0092-8674(00)80693-5
468. **Puig-Kröger, A. et al.** 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.* (2004). doi:10.1074/jbc.M311516200.
469. **Zhang, F. et al.** Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol.* (2019). doi:10.1038/s41590-019-0378-1.
470. **Culemann, S. et al.** Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature* (2019). doi:10.1038/s41586-019-1471-1
471. **Kruithof, E. et al.** Immunomodulatory effects of etanercept on peripheral joint synovitis in the spondylarthropathies. *Arthritis Rheum.* (2005). doi:10.1002/art.21426
472. **Cañete, J. D., Celis, R., Hernández, V., Pablos, J. L. & Sanmartí, R.** Synovial immunopathological changes associated with successful abatacept therapy in a case of severe refractory psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis.* (2010). doi:10.1136/ard.2009.113233.

A N E X O S

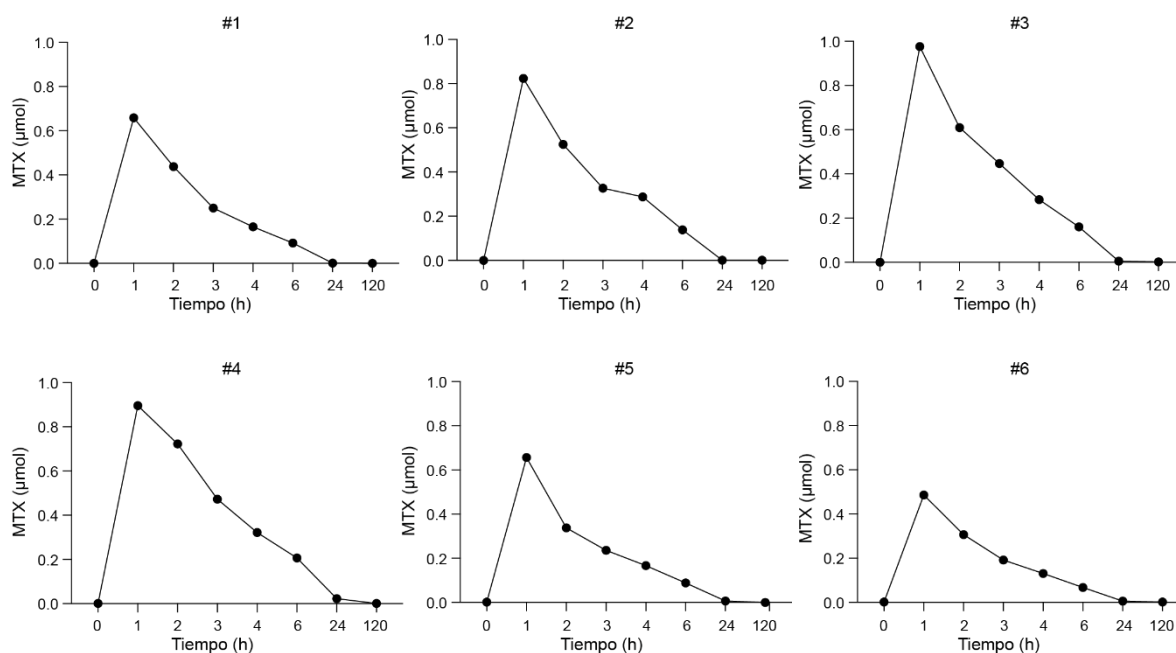


Figura 74. Perfil farmacocinético de MTX en cada uno de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC (#1, 2, 3, 4, 5 y 6). Se indica la concentración plasmática de MTX (μmol) respecto al tiempo (horas) desde la administración.

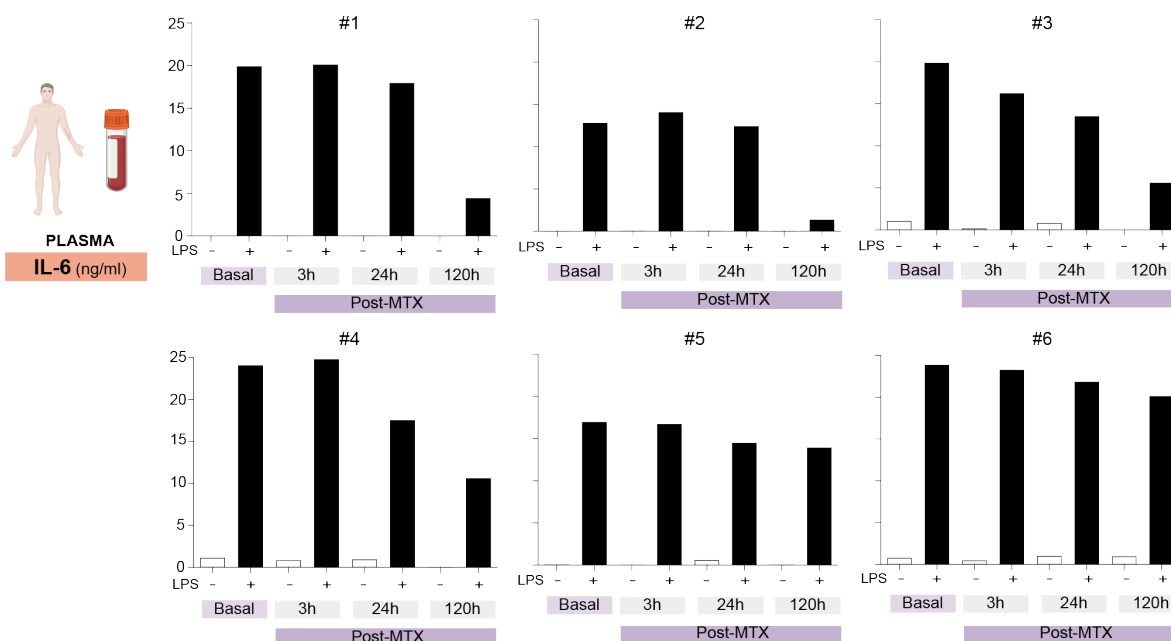


Figura 75. MTX *in vivo* disminuye la expresión de IL-6 en respuesta a LPS en plasma. Expresión de IL-6 (ng/ml) en el plasma de cada uno de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC (#1, 2, 3, 4 y 5) en respuesta (+) o no (-) a LPS (3h) antes (basal) y 3h, 24h y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX.

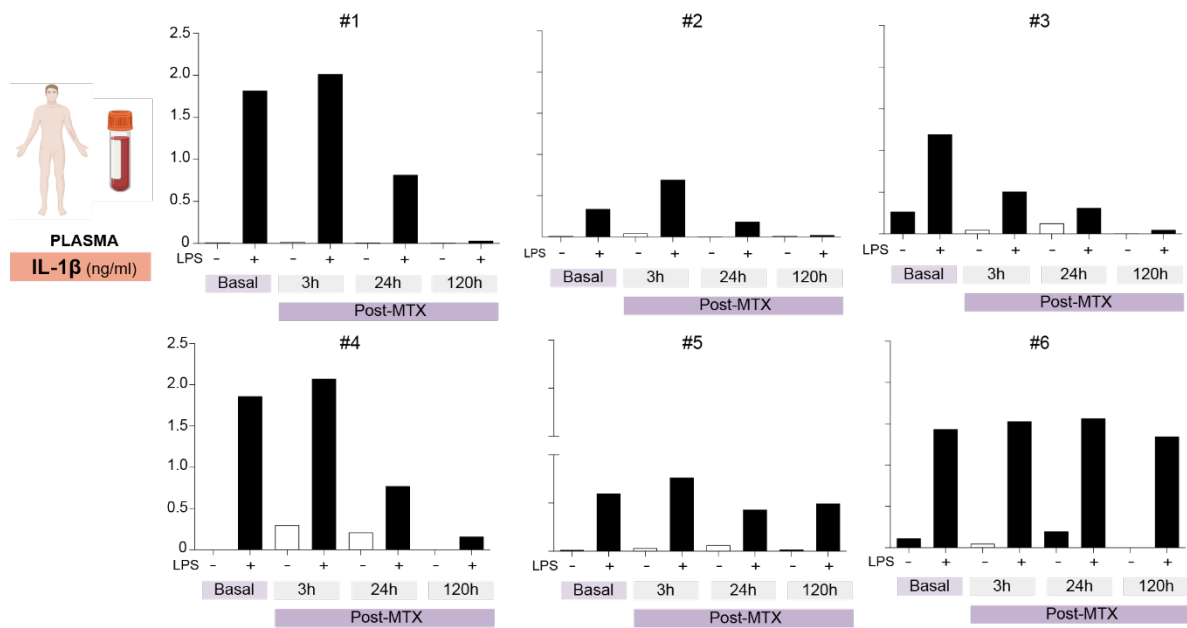


Figura 76. MTX *in vivo* disminuye la expresión de IL-1β en respuesta a LPS en plasma. Expresión de IL-1β (ng/ml) en el plasma de cada uno de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC (#1, 2, 3, 4 y 5) en respuesta (+) o no (-) a LPS (3h) antes (basal) y 3h, 24h y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX.

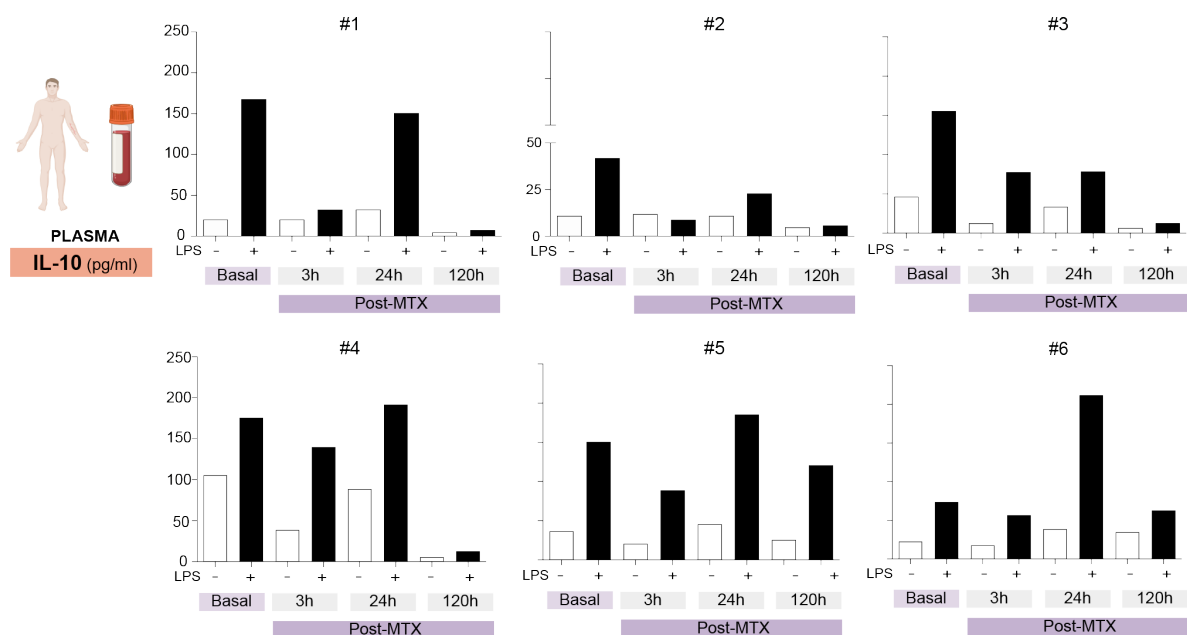


Figura 77. MTX *in vivo* disminuye la expresión de IL-10 en respuesta a LPS en plasma. Expresión de IL-10 (pg/ml) en el plasma de cada uno de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC (#1, 2, 3, 4 y 5) en respuesta (+) o no (-) a LPS (3h) antes (basal) y 3h, 24h y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX.

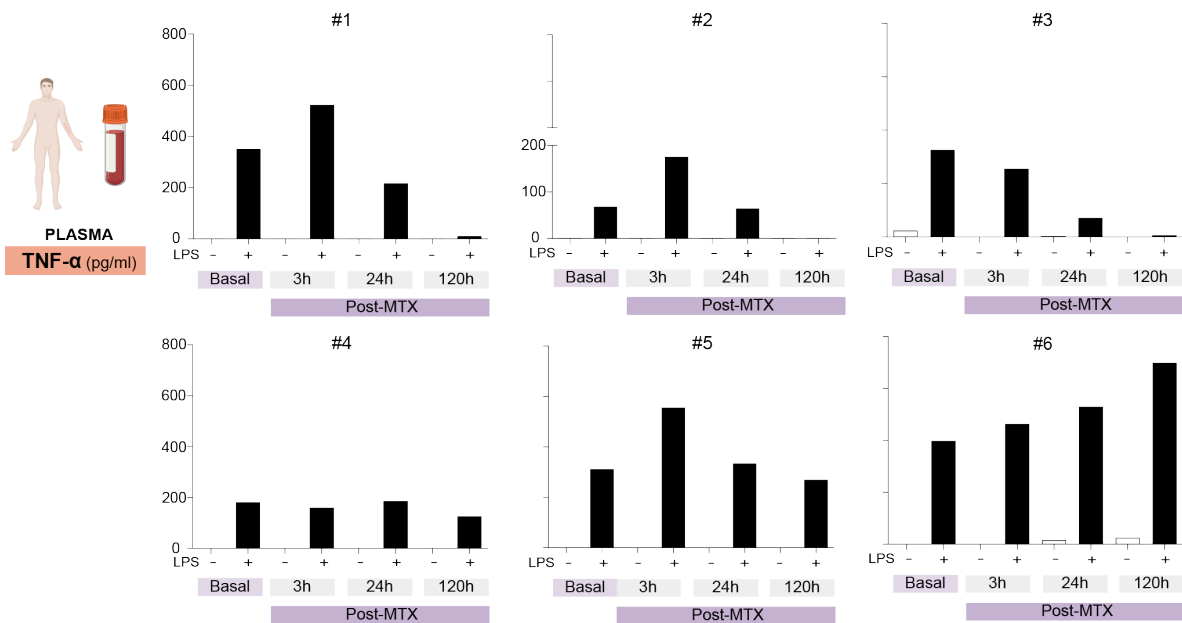


Figura 78. MTX *in vivo* disminuye la expresión de TNF- α en respuesta a LPS en plasma. Expresión de TNF- α (pg/ml) en el plasma de cada uno de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC (#1, 2, 3, 4 y 5) en respuesta (+) o no (-) a LPS (3h) antes (basal) y 3h, 24h y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX.

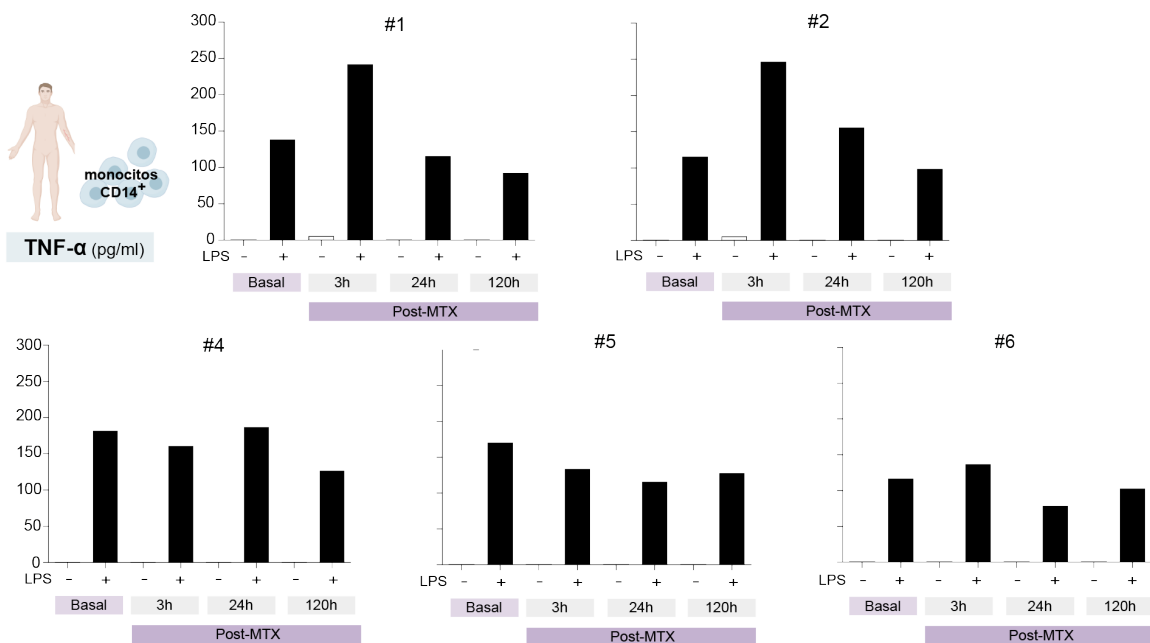


Figura 79. MTX *in vivo* disminuye la producción de TNF- α en respuesta a LPS en monocitos. Expresión de TNF- α (pg/ml) en monocitos de cada uno de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC (#1, 2, 3, 4 y 5) en respuesta (+) o no (-) a LPS (3h) antes (basal) y 3h, 24h y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX.

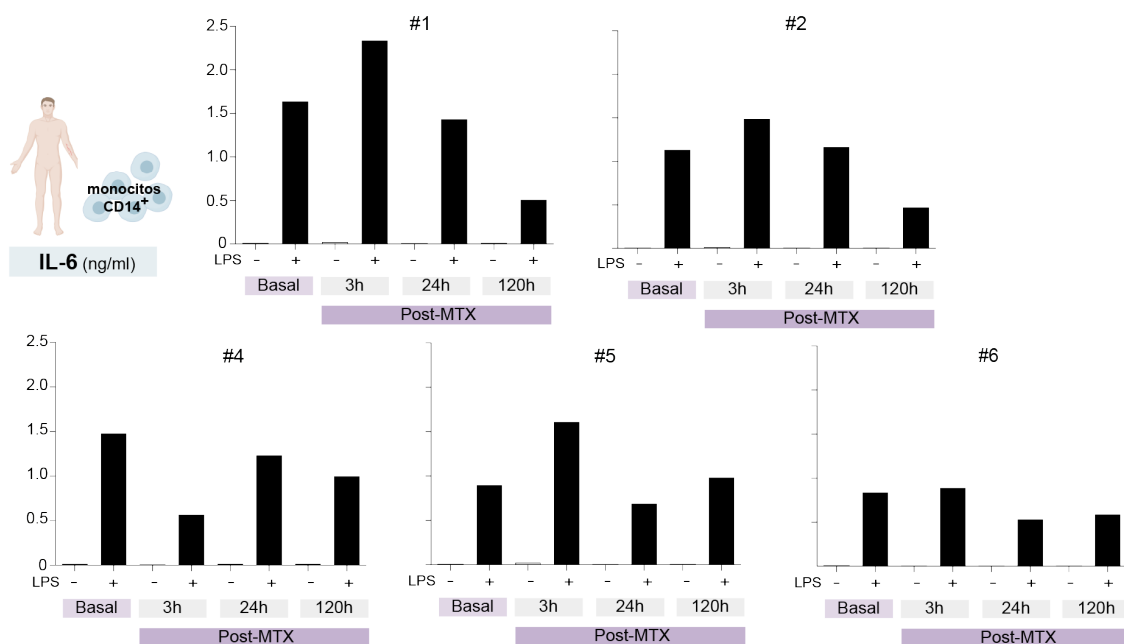


Figura 80. MTX *in vivo* no modifica la expresión de IL-6 en monocitos. Expresión de IL-6 (ng/ml) en monocitos de cada uno de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC (#1, 2, 3, 4 y 5) en respuesta (+) o no (-) a LPS (3h) antes (basal) y 3h, 24h y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX.

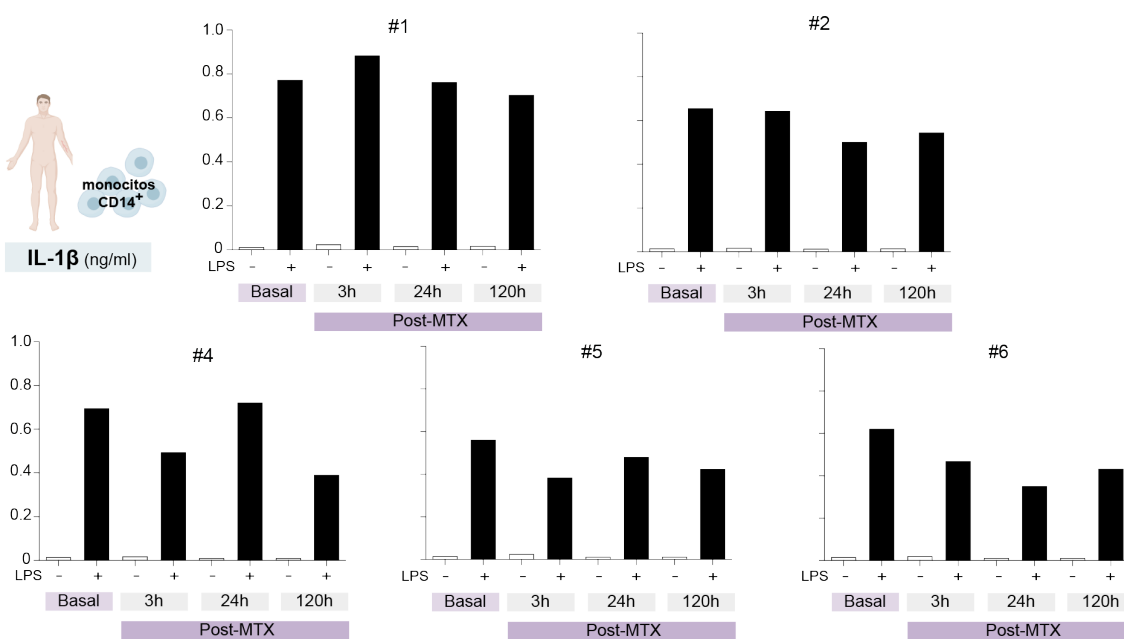


Figura 81. MTX *in vivo* no modifica la expresión de IL-1 β en monocitos. Expresión de IL-1 β (ng/ml) en monocitos de cada uno de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC (#1, 2, 3, 4 y 5) en respuesta (+) o no (-) a LPS (3h) antes (basal) y 3h, 24h y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX.

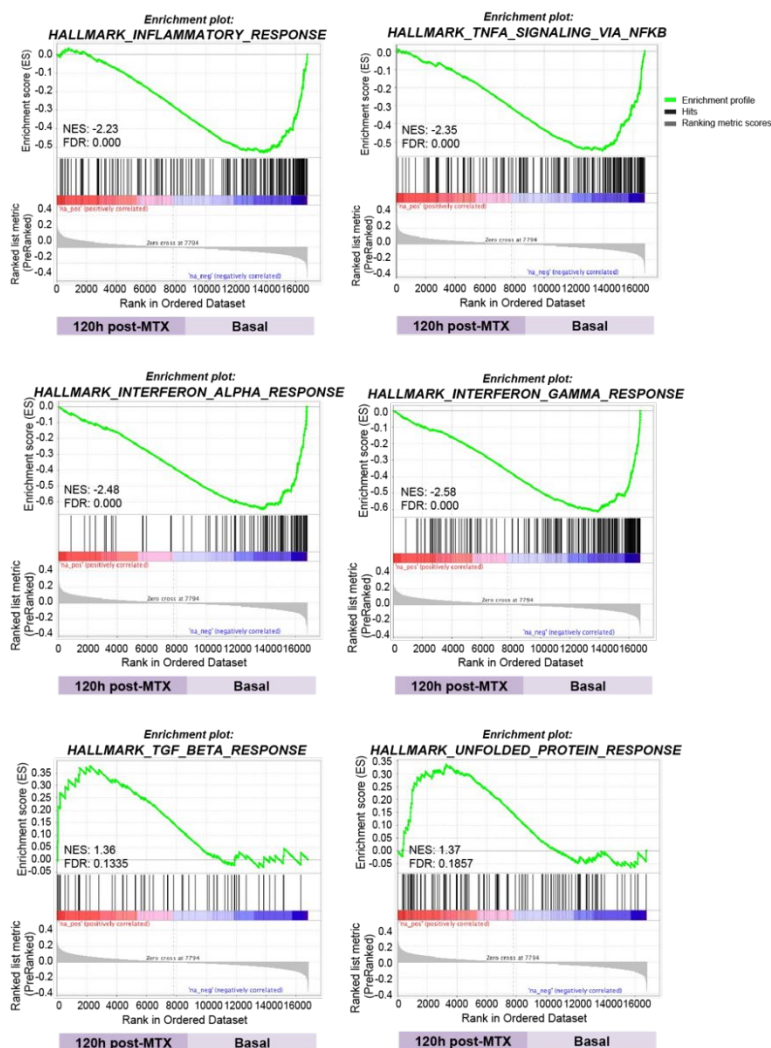


Figura 82. MTX *in vivo* promueve la adquisición de un perfil transcripcional menos proinflamatorio y más profibrótico en monocitos. Análisis de GSEA de genes obtenidos de la lista ranqueada (ordenadas por \log_2FC) del análisis *limma* de monocitos 120h Post-MTX vs. monocitos a nivel basal de los sujetos del Ensayo Clínico METOMAC en los conjuntos de genes indicados. Se indican los valores de NES (Normalized Enrichment Score) y FDR (False Discovery Rate). El perfil de enriquecimiento se muestra en verde.

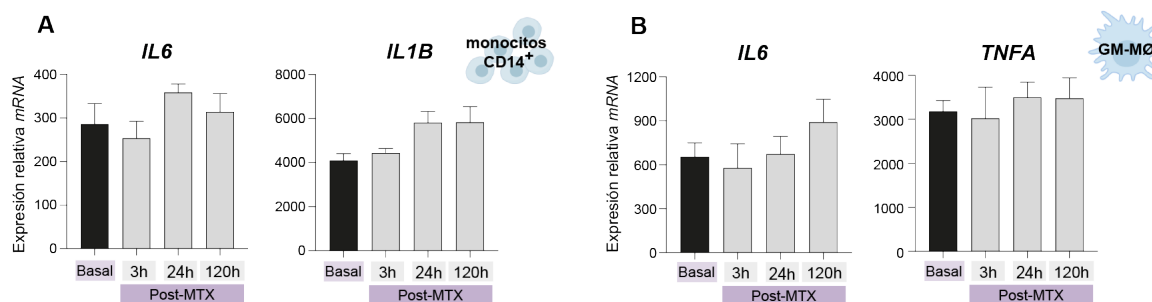


Figura 83. Expresión de *IL6*, *IL1B* y *TNFA* en monocitos y GM-MØ del Ensayo Clínico METOMAC. Expresión relativa de la *mRNA* de *IL6*, *IL1B* y *TNFA* determinada mediante RT-qPCR en monocitos CD14⁺ y GM-MØ de los seis sujetos del estudio antes (basal) y 3, 24 y 120h después (Post-MTX) de la toma de MTX. Los resultados se muestran como la expresión relativa, que indica la detección de cada *mRNA* en cada muestra en relación con la expresión del gen de referencia *TBP*. Se indica la media \pm SEM de los seis donantes independientes.

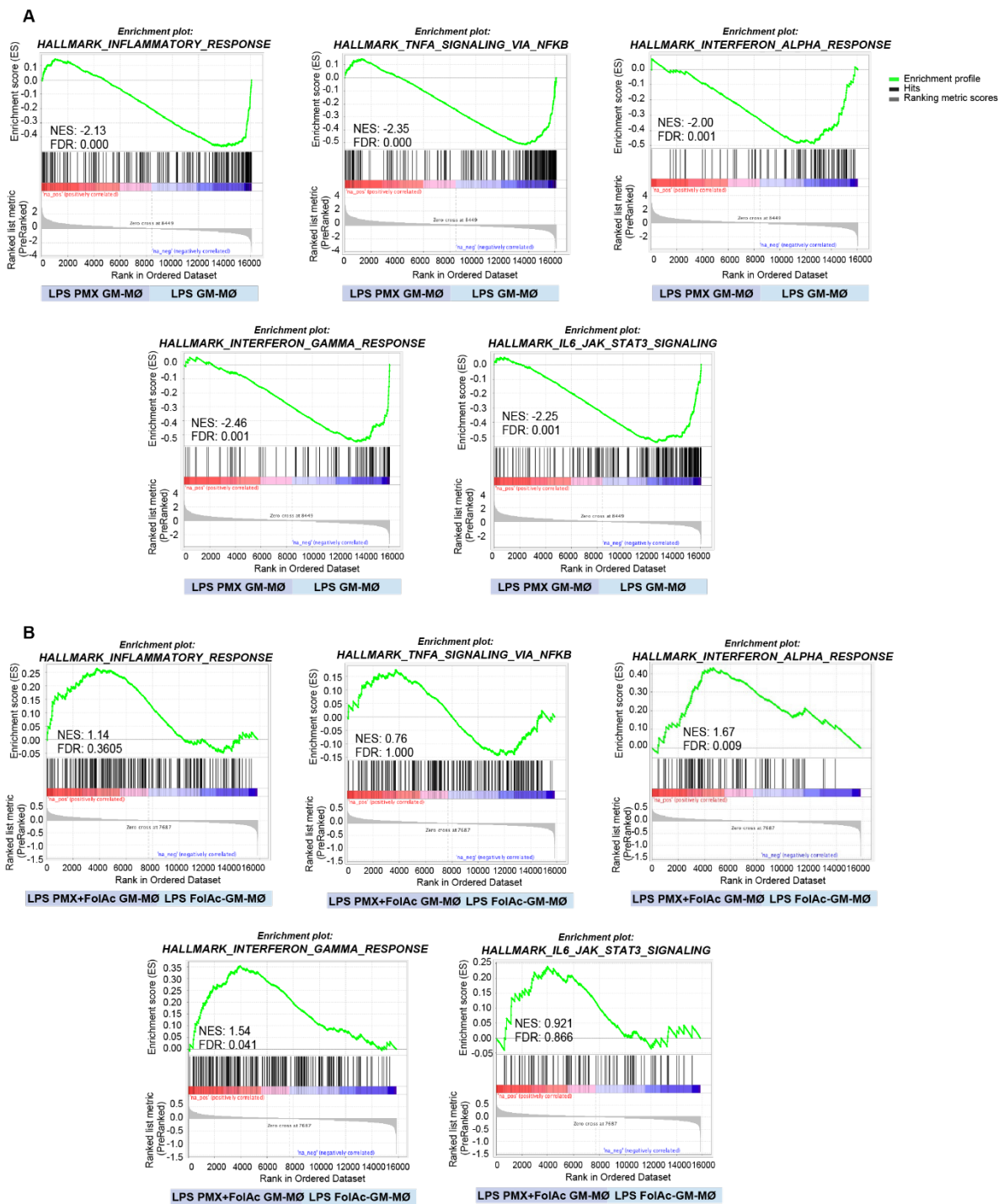


Figura 84. PMX promueve un estado de tolerancia transcripcional a LPS en GM-MØ mediado por el bloqueo del metabolismo de un carbono. (A, B) Análisis de GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) de genes obtenidos de la lista ranqueada (ordenados por log₂FC) del análisis limma de LPS PMX-GM-MØ frente a LPS GM-MØ (A) y LPS PMX+FolAc-GM-MØ frente a LPS FolAc-GM-MØ (B) tras 3h de estimulación con LPS en los conjuntos de genes indicados. Se indican los valores de NES (Normalized Enrichment Score) y FDR (False Discovery Rate). El perfil de enriquecimiento se muestra en verde.

PUBLICACIONES OBTENIDAS DURANTE LA TESIS DOCTORAL

Publicaciones señaladas con * forman el núcleo de la Tesis

Municio C, Domínguez-Soto Á, **Fuentelsaz-Romero S**, Lamana A, Montes N, Cuevas VD, Campos RG, Pablos JL, González-Álvaro I, Puig-Kröger A. Methotrexate limits inflammation through an A20-dependent cross-tolerance mechanism. *Annals of the Rheumatic Diseases*, May 2018. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-212537

Estrada-Capetillo L, Aragonese-Fenoll L, Domínguez-Soto Á, **Fuentelsaz-Romero S**, Nieto C, Simón-Fuentes M, Alonso B, Portolés P, Corbí AL, Rojo JM, Puig-Kröger A. CD28 is expressed by macrophages with anti-inflammatory potential and limits their T-cell activating capacity. *European Journal of Immunology*, Nov 2020. doi: 10.1002/eji.202048806

* **Fuentelsaz-Romero S**, Cuervo A, Estrada-Capetillo L, Celis R, García-Campos R, Ramírez J, Sastre S, Samaniego R, Puig-Kröger A, D Cañete J. GM-CSF Expression and Macrophage Polarization in Joints of Undifferentiated Arthritis Patients Evolving to Rheumatoid Arthritis or Psoriatic Arthritis. *Frontiers in Immunology*, Feb 2021. doi: 10.3389/fimmu.2020.613975

* **Fuentelsaz-Romero S**, Barrio-Alonso C, García-Campos R, Torres-Torresano M, Muller I, Ana Triguero-Martínez A, Nuño L, Villalba A, García-Vicuña R, Jansen G, Miranda-Carús ME, González-Álvaro I and Puig-Kröger A. Macrophage Reprogramming Ability of Antifolates Reveals Soluble CD14 as a Potential Biomarker for Methotrexate Response in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Immunology*, Nov 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.776879



OPEN ACCESS

GM-CSF Expression and Macrophage Polarization in Joints of Undifferentiated Arthritis Patients Evolving to Rheumatoid Arthritis or Psoriatic Arthritis

Edited by:

Philippe Saas,
INSERM U1098 Interactions Hôte-Greffon-Tumeur & Ingénierie Cellulaire et Génique, France

Reviewed by:

Richard Pope,
Northwestern University,
United States
Gerrit Jansen,
Amsterdam University Medical Center
(UMC), Netherlands

***Correspondence:**

Amaya Puig-Kröger
amaya.puig@iisgm.com
Juan D. Cañete
jcanete@clinic.cat

†Present address:

Lizbeth Estrada-Capetillo,
Laboratorio de Farmacología e
inflamación, Instituto de Ciencias
Biomédicas, Universidad Autónoma
de Ciudad Juárez, Chihuahua, México

‡These authors share first authorship

§These authors share senior
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Autoimmune and
Autoinflammatory Disorders,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 04 October 2020

Accepted: 31 December 2020

Published: 17 February 2021

Citation:

Fuentelsaz-Romero S, Cuervo A,
Estrada-Capetillo L, Celis R,
García-Campos R, Ramírez J,
Sastre S, Samaniego R, Puig-Kröger A
and Cañete JD (2021) GM-CSF
Expression and Macrophage
Polarization in Joints of
Undifferentiated Arthritis Patients
Evolving to Rheumatoid
Arthritis or Psoriatic Arthritis.
Front. Immunol. 11:613975.
doi: 10.3389/fimmu.2020.613975

Sara Fuentelsaz-Romero^{1‡}, Andrea Cuervo^{2‡}, Lizbeth Estrada-Capetillo^{1†}, Raquel Celis², Raquel García-Campos¹, Julio Ramírez², Sergi Sastre³, Rafael Samaniego⁴, Amaya Puig-Kröger^{1*§} and Juan D. Cañete^{2*§}

¹ Unidad de Inmuno-Metabolismo e Inflamación, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, ² Unidad de Artritis, Servicio de Reumatología, Hospital Clínic and IDIBAPS, Barcelona, Spain, ³ Sección de Artroscopia, Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Hospital Clínic, Barcelona, Spain, ⁴ Unidad de Microscopía Confocal, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón (IISGM), Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

Background and Aims: GM-CSF-dependent macrophage polarization has been demonstrated in rheumatoid arthritis (RA). Our aim was to seek diagnostic/prognostic biomarkers for undifferentiated arthritis (UA) by analyzing GM-CSF expression and source, macrophage polarization and density in joints of patients with UA evolving to RA or PsA compared with established RA or PsA, respectively.

Methods: Synovial tissue (ST) from patients with UA evolving to RA (UA>RA, n=8), PsA (UA>PsA, n=9), persistent UA (UA, n=16), established RA (n=12) and PsA (n=10), and healthy controls (n=6), were analyzed. Cell source and quantitative expression of GM-CSF and proteins associated with pro-inflammatory (GM-CSF-driven) and anti-inflammatory (M-CSF-driven) macrophage polarization (activin A, TNF α , MMP12, and CD209, respectively) were assessed in ST CD163⁺ macrophages by multicolor immunofluorescence. GM-CSF and activin A levels were also quantified in paired synovial fluid samples. CD163⁺ macrophage density was determined in all groups by immunofluorescence.

Results: Synovial stromal cells (FAP⁺ CD90⁺ fibroblast, CD90⁺ endothelial cells) and CD163⁺ sublining macrophages were the sources of GM-CSF. ST CD163⁺ macrophages from all groups expressed pro-inflammatory polarization markers (activin A, TNF α , and MMP12). Expression of the M-CSF-dependent anti-inflammatory marker CD209 identified two macrophage subsets (CD163⁺ CD209^{high} and CD163⁺ CD209^{low/-}). CD209⁺ macrophages were more abundant in ST from healthy controls and PsA patients, although both macrophage subtypes showed similar levels of pro-inflammatory markers in all groups. In paired synovial fluid samples, activin A was detected in all patients, with higher levels in UA>RA and RA, while GM-CSF was infrequently detected.

ST CD163⁺ macrophage density was comparable between UA>RA and UA>PsA patients, but significantly higher than in persistent UA.

Conclusions: GM-CSF is highly expressed by sublining CD90⁺ FAP⁺ synovial fibroblasts, CD90⁺ activated endothelium and CD163⁺ macrophages in different types of arthritis. The polarization state of ST macrophages was similar in all UA and established arthritis groups, with a predominance of pro-inflammatory GM-CSF-associated markers. CD163⁺ macrophage density was significantly higher in the UA phases of RA and PsA compared with persistent UA. Taken together, our findings support the idea that GM-CSF is a strong driver of macrophage polarization and a potential therapeutic target not only in RA but also in PsA and all types of UA.

Keywords: GM-CSF, macrophages, synovial tissue, undifferentiated arthritis, psoriatic arthritis, rheumatoid arthritis

INTRODUCTION

Undifferentiated arthritis (UA) is frequent in early arthritis clinics, with a prevalence of 30%–50% (1–3). After 1 year of follow up, approximately 30% of patients progress to rheumatoid arthritis (RA) and 7%–15% to peripheral spondyloarthritis (pSpA), mainly to psoriatic arthritis (PsA) (4). SpA is a concept encompassing a group of musculoskeletal inflammatory diseases (axial spondyloarthritis, peripheral SpA, PsA, reactive arthritis, arthritis associated with inflammatory bowel disease) sharing immunogenetic, clinical, and radiographic characteristics. PsA is the most prevalent peripheral SpA and is characterized by skin and musculoskeletal inflammation (arthritis, enthesitis, dactylitis, and spondylitis) (5, 6).

RA and peripheral PsA are chronic inflammatory diseases mediated by the immune system and, although joint damage may be early and frequent in both diseases if not treated, their pathogenesis may be different regarding the relative implication of the adaptive and innate immune systems in each of them. This is illustrated by therapies that are useful in treating RA (anti-CD20, rituximab; CTL4-IgG, abatacept; anti-IL6 R, tocilizumab) but not PsA. Inversely, therapies inhibiting the IL-17/IL-23 pathway are successful in treating PsA, but do not work in RA patients (7).

The search for biomarkers enabling early classification of UA patients, earlier treatment and better outcomes has recently increased interest in the study of inflamed synovial tissue (ST) or synovitis, the primary target of inflammatory joint diseases (8).

Abbreviations: ACPA, Anti-Citrullinated Protein Antibodies; a.u., Arbitrary units; csDMARD, Conventional Synthetic Disease-Modifying Antirheumatic Drug; CRP, C-Reactive Protein; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DMARDs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs; ESR, Erythrocyte Sedimentation Rate; FAP, Fibroblast Activation Protein; GM-CSF, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor; GM-CSFR, Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Receptor Low-Affinity Subunit; INHBA, Inhibin Subunit Beta A; MFI, Mean Fluorescence Intensity; MMP12, Matrix Metalloproteinase 12; PsA, Psoriatic Arthritis; RA, Rheumatoid Arthritis; RF, Rheumatoid Factor; SEM, Standard Error of Mean; SF, Synovial Fluid; SJC, Swollen Joint Count; SL, Sublining; SpA, Spondyloarthropathy; ST, Synovial Tissue; TJC, Tender Joint Count; TNF α , Tumor Necrosis Factor Alpha; UA, Undifferentiated Arthritis; UA>RA, UA evolving to RA after follow-up; UA>PsA, UA evolving to PsA after follow-up.

Synovitis in RA and PsA, the two most-frequent definite diagnoses in UA, share multiple similarities in the composition and structural distribution of their cellular infiltrates (9). CD68⁺ macrophages accumulate in the synovium of RA and PsA joints, where they show destructive and remodeling potential and contribute considerably to joint inflammation and damage (10, 11). In fact, RA and PsA macrophage density correlates with disease activity (12, 13). Sublining CD68⁺ macrophage density has been shown to be similar in PsA and RA synovitis (14) although, in a small study we found that CD68⁺ macrophage density was associated with erosive disease only in RA, suggesting that the destructive potential of ST CD68⁺ macrophages may differ between RA and PsA (15).

Studies have analyzed macrophage subsets in chronic arthritis with differing results, probably due to the markers used. Hemoglobin/haptoglobin scavenger receptor CD163-positivity was proposed as a biomarker of anti-inflammatory macrophages and was overexpressed in peripheral SpA, including PsA synovitis, whereas overexpression of pro-inflammatory macrophage markers was found in RA (16). By using surface markers (CD14, CD163, CD68, CD32, CD64, CD200R, CD80) on ST macrophages from RA and PsA patients, that study found a mixed M1-proinflammatory/M2-anti-inflammatory macrophage phenotype, with M1 predominance in RA and IL-10-expressing macrophages in SpA, including PsA (16). More recently, by using single cell technologies, Zhang et al. identified the profile of cell populations that drive joint inflammation in RA and found transcriptional heterogeneity in the synovial myeloid population (17). The function of synovial macrophages during joint homeostasis and inflammation has been also studied. Murine Trem2⁺ lining macrophages constantly repopulate from proliferating tissue resident interstitial macrophages and form a protective epithelial-like barrier that disintegrates during experimental arthritis (18). These macrophages are comparable with human TREM2⁺ lining macrophages, that exhibit anti-inflammatory and repair responses during remission in RA (19). Finally, Kuo et al. showed that sublining HBEGF⁺ inflammatory macrophages promoted fibroblast invasiveness in an epidermal growth factor receptor-dependent manner and contributes to fibroblast-mediated joint destruction (20).

The molecular characterization of GM-CSF-dependent (pro-inflammatory) and M-CSF-driven (anti-inflammatory) monocyte-derived macrophages (21–23) has allowed the definition of the polarization state of macrophages in RA. Specifically, CD163⁺ RA ST macrophages have a high expression of GM-CSF-associated markers (MMP12, EGLN3, INHBA, TNF α , and CCR2) but low levels of the M-CSF-associated marker CD209 (21–23). Given the putative pathological role of GM-CSF and M-CSF in synovitis (24–26), our aims were to seek diagnostic/prognostic biomarkers by analyzing potential differences in GM-CSF expression and its cellular source, and CD163⁺ macrophage polarization and density in joints of patients with UA evolving to RA or PsA compared with persistent UA and established RA or PsA, respectively.

METHODS

Patients

Patients with UA and synovial biopsies were retrospectively selected when they met the classification criteria for RA or PsA during follow up. Synovial biopsies obtained by rheumatologic arthroscopy (9) from inflamed knee joints of patients with active persistent UA synovitis (UA, n=16), UA evolving to RA (UA>RA, n=8), and UA evolving to PsA (UA>PsA, n=9), together with synovial biopsies from patients fulfilling the American College of Rheumatology (ACR) criteria for RA (27) (n=12) or the CASPAR criteria for PsA (28) (n=10) as positive controls, were included. ST from six healthy controls (four men, two women, aged 36 \pm 5 years) undergoing arthroscopic meniscectomy, were included. No patient had received biological therapy at biopsy. Arthroscopy was performed under diagnostic and/or therapeutic (lavage) indications with a 2.7 mm arthroscope (Storz, Tullingen, Germany). Eight samples were obtained from the suprapatellar pouch and the medial and lateral gutters in each patient (9). The study was approved by the Ethics Research Committee of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain (HCB/2014/0579) and signed informed consent was obtained from each patient.

Immunofluorescence and Multicolor Confocal Microscopy

Multicolor confocal microscopy was performed as previously described (21, 29, 30). Briefly, the following antibodies were used: FITC-labelled anti-CD163 (Ber-Mac3, MBL International Corp., MA, USA), anti-M-CSFR/CD115 (AF329, R&D Systems), anti-TNF α (ab6671, Abcam), anti-MMP12 (ab66157, Abcam), anti-INHBA (ab97705, Abcam), anti-CD209 (MR1; kindly provided by Angel L. Corbí, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain), anti-CD90 (E510, BD Pharmingen), anti-FAP (ab65398, Abcam), anti-GM-CSF (sc-13101, Santa Cruz Biotechnology), anti-CD3 (SK7), and anti-CD4 (SK3), from BD Biosciences, isotype-matched control antibodies, and fluorochrome-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch). Tissues samples 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 using an inverted confocal microscope (SPE, Leica Microsystems) and an ACS-APO 20x/NA 0.60 glycerol immersion objective. Similar acquisition settings were used for all samples. Considering that fluorescence intensity correlated with molecules on the surface of the cell, the mean number of molecules of every single cell (Mean Fluorescence Intensity, MFI) was calculated using ImageJ/FIJI software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). All quantifications were blinded and at least three random fields 50 μ m from the lining layer were evaluated for each type of tissue, quantifying the expression of activin A, TNF- α , MMP12, and CD209 in all segmented CD163⁺ macrophages. CD115 and/or CD163 macrophage pan-markers were used to segment these cells in tissues and estimate the mean intensity of the proteins of interest. Pan-markers were intentionally acquired in saturated conditions to better depict macrophage areas. Macrophage density was normalized based on the selected tissue area (mm²). After background subtraction, data were plotted using GraphPad software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Immunohistochemistry for Pathotype Definition of Synovial Tissue

The synovial biopsies were embedded in paraffin, sectioned, and subjected to antigen retrieval by cooking when required. The slides were subsequently stained with an automated immunostainer (TechMate 500 Plus; Dako, Cambridge, UK) using the following monoclonal antibodies: anti-CD3 (clone PS1; Novocastra, Newcastle, UK), anti-CD20 (clone L26; Dako), anti-CD68 (clone KP-1; Dako), and anti-CD138 (clone B-B4; Santa Cruz Biotechnology, Inc., San Diego, CA, USA). As a negative control, the primary antibodies were substituted by isotype- and concentration-matched control antibodies. The primary antibodies were subsequently detected by an avidin-biotin-peroxidase-based method (Envision System; Dako) and an aminoethylcarbazole color reaction (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) as described previously in detail (9). Finally, the slides were counterstained with hematoxylin. The stained slides were scored by digital image analysis by an independent observer (RC) who was blinded to diagnosis and clinical data. Each stained slide in its entirety was scored by dividing it in different regions. Within each region, the number of stained cells per area as well as the percentage of stained cells were measured in at least 20 high-power fields using the AnalySIS[®] Imaging processing program (Olympus[®]) as described previously in detail (9).

Macrophage Culture

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from buffy coats from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma) gradient. Monocytes were purified from PBMC by magnetic cell sorting using CD14 microbeads (Miltenyi Biotech). Monocytes were cultured at 0.5 \times 10⁶ cells/ml for 7 days in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, and containing GM-CSF (1000 U/ml) to generate

GM-CSF-polarized macrophages (termed GM-MØ), or M-CSF (10 ng/ml) for M-CSF-polarized macrophages (termed M-MØ). Cytokines were added every 2 days.

Flow Cytometry

Phenotypic analysis was carried out by immunofluorescence using standard procedures. Mouse monoclonal antibodies used for cell-surface staining included FITC-labeled anti-CD14 (Miltenyi), anti-CD115 (R&D Systems) and FITC-labeled anti-CD163 (MBL International Corp., MA). Alexa Fluor-647-labeled isotype-matched secondary antibody (Jackson ImmunoResearch) was used to stain anti-CD115. Control γ_1 FITC/ γ_{2a} PE (BD) was included as a negative control.

Quantitative Real Time RT-PCR and GSEA

Total RNA was retrotranscribed and cDNA was quantified using the Universal Human Probe Roche library (Roche Diagnostics). Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed on a LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics). Assays were made in triplicate and results normalized according to the expression levels of TBP. The results were obtained using the $\Delta\Delta CT$ method for quantitation. The oligonucleotides used to quantify mRNA transcripts were (5'-3'): CD209s cagagtgggggacatgagtgac; CD209as gtgaagttctgctacgaggag; INHBAs ctggagatcatcactgtt; INHBAs ccttgaaatctcgaagtgc; MMP12s tgtcactaccgtgggaa ataag; MMP12as aacctgtgctctctctcag; TBPs cggctgttaac ttgcctt; TBPas cacacgccaagaacagtg; TNF α s cagcctctctct ctctgat; TNF α as gccagaggctgattagaga. For Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) (31), the gene signature from RA synovial macrophages versus monocyte-derived macrophages limma analysis of the microarray data in GSE10500 was used (31). The previously defined GM-MØ-specific markers data set (from GSE68061) was used for GSEA (32).

ELISA

GM-CSF (Human GM-CSF ELISA MAX Deluxe, BioLegend) and activin A (Human Activin A DuoSet ELISA, R&D Systems) were quantified using commercially-available ELISA.

Statistical Analysis

The Mann Whitney test and Student's *t* test were used and Spearman's correlation was determined. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$). The analysis was made using GraphPad Prism software.

RESULTS

Clinical and Demographic Features

Clinical, demographic and serologic data of the patients included are detailed in **Table 1**. UA>RA patients had significantly fewer swollen and tender joints, and a lower DAS28, than established RA patients. UA>PsA patients were significantly younger than those with established PsA. No significant between-group differences were found regarding systemic inflammation biomarkers. Some patients were taking csDMARDs, mostly methotrexate, at arthroscopy. A high percentage of patients did not receive csDMARDs, due to knee involvement or because they had few inflamed joints, which were treated with NSAIDs or local infiltration with glucocorticoids before 3 months before arthroscopy. No patient was treated with biological therapy before arthroscopy.

Synovial Tissue Stromal Cells and CD163⁺ Macrophages Are the Main Source of GM-CSF in Undifferentiated and Established Arthritis

To assess GM-CSF levels in the undifferentiated phases of human arthritis, we first determined GM-CSF expression in the ST

TABLE 1 | Clinical, demographic and serologic data.

| | UA | UA>RA | UA>PsA | RA | PsA | UA>RA vs UA>PsA | UA>RA vs RA | UA>PsA vs PsA |
|---|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------|-------------|---------------|
| | n=16 | n= 8 | n= 9 | n= 12 | n=10 | p | p | p |
| Age (years) | 57 (40-65) | 56 (42-71) | 44 (35-49) | 58 (52-71) | 53 (48-62) | 0.102 | 0.643 | 0.024 |
| Sex (male) n (%) | 5 (31) | 3 (38) | 5 (56) | 3 (25) | 8 (80) | 0.457 | 0.550 | 0.252 |
| Disease duration until synovial biopsy (months) | 30 (21-37) | 13 (6-51) | 6 (3-30) | 104 (73-202) | 129 (45-265) | 0.289 | 0.002 | 0.003 |
| Follow-up until definite diagnosis (months) | 32 (11-59)* | 1 (0.5-7) | 1 (0.5-2) | NA | NA | 0.847 | NA | NA |
| Disease duration (months) | 60 (36-97) | 34 (7-57) | 6 (4-36) | 28 (10-82) | 25 (12-56) | 0.177 | 0.671 | 0.060 |
| SJC | 1 (1-2) | 2 (1-9) | 1 (1-2) | 11 (4-19) | 1 (1-1) | 0.141 | 0.033 | 0.850 |
| TJC | 1 (1-2) | 3 (2-5) | 1 (1-2) | 19 (4-25) | 1 (1-1) | 0.009 | 0.015 | 0.633 |
| CRP basal (mg/dl) | 1.34 (0.57-2.53) | 2.46 (0.51-3.12) | 1.70 (0.39-8.23) | 4.45 (1.20-10.10) | 3.55 (0.64-7.87) | 0.630 | 0.117 | 0.744 |
| ESR basal (mm/h) | 17 (7-32) | 34 (20-67) | 30 (12-40) | 49 (22-69) | 8 (5-41) | 0.499 | 0.589 | 0.204 |
| DAS28 basal (VSG) | 3.34 (2.68-3.82) | 4.40 (3.43-5.39) | 3.73 (2.85-4.17) | 5.84 (4.88-7.59) | 3.13 (2.27-4.24) | 0.102 | 0.039 | 0.391 |
| RF and/or ACPA n (%) | 0 | 4 (50) | 0 | 9 (75) | 0 | 0.006 | 0.710 | - |
| csDMARD n (%) | 7 (44) | 2 (25) | 6 (67) | 6 (50) | 2 (20) | 0.205 | 0.667 | 0.040 |

Data are expressed as median (interquartile range). Mann Whitney test, T student.

UA, Undifferentiated Arthritis; UA>RA, Undifferentiated Arthritis evolving to RA; UA>PsA, Undifferentiated Arthritis evolving to PsA; RA, Rheumatoid Arthritis; PsA, Psoriatic Arthritis; SJC, Swollen Joint Count; TJC, Tender Joint Count; CRP, C-Reactive Protein; ESR, Erythrocyte Sedimentation Rate; DAS, Disease Activity Score; RF, Rheumatoid Factor; ACPA, Anti-Citrullinated Protein Antibody; csDMARD, Conventional Synthetic Drugs Modifying; NA, not applicable; p, pvalue; *Follow-up in persistent UA group, without definite diagnosis.

sublining of persistent UA, UA>RA, UA>PsA, established RA and PsA patients, and healthy controls (**Figures 1A, B**). Except in healthy ST, GM-CSF was readily detectable in all groups (**Figure 1B**). Immunofluorescence analysis revealed GM-CSF in

CD90⁺ activated endothelium, CD90⁺ FAP⁺ fibroblasts from the sublining layer around the endothelium, and in sublining CD163⁺ macrophages (**Figure 1B**). However, GM-CSF was not found in CD3⁺ or CD4⁺ T cells (data not shown). These results

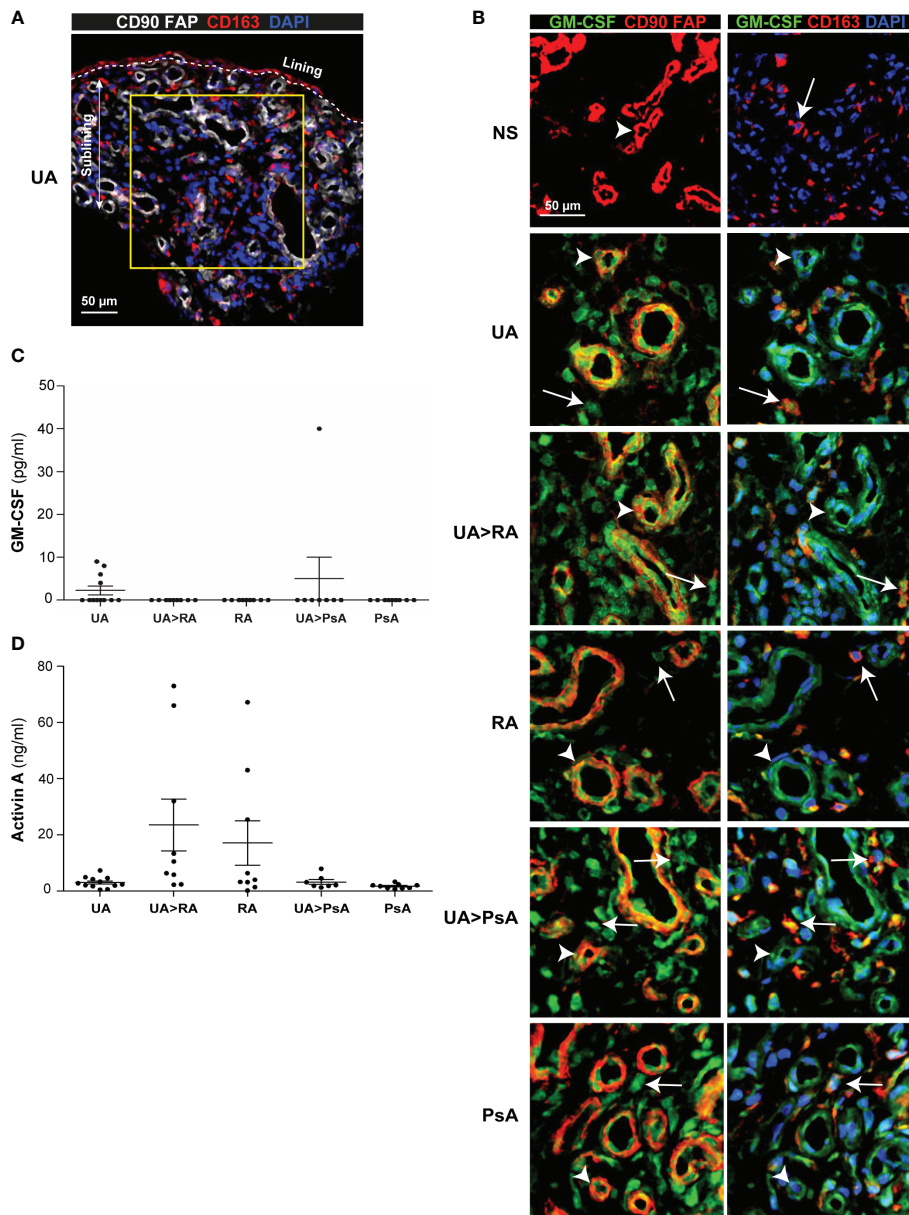


FIGURE 1 | GM-CSF expression in stromal cells from synovial tissue of undifferentiated arthritis patients. **(A)** Representative immunofluorescence image of persistent undifferentiated arthritis (UA) synovial tissue (ST) determined by confocal microscopy using anti-CD90, anti-FAP (white), and anti-CD163 (red)-specific antibodies; nuclei were counterstained with DAPI. Lining and sublining layers are shown. The region of interest in the sublining layer (yellow square) is located 50 µm from the lining layer. **(B)** Immunofluorescence analysis of normal synovium (NS), persistent undifferentiated arthritis (UA), undifferentiated arthritis evolving to RA (UA>RA), rheumatoid arthritis (RA), undifferentiated arthritis evolving to psoriatic arthritis (UA>PsA) and psoriatic arthritis (PsA) ST determined by confocal microscopy using anti-GM-CSF (green), anti-CD90, anti-FAP or anti-CD163 (red)-specific antibodies; nuclei were counterstained with DAPI. Arrowheads indicate CD90⁺FAP⁺ fibroblast and white arrows indicate CD163⁺ macrophages. Samples were devoid of staining when incubated with isotype-matched irrelevant antibodies as negative controls. The experiment was carried out in independent samples from each type (NS, n=6; UA, n=16; UA>RA, n=8; RA, n=12; UA>PsA, n=9; and PsA, n=10) and representative experiments are shown. CD163⁺ macrophages are indicated by white arrows. Scale bars, 50 µm. Determination of levels of GM-CSF **(C)** and activin A **(D)** in the synovial fluid of patients with UA (n=12), UA>RA (n=9), RA (n=9), UA-PsA (n=7), and PsA (n=9), as determined by ELISA.

indicate that GM-CSF is detected similarly in the earlier and established stages of RA and PsA, and in persistent UA, and that GM-CSF-producing cells are pathogenic CD90⁺ FAP⁺ synovial fibroblasts (28), CD90⁺ activated endothelium (33) and sublining CD163⁺ macrophages.

Activin A, but Not GM-CSF, Is Increased in Synovial Fluid From All Arthritis Groups

Analysis of paired synovial fluid (SF) samples from patients with persistent UA (n=12), UA>RA (n=9), UA>PsA (n=7), RA (n=9) and PsA (n=9) indicated that GM-CSF levels were below detection levels in most SF samples, except for 4 out of 9 (44%) persistent UA patients who were csDMARD naïve, and one UA>PsA patient out of 7 analyzed (14%), who had increased GM-CSF levels (Figure 1C). We also measured the level of activin A, which plays an important role in the early phases of the inflammatory process (34). By contrast to GM-CSF, high levels of activin A were detected in all SF samples, with concentrations ranging from 0.2 to 72 ng/ml, with UA>RA and RA samples expressing higher levels than all other groups (Figure 1D). Taken together, our results suggest that ST GM-CSF and SF activin A are detected in both the undifferentiated and established phases of arthritis, but with significantly higher levels of activin A in the undifferentiated and established phases of RA.

Synovial Tissue CD163⁺ Macrophages From Patients With Undifferentiated and Established Arthritis Exhibit a Predominantly GM-CSF-Dependent Pro-Inflammatory Polarization State

Gene ontology analysis using GSEA to compare RA macrophages and monocyte-derived macrophage transcriptome (31) revealed a very significant positive enrichment of pro-inflammatory GM-CSF-conditioned monocyte-derived macrophages (GM-MØ)-specific genes in RA macrophages (Figure 2A). In fact, the leading edge of the GSEA revealed the genes encoding activin A (*INHBA*), the metalloproteinase MMP12 and the chemokine CCL17 (35) (Figure 2A). Since our results indicated that ST in UA show enriched expression of GM-CSF in the stromal cells and activin A in the SF, we next determined the expression of proteins associated with GM-CSF-driven polarization (activin A, MMP12, and TNF α) and M-CSF-driven polarization (CD209) (21) (Figure 2B) in ST CD163⁺ macrophages of persistent UA, UA>RA, UA>PsA, and in established RA and PsA (Figure 3A). Similar to active established RA (21), activin A, TNF α , and MMP12 were readily found in CD163⁺ macrophages within the synovial sublining of UA, either evolving or not (Figure 3A), and essentially the same results were obtained in PsA, where ST CD163⁺ macrophages expressed GM-CSF-dependent polarization markers (Figure 3A). By contrast, CD163⁺ macrophages from healthy synovium did not express TNF α , MMP12, or activin A (Figure 3A). Quantification of the above indicated markers revealed that CD163⁺ macrophages from UA>RA and UA>PsA exhibited similar expression levels of activin A, TNF α and MMP12 as CD163⁺ macrophages from established RA and PsA, and higher levels than CD163⁺ macrophages from healthy synovium (Supplementary Figure 1,

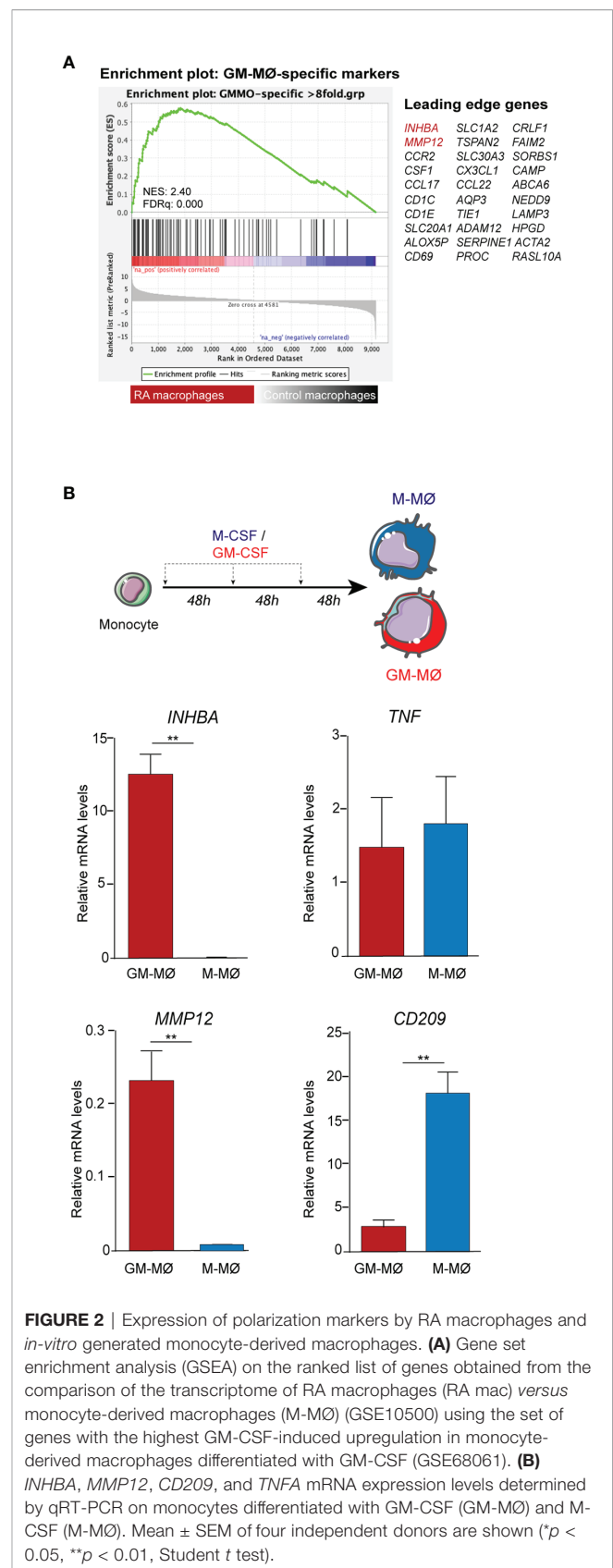


FIGURE 2 | Expression of polarization markers by RA macrophages and *in-vitro* generated monocyte-derived macrophages. **(A)** Gene set enrichment analysis (GSEA) on the ranked list of genes obtained from the comparison of the transcriptome of RA macrophages (RA mac) versus monocyte-derived macrophages (M-MØ) (GSE10500) using the set of genes with the highest GM-CSF-induced upregulation in monocyte-derived macrophages differentiated with GM-CSF (GSE68061). **(B)** *INHBA*, *MMP12*, *CD209*, and *TNFA* mRNA expression levels determined by qRT-PCR on monocytes differentiated with GM-CSF (GM-MØ) and M-CSF (M-MØ). Mean \pm SEM of four independent donors are shown (* p < 0.05, ** p < 0.01, Student t test).

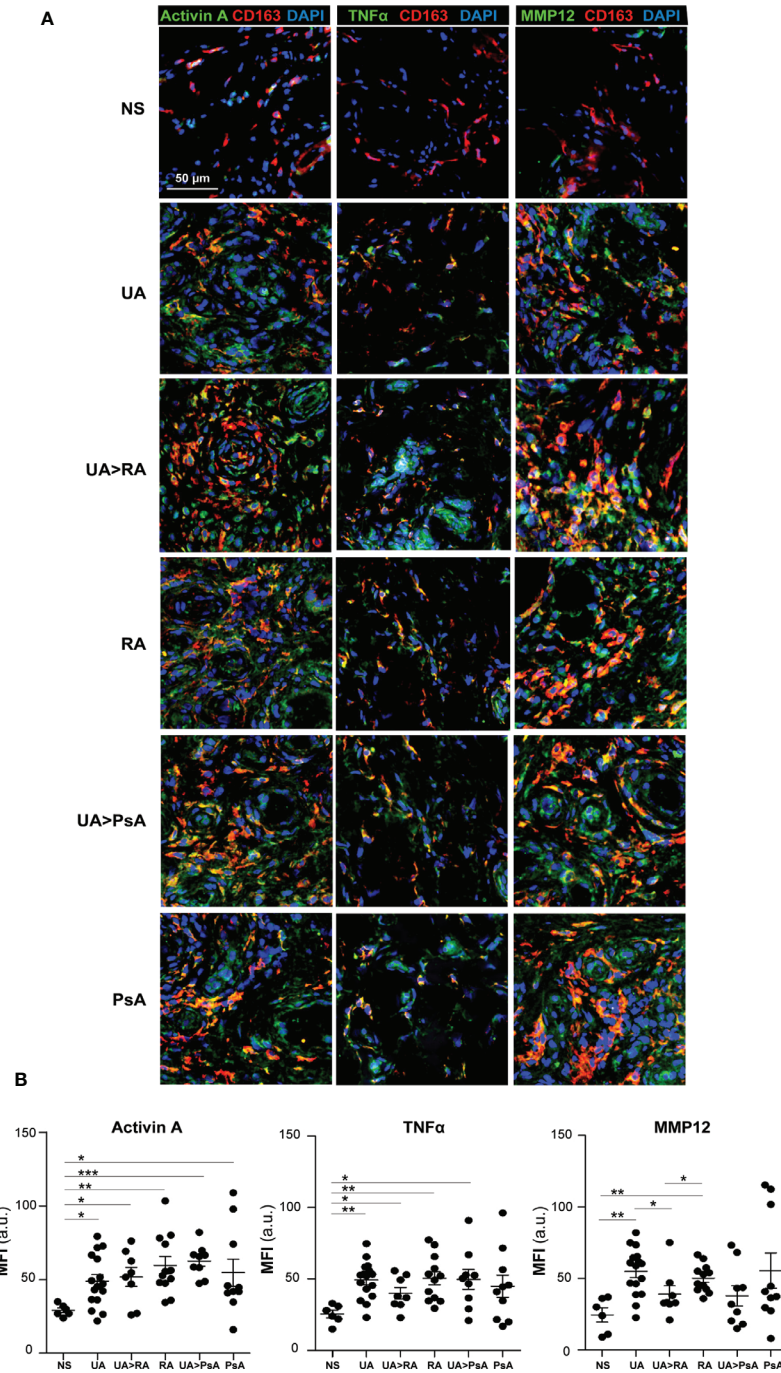


FIGURE 3 | Expression of macrophage-pro-inflammatory polarization markers by CD163⁺ macrophages from undifferentiated arthritis patients. **(A)** Immunofluorescence analysis of synovial tissues as determined by confocal microscopy using anti-activin A, TNFα-, MMP12-specific antibodies; nuclei were counterstained with DAPI. Samples were devoid of staining when incubated with isotype-matched irrelevant antibodies as negative controls. The experiment was carried out in independent samples from each type (NS, n=6; UA, n=16; UA>RA, n=8; RA, n=12; UA>PsA, n=9; and PsA, n=10) and representative experiments are shown. Scale bars, 50 μm. **(B)** Summary dot plot showing mean MFI values of activin A, TNF-α and MMP12 expression in CD163⁺ macrophages from NS, UA, UA>RA, RA, UA>PsA, and PsA synovial tissues samples. Mean ± SEM are shown (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, Mann-Whitney test).

Figure 3B). MMP12 expression was significantly higher in persistent UA than in UA>RA, although no significant differences in markers of systemic inflammation or in the percentage of patients receiving csDMARDs were found between the two UA groups (**Table 1**). Therefore, the expression of activin A, MMP12 and TNF α designates the GM-CSF-dependent pro-inflammatory state of CD163⁺ ST macrophages in undifferentiated and established arthritis (**Figures 3A, B**).

Two Subsets of CD163⁺ CD209 Macrophages Are Found in the Synovial Tissue From Patients With Undifferentiated and Established Arthritis

With respect to the M-CSF-associated marker CD209, two subsets of CD163⁺ macrophages were found in the synovial sublining of UA and established arthritis patients (CD163⁺ CD209⁺ and CD163⁺ CD209^{low/-}), which differed in their respective MFI for CD209 fluorescence (MFI >34 a.u. for the CD163⁺ CD209⁺ subset, and MFI < 34 a.u. for the CD163⁺ CD209^{low/-} subset) (**Figures 4A, B**). Synovial tissue from healthy controls also showed these two macrophage subsets, with a higher percentage of CD163⁺ CD209⁺ cells (80%) than that found in UA (**Figure 4C**). Furthermore, the percentage of the CD163⁺ CD209⁺ macrophage subset in PsA ST was significantly higher than in that from persistent UA (**Figures 4B, C, Supplementary Figure 2**). Taken together, these findings suggest that CD163⁺ CD209⁺ are resident macrophages with a potential anti-inflammatory function (18, 19). However, both macrophage subsets (CD209⁺ and CD209^{low/-}) expressed the proinflammatory markers activin A, TNF α and MMP12 in all patients from the UA and established disease groups (**Supplementary Figure 2**).

Macrophage Density Discriminates Undifferentiated From Established Arthritis

We determined macrophage density in ST from patients with persistent UA, UA>RA, UA>PsA, established RA and PsA, and healthy controls. CD163 and CD115 were used to gate ST macrophages as they are expressed by most macrophages (**Supplementary Figure 3**) (36). Macrophage density was significantly higher in synovium from patients with inflammatory joint disease compared with healthy controls (203 macrophages/mm²) (**Figures 5A, B**) and was comparable between both UA evolving groups, with 630 macrophages/mm² in UA>RA and 622 macrophages/mm² in UA>PsA (**Figure 5A**). Synovial tissue from persistent UA (318 macrophages/mm²) showed significantly lower macrophage density than UA>RA and UA>PsA (**Figure 5A**). These results suggest that the initial phases of RA and PsA are characterized by a significantly higher density of CD163⁺ macrophages compared with persistent UA. Since all groups had a similar proportion of patients on csDMARD therapy, differences in macrophage density could not be attributed to differences in treatment. In support of this rationale, more UA>PsA patients had received csDMARDs compared with PsA patients. However, 56% of patients with persistent UA were csDMARD-naïve, and had significantly lower CD163⁺ macrophage density than UA>RA or UA>PsA (**Table 1**).

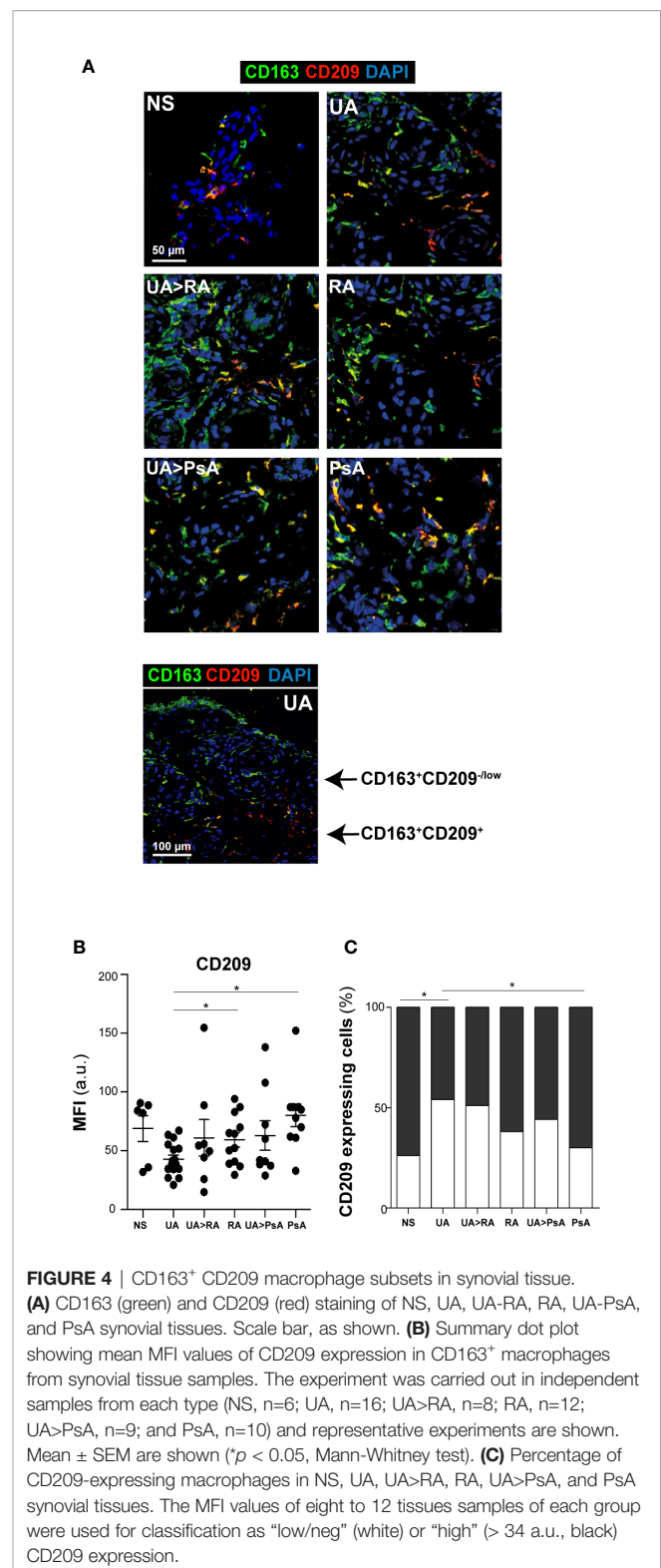
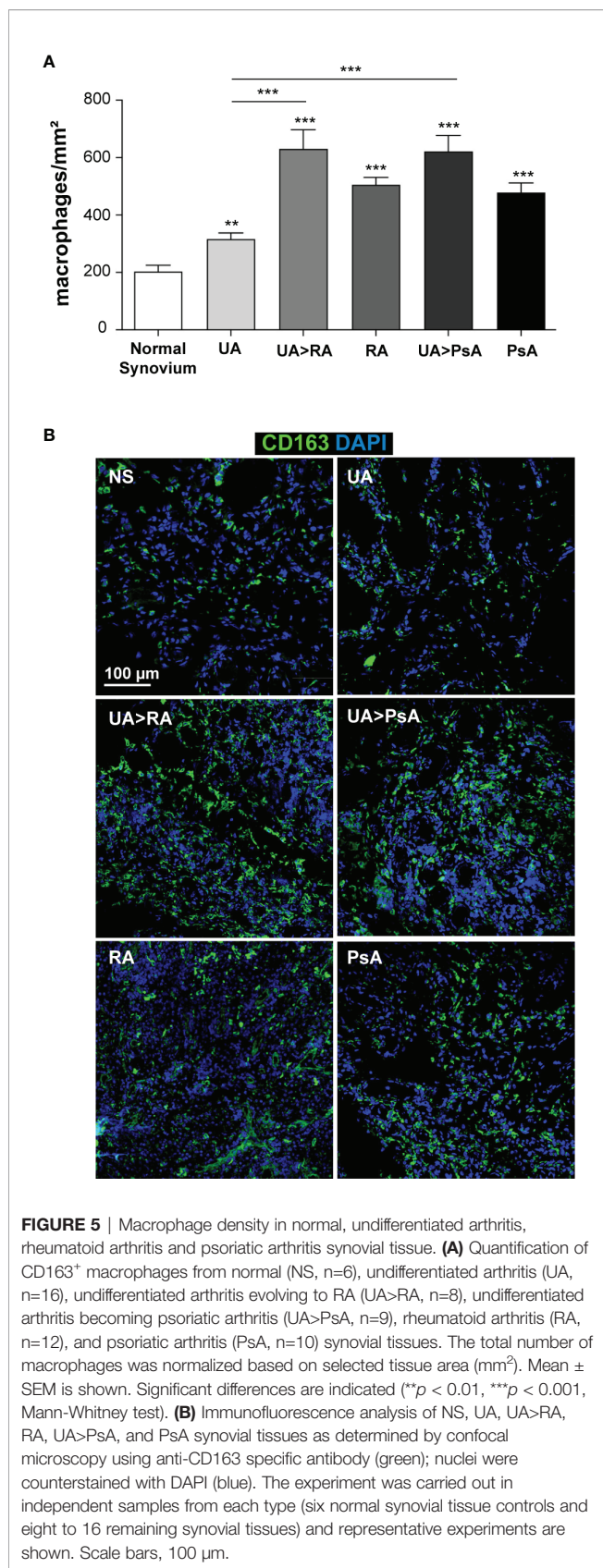


FIGURE 4 | CD163⁺ CD209 macrophage subsets in synovial tissue. **(A)** CD163 (green) and CD209 (red) staining of NS, UA, UA>RA, RA, UA>PsA, and PsA synovial tissues. Scale bar, as shown. **(B)** Summary dot plot showing mean MFI values of CD209 expression in CD163⁺ macrophages from synovial tissue samples. The experiment was carried out in independent samples from each type (NS, n=6; UA, n=16; UA>RA, n=8; RA, n=12; UA>PsA, n=9; and PsA, n=10) and representative experiments are shown. Mean \pm SEM are shown (* p < 0.05, Mann-Whitney test). **(C)** Percentage of CD209-expressing macrophages in NS, UA, UA>RA, RA, UA>PsA, and PsA synovial tissues. The MFI values of eight to 12 tissues samples of each group were used for classification as "low/neg" (white) or "high" (> 34 a.u., black) CD209 expression.

Synovial Tissue Categorization According to Defined Pathotypes

Based on H&E and immunohistochemistry staining for CD3 (T cells), CD20 (B cells), CD138 (plasma cells), and CD68



(macrophages), synovial tissue from each UA and definite arthritis group was categorized into three distinct synovial pathotypes: lympho-myeloid, diffuse-myeloid, and pauci-immune (37). Results show that, in all the groups studied, the most frequent pathotypes were lympho-myeloid and diffuse-myeloid, ranging from 40-50% each, with the pauci-immune found in around 8% of the patients (**Supplementary Table 1**). These results are in line with those from previous studies (9, 37–40). The relative prevalence of the lympho-myeloid pathotypes in our established RA cohort, with more longstanding disease, was higher than in its undifferentiated phase (75% vs. 50%) (**Supplementary Table 1**), but the low number of cases preclude to extract further conclusion.

DISCUSSION

Synovial tissue macrophages are key producers of cytokines relevant to the physiopathology of chronic arthritis and their changes correlate with disease activity, radiographic progression, and response to therapy (10–13). However, macrophages are composed of a heterogeneous population with different functional profiles: pro-inflammatory, anti-inflammatory or reparative (17–20). Macrophage polarization has been demonstrated in experimental models of immune-mediated inflammatory diseases and in human cancer (41).

The characterization of ex-vivo CD14⁺ macrophages isolated from synovial fluid of patients with active RA indicate that they exhibit a transcriptomic and protein profile compatible with GM-CSF-skewed macrophage polarization (21). Activin A and other proteins encoded by several GM-CSF-associated gene markers, including MMP12 and CCR2, have been also detected in macrophages from active RA joints (21–23). GM-CSF induces macrophage differentiation and survival from hematopoietic progenitor cells (35, 42). In contrast to M-CSF, GM-CSF is undetectable in the systemic circulation during homeostasis but is produced and active at sites of tissue inflammation, and is a key driver of tissue inflammation and arthritic pain (43, 44). GM-CSF was also pathogenic in experimental models of SpA (45) and is emerging as a central player in chronic inflammatory diseases, including mouse models of multiple sclerosis (46), bowel inflammation (47), and RA (48). GM-CSF signals through GM-CSFR, priming myeloid cells to produce inflammatory mediators that promote the activation of synovial fibroblasts, activation of the vasculature and differentiation of effector T cells. Activated synovial fibroblasts secrete GM-CSF in response to inflammatory mediators, thus implying that GM-CSF is a communication conduit between the innate and adaptive immunity critically-involved in chronic inflammation (43).

The GM-CSF receptor was reported to be overexpressed in CD68⁺ and CD163⁺ macrophages from the ST of RA and PsA patients compared with osteoarthritis patients and healthy controls (49). Clinical trials targeting GM-CSF or GM-CSF receptor- α in RA have shown sustained clinical responses without major safety concerns (50, 51).

To our knowledge, this is the first study assessing GM-CSF expression and cellular source, macrophage polarization state and density in the ST of the most prevalent immune-mediated inflammatory joint diseases, RA and PsA, and their undifferentiated phases. We found that the main cellular sources of GM-CSF in the synovium of all chronic arthritis groups studied are stromal cells and CD163⁺ macrophages. Sublining CD90⁺ FAP⁺ synovial fibroblasts, the only subtype reported as pathogenic, which is specifically increased in RA compared with osteoarthritis (33) and CD90⁺ activated endothelium (52) show high GM-CSF expression. Although intracellular GM-CSF expression by ST polyfunctional lymphocytes (Th1, Th17, and ex-Th17 subtypes) have been reported using flow cytometry in PsA and the number of these cells correlated with the disease activity of psoriatic arthritis score (DAPSA) (53), we could not confirm GM-CSF expression by CD3⁺ or CD4⁺ T cells in our samples. No expression of GM-CSF on healthy synovium was found.

Among the GM-CSF-derived macrophage markers, we detected activin A both in the synovial stroma and synovial fluid of all UA and established arthritis patients, although higher levels of SF activin A were found in RA and its undifferentiated phase. Activin A is a member of the TGFβ factor family encoded by the *INHBA* gene and mediates, in part, the macrophage-polarizing ability of RA synovial fluid (21, 54). Activin A contributes to the proinflammatory macrophage polarization triggered by GM-CSF and limits acquisition of the anti-inflammatory phenotype (22). Activin A is elevated in the early stages of other inflammatory diseases and exerts pro- or anti-inflammatory activities depending on its concentration and cellular context (55). In the particular case of the undifferentiated and established arthritis in our study, activin A levels fell within the pro-inflammatory side (55), stressing its contribution to the polarization of macrophages within the inflamed synovium.

Despite the high and generalized expression of GM-CSF in the synovium of all arthritis groups analyzed, only a few csDMARD naïve patients with persistent UA had detectable levels in synovial fluid. This finding was expected, as it is known that GM-CSF is mainly expressed in inflamed tissue.

Our results confirm our previous findings in RA (21) and extend them to PsA synovitis and their respective UA phases, including persistent UA, suggesting that the pattern of polarization of ST macrophages, mainly proinflammatory, is similar and is already present in all phases of these chronic inflammatory joint diseases. A previous study analyzing macrophage subsets in human arthritis found M1 polarization predominating in RA and IL-10-expressing macrophages in SpA, including PsA (56).

Despite the pathogenic differences between RA and PsA, we found similar patterns of expression of proteins induced by GM-CSF and M-CSF in CD163⁺ macrophages of PsA, RA, and their undifferentiated phases. Although PsA ST had significantly more CD163⁺ macrophages expressing the anti-inflammatory CD209 marker, which suggests CD163⁺ CD209⁺ could represent reparative and anti-inflammatory tissue-resident macrophages (18), no differences were found in the expression of proinflammatory

markers (activin A, TNF, MMP-12) between CD163⁺ macrophages CD209⁺ and CD209^{low/-}.

Our results show that the density of CD163⁺ macrophages is significantly higher in UA evolving to RA or PsA compared with persistent UA. This is an unexpected finding as more UA>PsA patients had received csDMARDs therapy than PsA patients. However, 56% of patients with persistent UA were csDMARD-naïve and had significantly lower CD163⁺ macrophage density than UA>RA, UA>PsA, or established RA or PsA patients. Although cautiously, these findings suggest that a significant increase in ST CD163⁺ macrophage density could be a marker of transition from undifferentiated to definite disease, both in RA and PsA. In fact, a study searching for ST predictors of clinical differentiation in patients with seronegative undifferentiated peripheral arthritis reported that 6 out of 42 patients with a definite diagnosis after 1 year of follow up (2 RA, 2 SpA, 2 PsA) had higher histological CD68⁺ macrophage scores than patients persisting with undifferentiated arthritis (57).

Several articles using single cell technologies (17–20) have recently reported new biomarkers to clearly discriminate pro-inflammatory from anti-inflammatory, reparative macrophages. Specifically, Alivernini et al. showed that not all synovial tissue macrophages (STM) are inflammatory (MerTK^{neg}) and that sustained disease remission in RA is actively maintained by MerTK^{pos} macrophages, which are also predominant in healthy synovium. If validated with additional cohorts of patients with RA in remission, the ratio of MerTK^{pos} to MerTK^{neg} STMs could be useful as a predictor of disease flare versus sustained remission to help with treatment decisions in clinical practice (19).

Our study has some limitations, including the retrospective design and the relatively small sample size. Although some patients were receiving csDMARDs (mainly methotrexate), which could modify our findings, this factor was comparable in all groups. The study has the strength of the follow-up of UA patients until they met RA or PsA classification criteria, the group of persistent UA patients (treated or not with csDMARDs) as positive controls and the ST from healthy controls. Likewise, the results were consistent for all types of arthritis.

CONCLUSION

Our results show a high, generalized expression of GM-CSF in stromal cells and sublining CD163⁺ macrophages from synovial tissue of UA patients evolving or not to RA or PsA compared with healthy controls. CD163⁺ macrophages expressed a pro-inflammatory profile of biomarkers (activin A, TNFα, and MMP-12) in synovial tissue from all arthritis subtypes studied, while in paired samples of synovial fluid only activin A levels were widely detected. CD163⁺ macrophages were significantly higher in the UA phases of RA and PsA compared with persistent UA. Taken together, our findings support the concept that GM-CSF is a strong driver of macrophage polarization and a potential therapeutic target, not only in RA but also in PsA and in UA. We also found that the ST sublining

of undifferentiated and established arthritis patients showed a high percentage of CD163⁺ CD209^{low/-} whereas healthy controls exhibited a high percentage of CD163⁺ CD209⁺, suggesting they may be resident macrophages with a potential anti-inflammatory function. Further studies using single cell technologies will definitively characterize phenotypes and function of synovial macrophages in undifferentiated arthritis.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The study was approved by the Ethics Research Committee of the Hospital Clinic of Barcelona, Spain (HCB/2014/0579) and signed informed consent was obtained from each patient. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP-K and JC had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of data analysis. AP-K and JC were responsible for the study design. AC, RC, and JR performed clinical data acquisition. SF-R, LE-C, RS, RG-C, and AP-K were responsible for the analysis. SF-R, LE-C, AC, RC, AP-K, and JC performed the data interpretation.

REFERENCES

- van der Horst-Bruinsma IE, Speyer I, Visser H, Breedveld FC, Hazes JM. Diagnosis and course of early-onset arthritis: results of a special early arthritis clinic compared to routine patient care. *Br J Rheumatol* (1998) 37:1084–8. doi: 10.1093/rheumatology/37.10.1084
- Wolfe F, Ross K, Hawley DJ, Roberts FK, Cathey MA. The prognosis of rheumatoid arthritis and undifferentiated polyarthritis syndrome in the clinic: a study of 1141 patients. *J Rheumatol* (1993) 20:2005–9.
- Olivieri I, Sarzi-Puttini P, Bugatti S, Atzeni F, d'Angelo S, Caporali R. Early treatment in early undifferentiated arthritis. *Autoimmun Rev* (2012) 11:589–92. doi: 10.1016/j.autrev.2011.10.019
- Quinn MA, Green MJ, Marzo-Ortega H, Proudman S, Karim Z, Wakefield RJ, et al. Prognostic factors in a large cohort of patients with early undifferentiated inflammatory arthritis after application of a structured management protocol. *Arthritis Rheum* (2003) 48:3039–45. doi: 10.1002/art.11269
- Paramarta JE, Baeten D. Spondyloarthritis: From Unifying Concepts to Improved Treatment. *Rheumatol (Oxford)* (2014) 53:1547–59. doi: 10.1093/rheumatology/ket407
- Celis R, Cuervo A, Ramirez J, Cañete JD. Psoriatic arthritis: singularity and clinical implications. *Front Med (Lausanne)* (2019) 6:14. doi: 10.3389/fmed.2019.00014
- Veale DJ, Fearon U. What makes psoriatic and rheumatoid arthritis so different? *RMD Open* (2015) 1(1):e000025. doi: 10.1136/rmdopen-2014-000025

Manuscript preparation was by SF-R, LE-C, AC, AP-K, and JC. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by grants PI17/00037 from Instituto de Salud Carlos III/FEDER to AP-K, grants PI14/00785 and PI17/00993 from Instituto de Salud Carlos III to JC, grant RIER RD16/0012/0010 and RD16/0012/0007 FEDER to JC and AP-K, respectively, and co-financed by the European Regional Development Fund “A way to achieve Europe” (ERDF). SF-R is supported by a contract from Instituto de Salud Carlos III (FI18/00109) and AP-K is supported by FIBHGM. AC received grants from the Hospital Clinic of Barcelona “Emili Letang 2014”, and the Catalan Society of Rheumatology.

ACKNOWLEDGMENTS

This manuscript has been released as a pre-print at Research Square, doi: 10.21203/rs.3.rs-34812/v1. The authors acknowledge Julia Villarejo for technical help, Angel L. Corbí for helpful discussions, and David Buss for technical assistance.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.613975/full#supplementary-material>

- Orr C, Vieira-Sousa E, Boyle DL, Buch MH, Buckley CD, Cañete JD, et al. Synovial tissue research: a state-of-the-art review. *Nat Rev Rheumatol* (2017) 13:463–75. doi: 10.1038/nrrheum.2017.115
- Cañete JD, Santiago B, Cantaert T, Sanmartí R, Palacin A, Celis R, et al. Ectopic lymphoid neogenesis in psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* (2007) 66:720–6. doi: 10.1136/ard.2006.062042
- Mulherin D, Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol* (1996) 39:115–24. doi: 10.1002/art.1780390116
- Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF-alpha- and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* (2003) 111:821–31. doi: 10.1172/JCI200316069
- Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, Smeets TJ, Kraan MC, Baeten D, et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2005) 64:834–8. doi: 10.1136/ard.2004.029751
- Baeten D, Kruihof E, De Rycke L, Boots AM, Mielants H, Veys EM, et al. Infiltration of the synovial membrane with macrophage subsets and polymorphonuclear cells reflects global disease activity in spondyloarthropathy. *Arthritis Res Ther* (2005) 7:R359–69. doi: 10.1186/ar1501
- Kruihof E, Baeten D, De Rycke L, Vandooren B, Foell D, Roth J, et al. Synovial histopathology of psoriatic arthritis, both oligo- and polyarticular, resembles spondyloarthropathy more than it does rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* (2005) 7:R569–80. doi: 10.1186/ar1698

15. Salvador G, Sanmarti R, García-Peiró A, Rodríguez-Cros JR, Muñoz-Gómez J, Cañete JD. p53 Expression in Rheumatoid and Psoriatic Arthritis Synovial Tissue and Association With Joint Damage. *Ann Rheum Dis* (2005) 64:183–7. doi: 10.1136/ard.2004.024430
16. Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, Krausz S, Cantaert T, Yeremenko N, et al. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* (2009) 60:966–75. doi: 10.1002/art.24406
17. Zhang F, Wei K, Slowikowski K, Fonseca CY, Rao DA, Kelly S, et al. Defining inflammatory cell states in rheumatoid arthritis joint synovial tissues by integrating single-cell transcriptomics and mass cytometry. *Nat Immunol* (2019) 20:928–42. doi: 10.1038/s41590-019-0378-1
18. Culemann S, Grüneboom A, Nicolás-Ávila JA, Weidner D, Franziska Lämmle K, Rothe T, et al. Locally renewing resident synovial macrophages provide a protective barrier for the joint. *Nature* (2019) 572(7771):670–5. doi: 10.1038/s41586-019-1471-1
19. Alivernini S, MacDonald L, Elmesari A, Finlay S, Tolusso B, Gigante MR, et al. Distinct synovial tissue macrophage subsets regulate inflammation and remission in rheumatoid arthritis. *Nat Med* (2020) 26:1295–306. doi: 10.1038/s41591-020-0939-8
20. Kuo D, Ding J, Cohn IS, Zhang F, Wei K, Rao DA, et al. HBEGF + macrophages in rheumatoid arthritis induce fibroblast invasiveness. *Sci Transl Med* (2019) 11(491):eaau8587. doi: 10.1126/scitranslmed.aau8587
21. Soler Palacios B, 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* (2015) 235:515–26. doi: 10.1002/path.4466
22. Sierra-Filardi E, Puig-Kröger 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. doi: 10.1182/blood-2010-09-306993
23. Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A, Samaniego R, Corcuera MT, Gómez-Aguado F, et al. Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/macrophages. *Cancer Res* (2009) 69(24):9395–403. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2050
24. Campbell IK, Rich MJ, Bischof RJ, Hamilton JA. 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* (2000) 68:144–50. doi: 10.1189/jlb.68.1.144
25. Al-Mossawi MH, Chen L, Fang H, Ridley A, de Wit J, Yager N, et al. Unique transcriptome signatures and GM-CSF expression in lymphocytes from patients with spondyloarthritis. *Nat Commun* (2017) 8:1510. doi: 10.1038/s41467-017-01771-2
26. Cook AD, Braine EL, Campbell IK, Rich MJ, Hamilton JA. 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* (2001) 3:293–8. doi: 10.1186/ar318
27. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* (1988) 31:315–24. doi: 10.1002/art.1780310302
28. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H. CASPAR Study Group. Classification criteria for psoriatic arthritis - Development of new criteria from a large international study. *Arthritis Rheumatol* (2006) 54:2665–73. doi: 10.1002/art.21972
29. Samaniego R, Gutiérrez-González A, Gutiérrez-Seijo A, Sánchez-Gregorio S, García-Giménez J, Mercader E, et al. CCL20 Expression by Tumor-Associated Macrophages Predicts Progression of Human Primary Cutaneous Melanoma. *Cancer Immunol Res* (2018) 6:267–75. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0198
30. Samaniego R, Esteche A, Relloso M, Longo N, Escat JL, Longo-Imedio I, et al. Mesenchymal contribution to recruitment, infiltration, and positioning of leukocytes in human melanoma tissues. *J Invest Dermatol* (2013) 133:2255–64. doi: 10.1038/jid.2013.88
31. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102(43):15545–50. doi: 10.1073/pnas.0506580102
32. Yarilina A, Park-Min KH, Antoniv T, Hu X, Ibashkiv LB. TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes. *Nat Immunol* (2008) 9(4):378–87. doi: 10.1038/ni1576
33. Mizoguchi F, Slowikowski K, Wei K, Marshall JL, Rao DA, Chang SK, et al. Functionally distinct disease-associated fibroblast subsets in rheumatoid arthritis. *Nat Commun* (2018) 9:789. doi: 10.1038/s41467-018-02892-y
34. Gonzalez-Dominguez E, Dominguez-Soto A, Nieto C, Flores-Sevilla JL, Pacheco-Blanco M, Campos-Pena V, et al. IL-10 production impairs human CD16+ monocyte differentiation into anti-inflammatory macrophages. *J Immunol* (2016) 196:1327–37. doi: 10.4049/jimmunol.1501177
35. Hamilton JA. GM-CSF in inflammation. *J Exp Med* (2020) 217(1):e20190945. doi: 10.1084/jem.20190945
36. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* (2008) 8:958–69. doi: 10.1038/nri2448
37. Nerviani A, Di Cicco M, Mahto A, Lliso-Ribera G, Rivelles F, Thorborn G, et al. A Pauci-Immune Synovial Pathotype Predicts Inadequate Response to TNF α -Blockade in Rheumatoid Arthritis Patients. *Front Immunol* (2020) 11:845. doi: 10.3389/fimmu.2020.00845eCollection 2020
38. Lliso-Ribera G, Humby F, Lewis M, Nerviani A, Mauro D, Rivelles F, et al. Synovial tissue signatures enhance clinical classification and prognostic/treatment response algorithms in early inflammatory arthritis and predict requirement for subsequent biological therapy: Results from the pathobiology of early arthritis cohort (PEAC). *Ann Rheum Dis* (2019) 78:1642–52. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-215751
39. Lewis MJ, Barnes MR, Blighe K, Goldmann K, Rana S, Hackney JA, et al. Molecular portraits of early rheumatoid arthritis identify clinical and treatment response phenotypes. *Cell Rep* (2019) 28:2455–70.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.091
40. Cañete JD, Celis R, Moll C, Izquierdo E, Marsal S, Sanmarti R, et al. Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after anti-tumour necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* (2009) 68:751–6. doi: 10.1136/ard.2008.089284
41. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* (2013) 496:445–55. doi: 10.1038/nature12034
42. Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood* (1980) 56:947–58. doi: 10.1182/blood.V56.6.947.bloodjournal566947
43. Becher B, Tugues S, Greter M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity* (2016) 45:963–73. doi: 10.1016/j.immuni.2016.10.026
44. Cook AD, Pobjoy J, Sarros S, Steidl S, Dürr M, Lacey DC, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a key mediator in inflammatory and arthritic pain. *Ann Rheum Dis* (2013) 72:265–70. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201703
45. Regan-Komito D, Swann JW, Demetriou P, Cohen ES, Horwood NJ, Sansom SN, et al. GM-CSF Drives Dysregulated Hematopoietic Stem Cell Activity and Pathogenic Extramedullary Myelopoiesis in Experimental Spondyloarthritis. *Nat Commun* (2020) 11(1):155. doi: 10.1038/s41467-019-13853-4
46. Monaghan KL, Wan ECK. The Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Murine Models of Multiple Sclerosis. *Cells* (2020) 9(3):611. doi: 10.3390/cells9030611
47. Egea L, Hirata Y, Kagnoff MF. GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* (2010) 4:723–31. doi: 10.1586/egh.10.73
48. Hirota K, Hashimoto M, Ito Y, Matsuura M, Ito H, Tanaka M, et al. Autoimmune Th17 Cells Induced Synovial Stromal and Innate Lymphoid Cell Secretion of the Cytokine GM-CSF to Initiate and Augment Autoimmune Arthritis. *Immunity* (2018) 48:1220–32. doi: 10.1016/j.immuni.2018.04.009
49. Greven DE, Cohen ES, Gerlag DM, Campbell J, Woods J, Davis N, et al. Preclinical Characterisation of the GM-CSF Receptor as a Therapeutic Target in Rheumatoid Arthritis. *Ann Rheum Dis* (2015) 74:1924–30. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205234
50. Burmester GR, McInnes IB, Kremer JM, Miranda P, Vencovsky J, Godwood A, et al. Mavrilimumab, a Fully Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor α Monoclonal Antibody: Long-Term Safety and

- Efficacy in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* (2018) 70:679–89. doi: 10.1002/art.40420
51. Taylor PC, Saurigny D, Vencovsky J, Takeuchi T, Nakamura T, Matsievskaja G, et al. Efficacy and safety of namilumab, a human monoclonal antibody against granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) ligand in patients with rheumatoid arthritis (RA) with either an inadequate response to background methotrexate therapy or an inadequate response or intolerance to an anti-TNF (tumour necrosis factor) biologic therapy: a randomized, controlled trial. *Arthritis Res Ther* (2019) 21(1):101. doi: 10.1186/s13075-019-1879-x
 52. Wandel E, Saalbach A, Sittig D, Gebhardt C, Aust G. Thy-1 (CD90) is an interacting partner for CD97 on activated endothelial cells. *J Immunol* (2012) 188:1442–50. doi: 10.4049/jimmunol.1003944
 53. Wade SM, Canavan M, McGarry T, Low C, Wade SC, Mullan RH, et al. Association of Synovial Tissue Polyfunctional T-cells With DAPSA in Psoriatic Arthritis. *Ann Rheum Dis* (2019) 78:350–4. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214138
 54. Massague J. TGF β signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2012) 13:616–30. doi: 10.1038/nrm3434
 55. Dong F, He X. Activin A: A Potential Therapeutic Target for Characterizing and Stopping Joint Pain Early in Rheumatoid Arthritis Patients. *Inflammation* (2014) 37:170–6. doi: 10.1007/s10753-013-9727-7
 56. Ambarus CA, Noordenbos T, de Hair MJ, Tak PP, Baeten DL. Intimal lining layer macrophages but not synovial sublining macrophages display anIL-10 polarized-like phenotype in chronic synovitis. *Arthritis Res Ther* (2012) 14:R74. doi: 10.1186/ar3796
 57. Alivernini S, Tolusso B, Petricca L, Bui L, Di Mario C, Gigante MR, et al. Synovial Predictors of Differentiation to Definite Arthritis in Patients With Seronegative Undifferentiated Peripheral Inflammatory Arthritis: microRNA Signature, Histological, and Ultrasound Features. *Front Med (Lausanne)* (2018) 5:186. doi: 10.3389/fmed.2018.00186

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Fuentelsaz-Romero, Cuervo, Estrada-Capetillo, Celis, García-Campos, Ramírez, Sastre, Samaniego, Puig-Kröger and Cañete. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



The Macrophage Reprogramming Ability of Antifolates Reveals Soluble CD14 as a Potential Biomarker for Methotrexate Response in Rheumatoid Arthritis

OPEN ACCESS

Edited by:

Alexandre Corthay,
Oslo University Hospital, Norway

Reviewed by:

Carolin Turner,
University College London,
United Kingdom
Diana Cortes Selva,
Purdue University, United States
Thomas Martin Aune,
Vanderbilt University, United States

*Correspondence:

Amaya Puig-Kröger
amaya.puig@iisgm.com

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Innate Immunity,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 14 September 2021

Accepted: 14 October 2021

Published: 05 November 2021

Citation:

Fuentelsaz-Romero S,
Barrio-Alonso C, García Campos F,
Torres Torresano M, Muller IB,
Triguero-Martínez A, Nuño L,
Villalba A, García-Vicuña F,
Jansen G, Miranda-Carús M-E,
González-Álvaro I and Puig-Kröger A
(2021) The Macrophage
Reprogramming Ability of Antifolates
Reveals Soluble CD14 as a Potential
Biomarker for Methotrexate Response
in Rheumatoid Arthritis.
Front. Immunol. 12:776879.
doi: 10.3389/fimmu.2021.776879

Sara Fuentelsaz-Romero¹, Celia Barrio-Alonso¹, Raquel García Campos¹,
Mónica Torres Torresano¹, Ittai B. Muller², Ana Triguero-Martínez³, Laura Nuño⁴,
Alejandro Villalba⁴, Rosario García-Vicuña³, Gerrit Jansen², María-Eugenia Miranda-Carús⁴,
Isidoro González-Álvaro³ and Amaya Puig-Kröger^{1*}

¹ Unidad de Inmunometabolismo e Inflamación, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain, ² Amsterdam Rheumatology and Immunology Center, Amsterdam University Medical Center, Vrije Universiteit, Amsterdam, Netherlands, ³ Servicio de Reumatología, Hospital Universitario La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario La Princesa, Madrid, Spain, ⁴ Department of Rheumatology, Hospital Universitario La Paz-IdiPaz, Madrid, Spain

The identification of “trained immunity/tolerance” in myeloid cells has changed our perception of the performance of monocytes and macrophages during inflammatory and immune responses. Pemetrexed (PMX) and methotrexate (MTX) are blockers of the one-carbon metabolism (OCM) and commonly used therapeutic agents in cancer and rheumatoid arthritis (RA). We have previously showed that MTX promotes trained immunity in human macrophages. In the present manuscript, we have assessed the anti-inflammatory effects of PMX and MTX and found that OCM blockers alter the functional and gene expression profile of human macrophages and that OCM blockade reprograms macrophages towards a state of lipopolysaccharide (LPS) tolerance at the signaling and functional levels. Moreover, OCM blockade reduced macrophage LPS responsiveness by impairing the expression of membrane-bound and soluble CD14 (sCD14). The therapeutic relevance of these results was later confirmed in early RA patients, as MTX-responder RA patients exhibit lower sCD14 serum levels, with baseline sCD14 levels predicting MTX response. As a whole, our results demonstrate that OCM is a metabolic circuit that critically mediates the acquisition of innate immune tolerance and positions sCD14 as a valuable tool to predict MTX response in RA patients.

Keywords: macrophages, methotrexate, pemetrexed, sCD14, predictor biomarker

INTRODUCTION

Folates are one-carbon donors in biosynthetic pathways like *de novo* synthesis of purines and thymidylate, amino acid metabolism, and DNA methylation (1, 2). One-carbon metabolism (OCM) dispenses carbon atoms between various acceptor molecules required for biosynthesis and contributes to energy balance by providing ATP and NADPH (3). Accordingly, antifolates [including methotrexate (MTX) and pemetrexed (PMX)] are potent inhibitors of folate-dependent enzymes engaged in nucleotide synthesis and inhibit DNA replication (2). PMX is a therapeutically relevant antifolate used in combination with cisplatin or carboplatin as the standard first-line treatment of malignant pleural mesothelioma (4, 5), advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC) (6) and in maintenance therapy for NSCLC. PMX is transported into the cells *via* the reduced folate carrier (RFC; *SLC19A1*) and, unlike MTX, is an excellent substrate for the proton-coupled folate transporter (PCFT; *SLC46A1*) (7). PMX is also an efficient substrate for the enzyme folylpoly- γ glutamate synthetase (FPGS) that catalyzes the addition of multiple glutamyl residues to the γ -carboxyl on the terminal glutamate of both folates and antifolates upon entry into the cell (8). PMX polyglutamylation enhances both its intracellular retention and its inhibitory potency towards thymidylate synthase (TS) and glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT) (8).

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune systemic disease affecting mainly diarthrodial joints, commonly treated with weekly administered MTX as the main starting therapy and anchor drug (9, 10). The current paradigm in the treatment of RA is to start treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) as soon as possible, in order to take advantage of the “window of opportunity,” a period at the beginning of the disease in which the response to effective treatment is disproportionately greater, increasing the possibility to achieve remission (11). On the contrary, PMX is not approved for RA treatment, in spite of the fact that it reduces inflammatory cell infiltration in joints, limits cartilage-bone destruction, and lowers serum TNF α and IL-17 in a rat model of collagen-induced arthritis (12).

Macrophages exhibit innate immune memory whereby they are durably primed by certain stimuli for enhanced or diminished responses to secondary stimuli (training/tolerance) (13–16). Macrophages are abundant in the synovium of RA joints, where they contribute to pathogenesis through the production of proinflammatory mediators (17–19). We have previously shown that macrophages from human RA joints exhibit a transcriptomic and phenotypic proinflammatory polarization profile that resembles that of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-differentiated macrophages (GM-M \emptyset) (20) and that MTX conditions macrophages towards the acquisition of a state of tolerance that renders them less responsive to TLR ligands, TNF α , and RA synovial fluid (21, 22).

Low-dose MTX is safe, inexpensive, and effective, but 30%–40% of RA patients discontinue MTX treatment due to intolerance, inefficacy, or loss of clinical responsiveness at later time points (MTX resistance) (23, 24). Considering the “window

of opportunity” concept, it would be interesting to have biomarkers predicting MTX response, therefore avoiding a delay in achieving remission in those MTX-non-responder patients. On the other hand, given these therapeutic limitations of MTX, and considering the widespread use of PMX in hyperproliferative pathologies, we have now explored the phenotypic and functional effects of PMX on human macrophages. Our results indicate that PMX impairs TLR4 signaling and cytokine production in macrophages and that these effects are dependent on the loss of membrane and soluble CD14 (sCD14) expression. The pathological significance of these findings has been confirmed in MTX-treated RA patients, which exhibit significantly reduced sCD14 levels. Altogether, our results indicate that PMX functionally reprograms human macrophages, opening further research of this drug to new opportunities beyond the limit of its actual clinical utility, and demonstrate that innate tolerance can be induced in human macrophages through blockade of the OCM.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed Pharma) gradient. Monocytes were purified from PBMCs by magnetic-activated cell sorting using CD14 microbeads (Miltenyi Biotec). Monocytes were cultured at 0.5×10^6 cells/ml for 7 days in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (standard RPMI, which contains 1 mg/L folic acid) supplemented with 10% fetal calf serum, at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, and containing GM-CSF (1,000 U/ml) to generate GM-CSF-polarized macrophages (GM-M \emptyset) or M-CSF (10 ng/ml) to generate M-CSF-polarized macrophages (M-M \emptyset). GM-CSF or M-CSF was added every 2 days. Low-dose PMX (50 nM), MTX (50 nM), and/or folic acid (FA; 5-formyl tetrahydrofolate, 5 μ M), pifithrin- α cyclic (25–50 μ M) was added once on monocytes together with GM-CSF or M-CSF. When indicated, lipopolysaccharide (LPS) (10 ng/ml, 0111:B4 strain, smooth LPS (sLPS) that exclusively binds TLR4, InvivoGen) or LTA (5 μ g/ml, from *Staphylococcus aureus*, InvivoGen) was added at the indicated time points onto 7-day fully differentiated macrophages without replacing the culture medium. sCD14 (20–200 ng/ml, BioLegend) was added on macrophages for intracellular signaling measurements (15 min) and IL-6 detection (3 h).

Rheumatoid Arthritis Patients

Discovery Cohort

Peripheral blood was obtained from 10 early RA patients who fulfilled the 2010 American College of Rheumatology (ACR) revised criteria (25), with a disease duration of less than 6 months and who had never received disease-modifying drugs or corticosteroids. Disease activity was assessed using the DAS28 score (26). Plasma concentrations of sCD14 were determined by ELISA at the basal visit and 6 months after initiating treatment

with weekly low-dose methotrexate (15–25 mg/week); none of the patients were taking prednisone at the time of the first or second determination. All of the included patients had a good clinical response to MTX (nine had achieved remission as determined by a DAS28 <2.6, and the remaining one patient had persistent low activity with a DAS28 >1.2) and, accordingly, had discontinued prednisone at least 1 month prior to the 6-month sCD14 determination. Patients who required continued treatment with prednisone were not included in order to eliminate the possible interference of this immunomodulatory drug with the results. In sCD14 ELISA, interference of rheumatoid factor was ruled out after confirming that serial dilutions of plasma yielded identical sCD14 levels after adjusting for the diluting factor (27). The study was approved by the Hospital La Paz-IdiPAZ Ethics Committee, and all subjects provided written informed consent according to the Declaration of Helsinki.

Validation Cohort

For sCD14 determination in serum, early arthritis patients in MTX monotherapy were recruited from the Princesa Early Arthritis Register Longitudinal (PEARL) study. The PEARL study comprises patients with one or more swollen joint and symptoms with ≤ 1 year of evolution. The register protocol includes four visits during a 2-year follow-up (0, 6, 12, and 24 months). Sociodemographic, clinical, therapeutic, and laboratory data are recorded and included in an electronic database. Biological samples are collected at each visit and stored at -80°C in the Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IIS-IP) Biobank for translational research. More detailed description of PEARL protocol has been previously published (28). None of the selected patients received corticosteroids prior to baseline visit nor during the first 6 months of follow-up. Response was considered if at the 6-month visit disease activity level decreased to remission or low disease activity provided that swollen joint count must have decreased, as well as three out of the four following variables must have decreased: tender joint count, erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein (CRP), and global disease activity by patient. Non-responders were considered if the disease activity level worsened from baseline to the 6-month visit. The study was approved by the Hospital La Princesa Ethics Committee (PI-518, March 28, 2011), and all subjects provided written informed consent according to the Declaration of Helsinki. Clinical and demographical data for discovery (Hospital La Paz) and validation (Hospital La Princesa) cohorts are as follows:

| Hospital La Paz | Responder |
|---------------------------------------|--------------------|
| | (n = 10) |
| Female; n (%) | 6 (60) |
| Age; p50 [p25–p75] | 60.5 (44.25–71.75) |
| RF positive; n (%) | 6 (60) |
| ACPA positive; n (%) | 1 (10) |
| DAS28; p50 [p25–p75] | 4.97 (3.79–5.56) |
| HAQ; p50 [p25–p75] | 1.02 (0.67–1.67) |
| Dose methotrexate (mg); p50 [p25–p75] | 17.5 (15–20) |

| Hospital La Princesa | Responder | Non-responder | p-Value |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|---------|
| | (n = 23) | (n = 10) | |
| Female; n (%) | 20 (86.96) | 9 (90) | 1 |
| Age; p50 [p25–p75] | 56.57 (42.69–67.48) | 59.66 (53.62–76.84) | 0.22 |
| RF positive; n (%) | 14 (60.87) | 7 (70) | 0.46 |
| ACPA positive; n (%) | 11 (47.83) | 6 (60) | 0.39 |
| DAS28; p50 [p25–p75] | 4.90 (4.07–5.81) | 4.11 (3.46–5.09) | 0.12 |
| HAQ; p50 [p25–p75] | 1.37 (0.87–1.75) | 0.87 (0.5–1.75) | 0.32 |
| Dose methotrexate (mg); p50 [p25–p75] | 15 (15–20) | 15 (12.5–15) | 0.27 |

p50, median; p25–p75, interquartile range; RF, rheumatoid factor; ACPA, anti-citrullinated protein antibodies; DAS28, disease activity score estimated with 28 joint count; HAQ, health assessment questionnaire.

RNAseq and Gene Set Enrichment Analysis

Total RNA was isolated from three independent preparations and processed at BGI (<https://www.bgitechsolutions.com>), where library preparation, fragmentation, and sequencing were performed using the BGISEQ-500 platform. An average of 5.41-Gb bases were generated per sample; and after filtering, clean reads were mapped to the reference (UCSC Genome assembly hg38) using Bowtie2 (average mapping ratio 93.41%) (29). Gene expression levels were calculated by using the RSEM software package (30). Differential gene expression was assessed by using DESeq2 algorithms using the parameters Fold change >2 and adjusted p-value <0.05. For gene set enrichment analysis (GSEA) (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>), the gene sets available at the website (31), as well as the “p53_Target_Gene” gene set, that contains the top 98 genes identified as p53 targets, were used (32). The data discussed in this publication have been deposited in Gene Expression Omnibus (GEO) of National Center for Biotechnology Information (NCBI) (33) and are accessible through GEO series accession numbers GSE159349 and GSE159380. For microarray data, statistical analysis for differential gene expression was carried out using empirical Bayes moderated t-test implemented in the limma package (<http://www.bioconductor.org>). The transcriptome of MTX-GM-MØ has been previously described (21) and is available at GEO (GSE71253).

Quantitative Real-Time RT-PCR

Total RNA was retrotranscribed, and cDNA was quantified using the Universal Human Probe Roche library (Roche Diagnostics). 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 $\Delta\Delta\text{CT}$ method for quantitation. The oligonucleotides used to quantify mRNA transcripts were (5′–3′) as follows: CD14 forward gttcgggaagacttatcgaccat; CD14 reverse acaaggttctggcgtggt; IL1 β forward ctgtcctgcgtgttgaaaga; IL1 β reverse ttggtaatttttgggatctaca; IL6 forward gatgagtacaaaagtctgatcca; IL6 reverse ctgcagccactgggtctgt; TBP forward cggtctgttaacttcgcttc; and TBP reverse cacacgccaagaacagtga.

RNA Interference

Two different siRNAs for TS (*TYMS* silencer select s14538 and s14539) and one control siRNA (silencer select Negative Control #1) (Ambion, Life Technologies) were used at 100 nM. GM-MØ cells were transfected with HiPerFect transfection reagent (QIAGEN), treated with PMX, and, 48 h later, tested for CD14 mRNA levels by qRT-PCR.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Supernatants from GM-MØ were tested for the presence of IL-6, IL-10, TNF α , and CXCL10 (BioLegend) and IFN β (R&D Systems). For the detection of sCD14 in supernatants, serum, and plasma of RA patients and healthy controls, the Human CD14 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) was used.

Western Blotting

Cell lysates were obtained in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer containing 1 mM of PIC (Protease Inhibitor Cocktail, SIGMA), 10 mM of NaF, 1 mM of Na₃VO₄, and 0.5 mM of DTT. Cell lysate measuring 10 μ g was subjected to sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred onto an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Protein detection was carried out using mouse monoclonal Ab against I κ B α (clone L35A5, #4814; Cell Signaling), rabbit polyclonal against p-p38 (clone D3F9), pJNK (clone 81E11) and pERK (clone D13.14.4E, #9910; Cell Signaling), p-IRF3 (clone 4D4G, #4947; Cell Signaling), and p-STAT1 (clone D4A7, #7649; Cell Signaling). Protein loading was normalized using an antibody against GAPDH (clone 6C5, sc-32233, Santa Cruz Biotechnology) or against human Vinculin (clone VIN-11-5, #V4505; Sigma-Aldrich).

Flow Cytometry

Phenotypic analysis was carried out by immunofluorescence using standard procedures. Mouse monoclonal antibodies used for cell-surface staining included fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD14 (clone M ϕ P9; BD) and PE-labeled anti-TLR4 (clone HTA125; BioLegend). Isotype-matched labeled antibodies were included as negative controls.

Statistical Analysis

For the analysis of clinical data, Stata 14.0 for Windows (Stata Corp LP, College Station, TX, USA) was used. For the discovery cohort, a non-parametric Wilcoxon test was used to assess the statistical significance of differences between pre- and posttreatment RA plasma sCD14. For the validation cohort, most quantitative variables followed a non-normal distribution, so they were represented as median and interquartile range (IQR), and the Mann–Whitney or Kruskal–Wallis tests were used to analyze significant differences. Qualitative variables were described using a calculation of the proportions, and Fisher's exact test was used to compare categorical variables. To assess the

ability of either baseline CD14 (sCD14) or the variation in sCD14 between baseline and 6 months' follow-up visits (Δ sCD14) to discriminate between MTX-responder and MTX-non-responder patients, we generated receiver operating characteristic (ROC) curves through the command `roctab` and the option `graph`. Each cutoff point was selected on the basis of the best trade-off values between sensitivity, specificity, cases correctly classified, and positive (LR+) and negative (LR–) likelihood ratios reported using the command `roctab` with the option `detail`. With the use of these cutoff values, new variables were generated to define patients with high or low baseline sCD14 and those with relevant sCD14 decrease. Then, we estimated the ORs and their 95% CI with the command `cs` of Stata, with the option `or`. This command also provides the statistical significance with Fisher's exact test.

To estimate with a better precision the capability of sCD14 to discriminate between MTX-responder and non-responder patients, we performed a multivariable logistic regression analysis in which the dependent variable was response to MTX, and as independent variables, gender, age, and baseline DAS28 were included, which are well-known predictors of treatment response in RA. Then, we consecutively included sCD14 or Δ sCD14 in the model to determine their respective ORs adjusted by age, gender, and baseline DAS28.

Statistical analysis for the rest of the figures was done using GraphPad Prism, using parametric Student's *t*-test, as appropriate, and one-way ANOVA test coupled with Tukey's post-hoc test, where indicated. *p*-Value <0.05 was considered significant (**p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001).

RESULTS

Pemetrexed Induces a Proinflammatory Profile in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Primed Macrophages

We have previously described that low-dose MTX modifies the transcriptome of proinflammatory TS⁺ GM-CSF-primed macrophages (GM-MØ) (21) (GSE71253). Since PMX also influences the expression of MTX-regulated genes (*CCL20*, *LIF*, *MET*, and *GDF15*) (21), we sought to determine the whole range of transcriptional changes induced by PMX in human macrophages. Comparison of the gene signatures of GM-CSF-primed monocyte-derived macrophages in the absence (GM-MØ) or presence (PMX-GM-MØ) of PMX (50 nM) (**Figure 1A**) revealed a large number of significant transcriptional differences (**Figure 1B**) and that the gene profile of PMX-GM-MØ was enriched in terms like "HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE" and "TNFA_VIA_NF κ B_SIGNALING" GSEA gene sets (31) (**Figures 1C, I**), supporting the notion that the continuous presence of PMX determines the acquisition of a more proinflammatory profile. Actually, PMX enhanced expression of NF κ B-target genes and MTX-regulated genes (**Figure 1E**) and, like MTX (21), potentiated the expression of p53 target

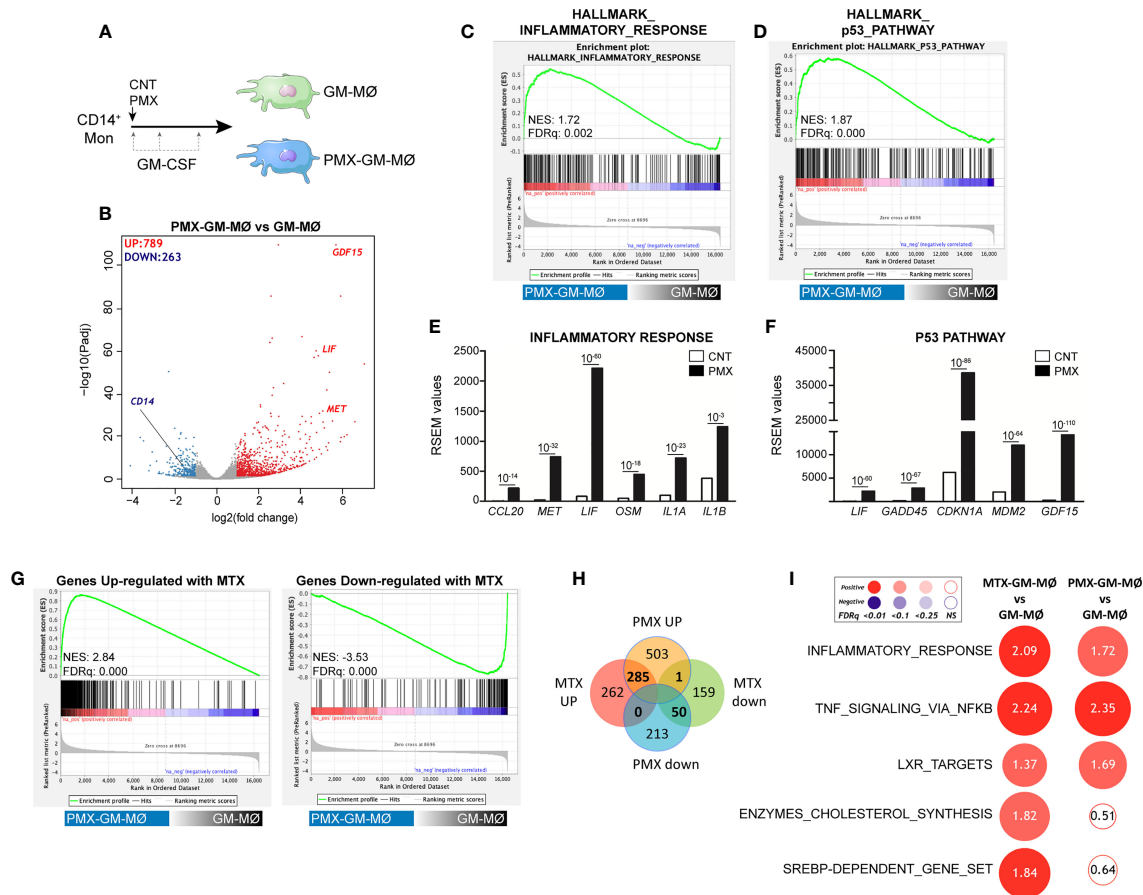


FIGURE 1 | PMX promotes the acquisition of a proinflammatory gene profile in GM-MØ. **(A)** Schematic representation of the experiments. Monocytes were untreated or exposed to 50 nM of PMX at the beginning of the 7-day macrophage differentiation process with GM-CSF, and the mRNA levels were determined at day 7 on GM-MØ. **(B)** Volcano plot of RNAseq results showing the PMX-induced gene expression changes in GM-MØ. The number of annotated genes whose expression is upregulated or downregulated in GM-MØ after 7 days of PMX treatment (adjusted $p < 0.05$) is shown. **(C, D)** GSEA (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>) on the ranked comparison of the transcriptome of PMX-GM-MØ versus untreated GM-MØ, using the Hallmarks v7 data set available at the web site. **(E, F)** RSEM expression values of the informative genes from the indicated GSEA enriched plot and found in the leading edge; adjp value is indicated. **(G)** GSEA on the ranked comparison of the transcriptome of PMX-GM-MØ versus untreated GM-MØ, using the genes significantly modulated by MTX in GM-MØ as data set. **(H)** Venn diagram comparing the genes differentially expressed by PMX in GM-MØ with the genes significantly altered by MTX in GM-MØ. **(I)** Summary of GSEA with the indicated gene set on the ranked comparison of the transcriptomes of MTX-GM-MØ vs. GM-MØ, and PMX-GM-MØ vs. GM-MØ. Circled area is proportional to the absolute value of the normalized enrichment score (NES), which is indicated inside the circles. The intensity of color increases with the enrichment of the gene signature (red, positive enrichment; blue, negative enrichment). False discovery rate (FDRq) is also indicated. The gene sets used were the Hallmarks (v7.2) data set available at the web site and the “SREBP-dependent gene set” data set (34). For panels G–I, the transcriptome data of MTX-treated GM-MØ have been previously described (21) and are available at GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (GSE71253). PMX, pemetrexed; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GSEA, gene set enrichment analysis; MTX, methotrexate.

genes (Figures 1D, F). Moreover, comparison of the gene signature of MTX-GM-MØ (GSE71253) and PMX-GM-MØ revealed a large overlap of the respective transcriptional effects of both antifolates (Figures 1G–I and Supplementary Figure 1), thus emphasizing that, like MTX, PMX promotes the acquisition of a more proinflammatory and p53-dependent gene signature in GM-MØ. Regarding differences between antifolates, MTX-treated macrophages exhibit a significant over-representation of SREBP-dependent genes, while this over-representation is not seen in PMX-treated macrophages (Figure 1I). This difference is relevant because SREBP activity

has been recently connected to macrophage polarization and to the capacity of macrophages to acquire a reparative profile (35).

Pemetrexed Treatment Promotes a Transcriptional State of Tolerance to Lipopolysaccharide in Human Macrophages: Involvement of the TLR4 Signaling Pathway

Macrophage response to a given stimulus is dependent on extracellular cues that they have been previously exposed to

(training/tolerance) (13–15). Thus, we next asked whether PMX promoted macrophage tolerance state at the transcriptional level. To that end, we determined the gene signature of LPS-stimulated (3 h) GM-MØ differentiated in the presence of PMX, FA (a reduced folate with high-affinity for RFC (36)), or PMX+FA (Figure 2A). Compared with LPS-treated GM-MØ, LPS-treated PMX-GM-MØ exhibited a significantly ($|\log_2FC| > 1$; $adjp < 0.05$) elevated expression of 355 genes and diminished mRNA levels of 273 genes (Figure 2B). Supporting the specificity of PMX, none of these changes were observed in LPS-treated PMX+FA-GM-MØ, whose transcriptome was indistinguishable from that of control FA-GM-MØ (Figure 2B). Interestingly, GSEA revealed a very significant reduction of the genes within the GSEA “HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE” gene set (31) (Figure 2C) in LPS-treated PMX-GM-MØ, a negative enrichment that was not seen in PMX+FA-GM-MØ (Figure 2C). Therefore, the presence of PMX during macrophage differentiation impairs the LPS-induced expression of inflammation-related genes, thus indicating that PMX promotes the acquisition of a tolerance state in macrophages.

Conversely, expression of the “p53_Target_Genes” gene set was significantly and specifically enriched in LPS-treated PMX-GM-MØ (Figure 2C). Moreover, the role of p53 in the PMX-induced tolerance was suggested by using the p53 inhibitor pifithrin- α , which dose dependently diminished the expression of three previously reported PMX-responsiveness genes (*GDF15*, *LIF*, and *CDKN1A* mRNA) in LPS-treated PMX-GM-MØ (Figure 2D). Since the *CDKN1A*-encoded p53 target gene p21 determines the reparative and anti-inflammatory profile of macrophages (37), this result supports the notion that PMX conditions macrophages towards a tolerance transcriptional state.

To evaluate the functional correlate of the PMX-induced transcriptional tolerance, we analyzed the ability of PMX to modify human macrophage responses upon TLR4 engagement. In agreement with the RNAseq data, LPS-treated (3 h) PMX-GM-MØ displayed a considerably diminished *IL6* and *IL1B* mRNA expression when compared with LPS-treated GM-MØ (Figure 3A). Moreover, PMX-GM-MØ produced significantly lower levels of LPS-induced IL-6, TNF α , and IL-10 after both

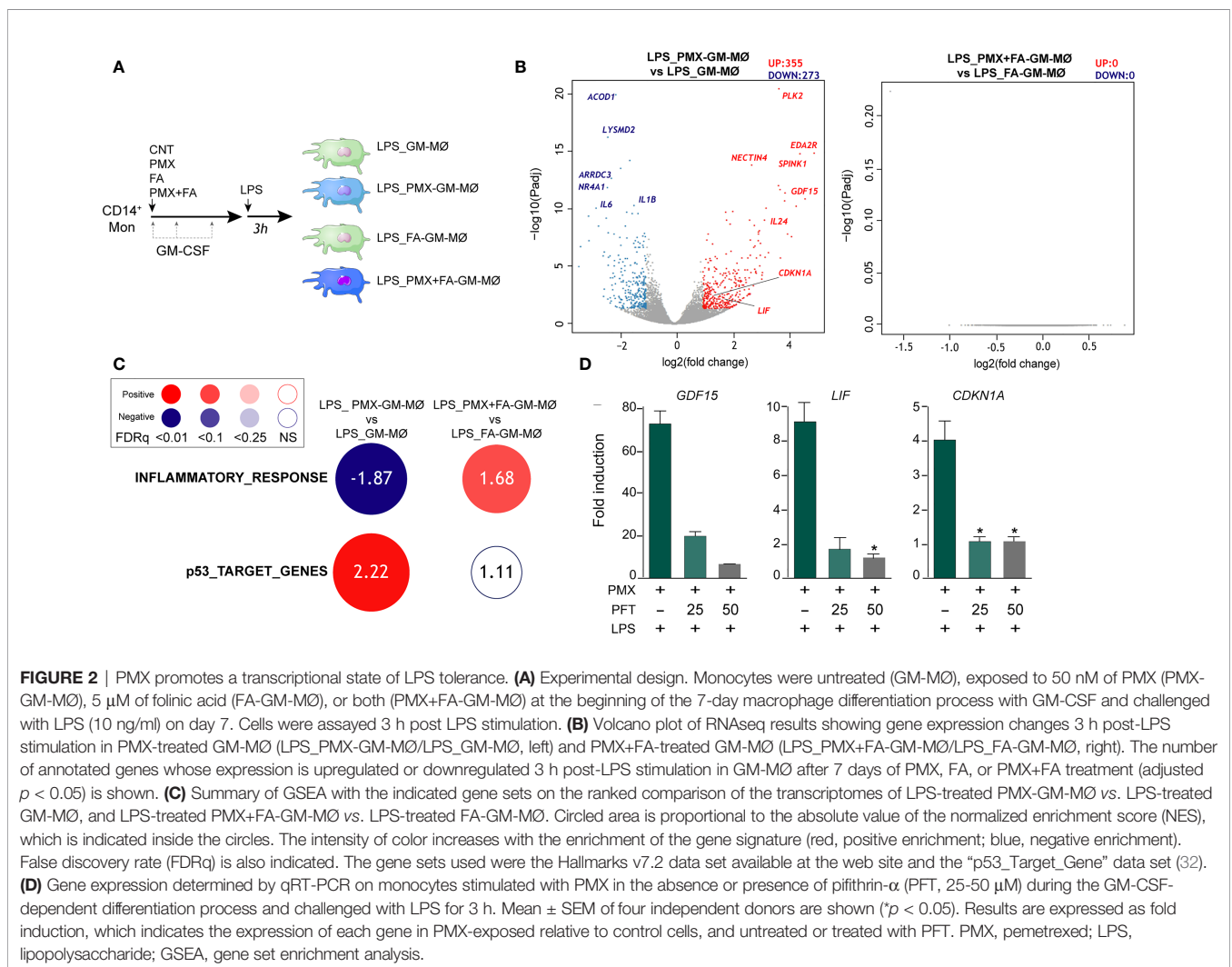


FIGURE 2 | PMX promotes a transcriptional state of LPS tolerance. **(A)** Experimental design. Monocytes were untreated (GM-MØ), exposed to 50 nM of PMX (PMX-GM-MØ), 5 μ M of folic acid (FA-GM-MØ), or both (PMX+FA-GM-MØ) at the beginning of the 7-day macrophage differentiation process with GM-CSF and challenged with LPS (10 ng/ml) on day 7. Cells were assayed 3 h post LPS stimulation. **(B)** Volcano plot of RNAseq results showing gene expression changes 3 h post-LPS stimulation in PMX-treated GM-MØ (LPS_PMX-GM-MØ/LPS_GM-MØ, left) and PMX+FA-treated GM-MØ (LPS_PMX+FA-GM-MØ/LPS_FA-GM-MØ, right). The number of annotated genes whose expression is upregulated or downregulated 3 h post-LPS stimulation in GM-MØ after 7 days of PMX, FA, or PMX+FA treatment (adjusted $p < 0.05$) is shown. **(C)** Summary of GSEA with the indicated gene sets on the ranked comparison of the transcriptomes of LPS-treated PMX-GM-MØ vs. LPS-treated GM-MØ, and LPS-treated PMX+FA-GM-MØ vs. LPS-treated FA-GM-MØ. Circled area is proportional to the absolute value of the normalized enrichment score (NES), which is indicated inside the circles. The intensity of color increases with the enrichment of the gene signature (red, positive enrichment; blue, negative enrichment). False discovery rate (FDRq) is also indicated. The gene sets used were the Hallmarks v7.2 data set available at the web site and the “p53_Target_Gene” data set (32). **(D)** Gene expression determined by qRT-PCR on monocytes stimulated with PMX in the absence or presence of pifithrin- α (PFT, 25–50 μ M) during the GM-CSF-dependent differentiation process and challenged with LPS for 3 h. Mean \pm SEM of four independent donors are shown (* $p < 0.05$). Results are expressed as fold induction, which indicates the expression of each gene in PMX-exposed relative to control cells, and untreated or treated with PFT. PMX, pemetrexed; LPS, lipopolysaccharide; GSEA, gene set enrichment analysis.

short-term (3 h) and long-term (24 h, for IL-6 and IL-10) LPS exposure (**Figures 3B–D**). The specificity of the PMX effect was demonstrated by the absence of the inhibitory effect in PMX+FA-GM-MØ (shown in **Figures 3A, E, F**), thus indicating that the effects of PMX are mediated through OCM blockade. Of note, PMX-GM-MØ also produced lower level of IL-6 and IL-10 after exposure to the TLR2 ligand lipoteichoic acid (LTA), thus indicating that PMX attenuates inflammatory cytokine expression in response to either TLR4 or TLR2 ligands (**Supplementary Figure 2**). Altogether, these results indicate that PMX conditions macrophages for the acquisition of a tolerance state at the transcriptional and functional levels.

Previous studies have demonstrated that tolerant-macrophages exhibit a lower level of MAPK and NFκB activation upon TLR stimulation (22, 38, 39). To determine whether PMX promotes “bona fide” innate tolerance in macrophages, we first determined the levels of MAPK and IκBα activation in LPS-treated PMX-GM-MØ. Upon LPS stimulation, PMX-treated GM-MØ exhibited a reduced activation of p38 and JNK compared with untreated GM-MØ (**Figure 4A**). By contrast, and as described in other cellular systems (40), PMX-GM-MØ showed an increased and more sustained phosphorylation of ERK1/2 in response to LPS (**Figure 4A**). Besides, a slower kinetics of IκBα degradation was detected in LPS-exposed PMX-GM-MØ (**Figure 4B**), an

effect abolished in the presence of FA (PMX-FA-GM-MØ, **Figure 4C**). Further and compared with GM-MØ, LPS induced lower levels of p-IRF3, p-STAT1, and IFNβ1 and CXCL10 secretion in PMX-GM-MØ (**Figures 4D–G**). Taken together, these results demonstrate that OCM blockade impairs TLR4-initiated intracellular signaling and the establishment of a state of LPS tolerance.

Pemetrexed and Methotrexate Regulate CD14 Expression in Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor-Primed Human Macrophage

Next, we determined whether PMX affected the expression of negative regulators of TLR-induced cytokine production that contribute to LPS tolerance (38). Unlike MTX-induced tolerance, mostly mediated by increased *TNFAIP3* (A20) expression (38, 39, 41, 42), no difference in *TNFAIP3* expression was found between LPS-treated GM-MØ and LPS-treated PMX-GM-MØ (not shown). Thus, we next screened for genes coding for regulators of TLR-induced activation and whose expression significantly differs between GM-MØ and PMX-GM-MØ, and we found that PMX-GM-MØ cells express significantly lower levels of *CD14* mRNA than GM-MØ (**Figure 5A**). After validation of this result in additional

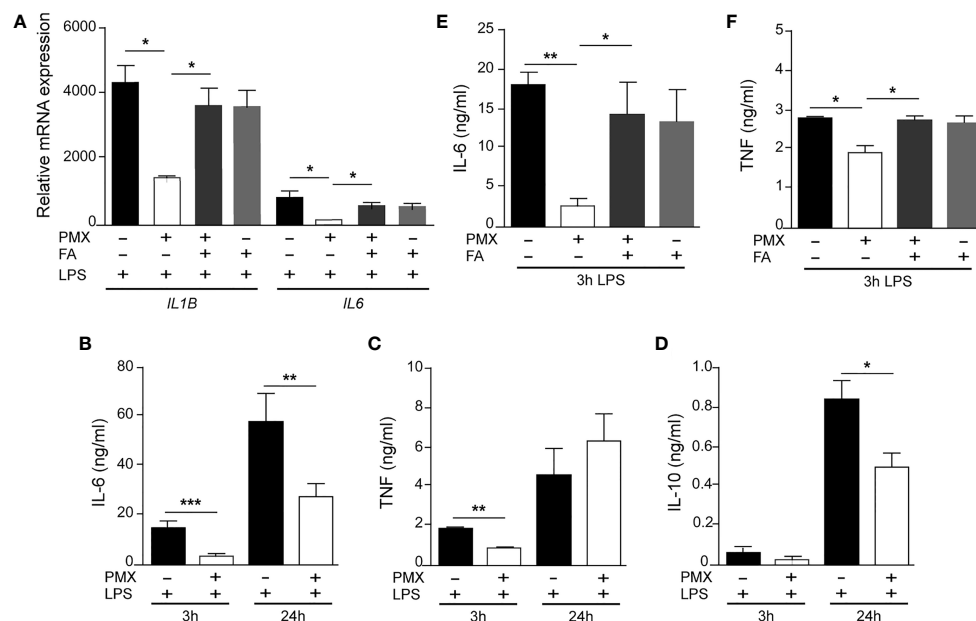


FIGURE 3 | PMX alters TLR4 responsiveness in GM-CSF-primed macrophages. **(A)** Expression of *IL1B* and *IL6* by monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or presence of PMX (50 nM), folic acid (FA; 5 μM), or both and challenged with LPS for 3 h, as determined by qRT-PCR. Mean ± SEM of three independent donors are shown. Groups were compared by applying one-way ANOVA (* $p < 0.05$). Production of IL-6 **(B)**, TNFα **(C)**, or IL-10 **(D)** by monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or presence of PMX and challenged with LPS for 3 and 24 h, as determined by ELISA. Mean ± SEM of seven independent donors are shown (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Production of IL-6 **(E)** and TNFα **(F)** by monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or presence of PMX (50 nM), folic acid (FA; 5 μM), or both and challenged with LPS for 3 h, as determined by ELISA. Mean ± SEM of five independent donors are shown. Groups were compared by applying one-way ANOVA (with Tukey's post-hoc test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). PMX, pemetrexed; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; LPS, lipopolysaccharide.

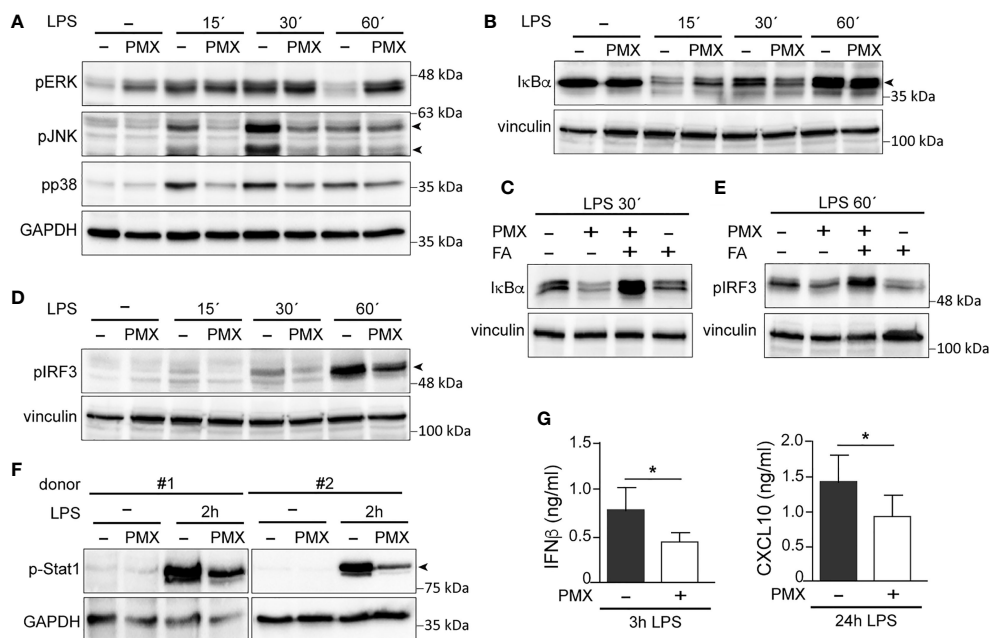


FIGURE 4 | PMX alters TLR4 signaling in GM-CSF-primed macrophages. **(A, B)** Immunoblot analysis of pERK, pJNK, and pp38 **(A)** and I κ B α **(B)** by monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or presence of PMX for 7 days and challenged with LPS for the indicated time points. **(C)** Immunoblot analysis of I κ B α by monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or presence of PMX, PMX+FA or FA for 7 days and challenged with LPS for 30 min. **(D, E)** Immunoblot analysis of pIRF3 by monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or presence of PMX **(D)**, folic acid (FA), or both **(E)** for 7 days and challenged with LPS for the indicated time points. **(F)** Immunoblot analysis of pStat1 by two independent preparations of monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or presence of PMX for 7 days and challenged with LPS for 2 h. In panels **(A–F)**, a representative experiment of two to four independent donors is shown. Molecular weight markers are indicated. Arrowheads indicate the protein of interest. **(G)** Production of IFN β and CXCL10 by monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or presence of PMX challenged with LPS for 3 h (IFN β) or 24 h (CXCL10), as determined by ELISA. Mean \pm SEM of seven independent donors are shown ($p < 0.05$). PMX, pemetrexed; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; LPS, lipopolysaccharide.

samples (shown in **Figure 5A**), we confirmed that PMX-GM-M ϕ cells express a significantly lower level of cell surface CD14 [membrane-bound CD14 (mCD14)] than GM-M ϕ (**Figures 5B, C**). Specifically, the percentage of CD14-positive cells was 75% in GM-M ϕ and 45% in PMX-GM-M ϕ , whereas the mean fluorescence significantly varied at 46.5 and 36, respectively (**Figure 5B**). Further, sCD14 was also significantly lower in the supernatant of PMX-GM-M ϕ than in control GM-M ϕ cells (**Figure 5D**), and the PMX-induced reduction of mCD14 and sCD14 was completely reversed in the presence of FA (**Figures 5C, E**). Of note, TS knockdown diminished CD14 expression without further effect of PMX (**Figure 5F**), thus indicating that the PMX-triggered CD14 downregulation is dependent on TS expression. Of note, the antifolate MTX exhibited the same effect, as MTX-GM-M ϕ showed significantly lower expression of CD14 mRNA, mCD14, and sCD14 than did GM-M ϕ , an effect also prevented by FA (**Figures 5G–K**). Therefore, OCM blockade mediates the loss of CD14 gene and protein expression in macrophages differentiated in the presence of antifolates (PMX-GM-M ϕ or MTX-GM-M ϕ). The physiological significance of these findings was further stressed by the fact that both antifolates only impaired CD14 expression in proinflammatory GM-M ϕ , whereas they did not modify

CD14 expression in M-CSF-conditioned macrophages (M-M ϕ) (**Figures 5G, H**), which resemble anti-inflammatory tissue-resident and pro-tumoral TAM (20, 43, 44).

Exogenous Soluble CD14 Restores the Impaired Lipopolysaccharide Responsiveness of Pemetrexed or Methotrexate-GM-M ϕ

Since the reduced expression of sCD14 and mCD14 correlated with diminished intracellular signaling and cytokine responses to LPS in PMX-GM-M ϕ , we next determined whether CD14 had a role in the PMX-induced macrophage tolerance state by assaying LPS responsiveness of PMX-GM-M ϕ in the presence of increasing concentrations of exogenous sCD14. Addition of sCD14 increased the LPS-induced activation of p38 and JNK, as well as the LPS-induced degradation of I κ B α in PMX-GM-M ϕ , but not in GM-M ϕ (**Figure 6A**). Noteworthy, the same results were found in MTX-GM-M ϕ (**Figure 6B**). Moreover, sCD14 dose dependently increased the LPS-induced IL-6 production in PMX-GM-M ϕ , but not in LPS-treated GM-M ϕ (**Figure 6C**). Therefore, exogenous sCD14 partly restores the inhibitory effect of PMX on TLR4-initiated intracellular signaling and IL-6 production and demonstrates that CD14 mediates the OCM-dependent pro-tolerant effect of PMX.

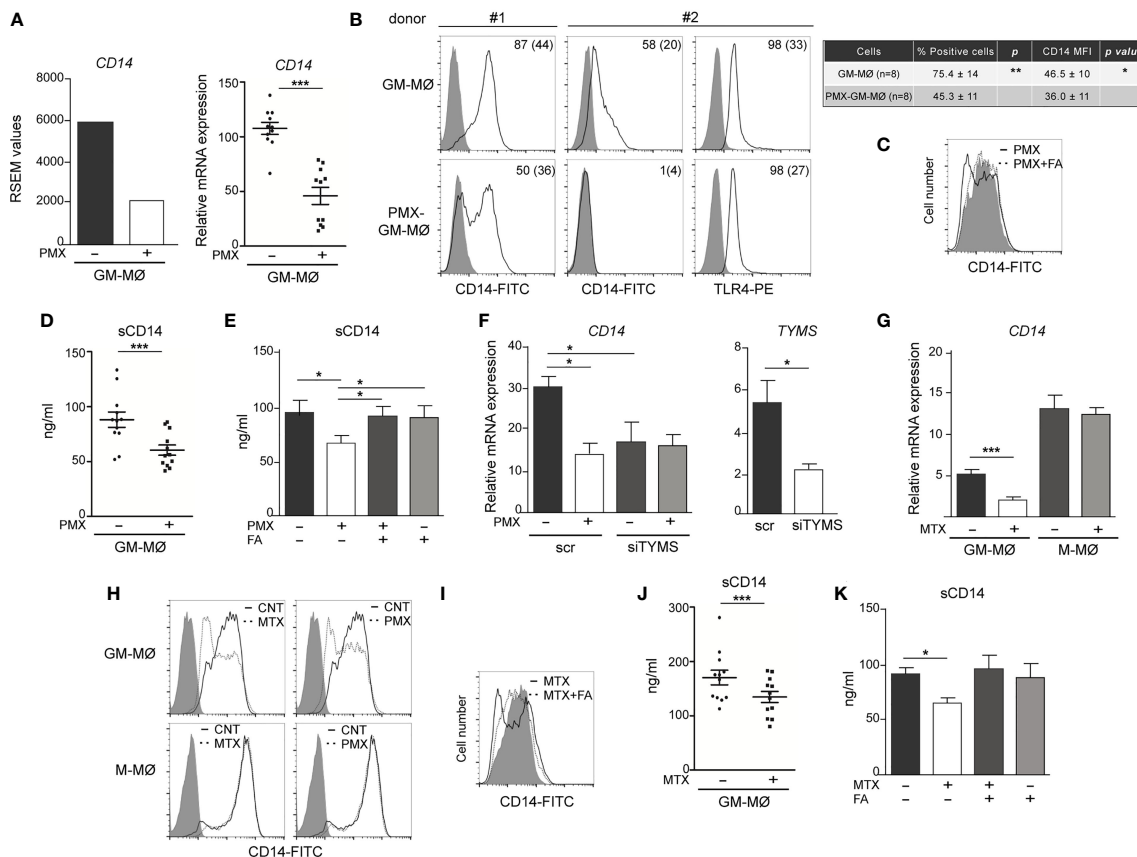


FIGURE 5 | OCM blockade diminished CD14 expression on GM-CSF-primed macrophages. **(A)** *CD14* mRNA expression on monocytes stimulated with PMX during the GM-CSF-dependent differentiation process, as determined by RNAseq ($adjp = 10^{-5}$, left) and by qRT-PCR (right, $n = 11$ independent donors; each symbol represents a single donor, $***p < 0.001$). **(B)** Cell surface expression of CD14 and TLR4 on monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or in the presence of PMX, as determined by flow cytometry. Filled histograms indicate the fluorescence levels produced by an isotype-matched antibody. The percentage of marker-positive cells and the mean fluorescence intensity (in parentheses) are indicated. The experiment was done on eight independent donors, and two representative donors are shown. The average of percentage of positive cells and MFI \pm SD for CD14 in GM-MØ and PMX-GM-MØ is shown in the right panel. Groups were compared by applying the t-test ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$). **(C)** Cell surface expression of CD14 on monocytes differentiated with GM-CSF in the absence (filled histograms) or in the presence of PMX (empty histograms) or PMX+FA for 7 days (histograms with a dotted line), as determined by flow cytometry. The experiment was done on four independent donors, and a representative is shown. **(D)** Soluble CD14 level in the supernatant of monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or in the presence of PMX for 7 days, as determined by ELISA ($n = 12$ independent donors; each symbol represent a single donor; $***p < 0.001$). **(E)** Soluble CD14 level in the supernatant of monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or presence of PMX, folic acid (FA), or both, as determined by ELISA ($n = 6$ independent donors). Groups were compared by applying one-way ANOVA (with Tukey's post-hoc test, $*p < 0.05$). **(F)** Left, *CD14* mRNA expression on GM-MØ transfected with control siRNA (scr) and siRNA for thymidylate synthase (siTYMS) and exposed to PMX for 48 h, as determined by qRT-PCR ($n = 4$ independent donors). Groups were compared by applying one-way ANOVA (with Tukey's post-hoc test, $*p < 0.05$). Right, *TYMS* mRNA expression on GM-MØ transfected with control siRNA and siRNA for TYMS for 48 h, as determined by qRT-PCR ($n = 4$ independent donors, $*p < 0.05$). **(G)** *CD14* mRNA expression on monocytes stimulated with MTX (50 nM) during the GM-CSF or M-CSF-dependent differentiation process, as determined by qRT-PCR ($n = 6$ independent donors, $***p < 0.001$). **(H)** Cell surface expression of CD14 on monocytes differentiated with GM-CSF (GM-MØ) or M-CSF (GM-MØ) in the absence (empty histograms) or in the presence of MTX or PMX (histograms with a dotted line), as determined by flow cytometry. Filled histograms indicate the fluorescence levels produced by an isotype-matched antibody. **(I)** Cell surface expression of CD14 on monocytes differentiated with GM-CSF in the absence (filled histograms) or in the presence of MTX (empty histograms) or MTX+FA (histograms with a dotted line), as determined by flow cytometry. For panels H and I, the experiment was done on four independent donors, and a representative is shown. **(J)** Soluble CD14 level in the supernatant of monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or in the presence of MTX for 7 days, as determined by ELISA ($n = 15$ independent donors, each symbol represent a single donor; $***p < 0.001$). **(K)** Soluble CD14 level in the supernatant of monocytes differentiated with GM-CSF in the absence or presence of MTX, folic acid (FA), or both, as determined by ELISA ($n = 4$ independent donors). Groups were compared by applying one-way ANOVA (with Tukey's post-hoc test, $*p < 0.05$). OCM, one-carbon metabolism; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; PMX, pemetrexed; MFI, mean fluorescence intensity.

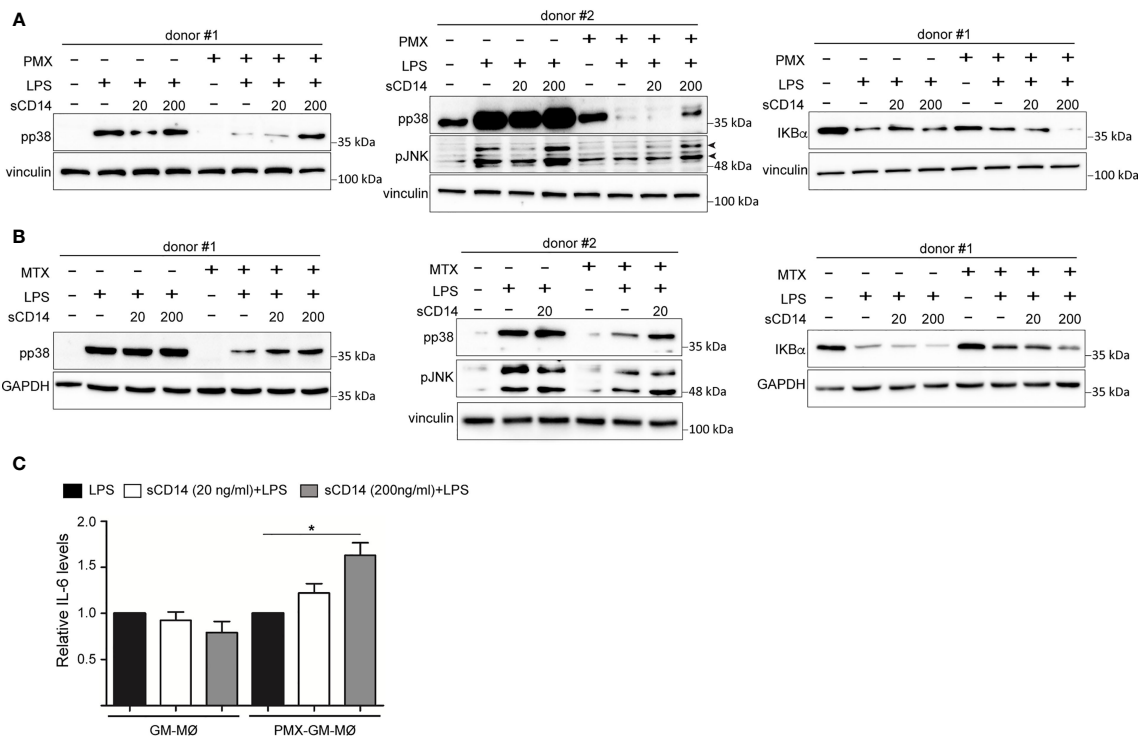


FIGURE 6 | sCD14 restores p38 and JNK activation and IL-6 production in LPS-treated PMX-GM-MØ. Immunoblot analysis of pp38, pJNK, and IκBα by GM-MØ and PMX-GM-MØ (**A**) or MTX-GM-MØ (**B**) challenged with LPS in the absence or presence of 20 ng/ml (20) or 200 ng/ml (200) of sCD14 for 15 min (pp38, pJNK) and 30 min (IκBα). The experiment was performed in four independent donors, and two of them are shown. The signal in pp38 in donor #2 (**A**) is saturated for better detection of lane 8 (sCD14 200) in PMX-GM-MØ. Molecular weight markers are indicated. Arrowheads indicate the protein of interest. (**C**) Production of IL-6 by GM-MØ or PMX-GM-MØ challenged with LPS in the absence or presence of 20 or 200 ng/ml of sCD14 for 3 h, as determined by ELISA. The experiment was performed in four independent donors, and the relative production of IL-6 is shown (* $p < 0.05$). LPS, lipopolysaccharide; PMX, pemetrexed; sCD14, soluble CD14.

Soluble CD14 Diminishes in Early Rheumatoid Arthritis Patients Who Are Methotrexate Responders

Finally, we sought to determine the therapeutic relevance of the CD14 downregulation in GM-MØ generated in the presence of antifolates. Although PMX and MTX similarly diminished mCD14 and sCD14 in GM-MØ (shown in **Figure 5**), only low-dose MTX is an anchor drug for RA treatment (23, 45). Therefore, we turned to RA patients treated with MTX to evaluate the clinical significance of the association between antifolate exposure and CD14 downregulation. Specifically, we determined sCD14 level in plasma from MTX-responder RA patients both at baseline and after 6 months of treatment with MTX. We found that sCD14 levels significantly decreased in patients who respond to MTX (**Figure 7A**). Moreover, sCD14 levels positively correlated with disease activity score DAS28 and CRP (**Figures 7B–E**). These results indicate that sCD14 expression is lower in MTX responder RA patients, suggesting that sCD14 might be a biomarker for MTX response. To confirm these findings, we determined sCD14 concentration in a validation cohort of early arthritis patients at baseline and during 6 months of MTX monotherapy, including both MTX-responder and non-responder patients (see *Materials and*

Methods for definition). Interestingly, baseline sCD14 levels in MTX-non-responder patients were similar to those in control healthy donors, whereas MTX-responder patients exhibited significantly higher sCD14 serum levels (**Figure 8A**). Moreover, sCD14 levels diminished in MTX-responder patients but not in MTX non-responders (**Figure 8B**). In order to determine whether baseline sCD14 and ΔsCD14 could be MTX response biomarkers, we performed ROC analysis. Although the area under the curve (AUC) of ΔsCD14 was slightly higher than that of baseline sCD14 (**Figure 8C**), it did not reach statistical significance. The best cutoff to discriminate between MTX responder and non-responder patients was 2,460 ng/ml for baseline sCD14 (78% sensitivity and 70% specificity) and 188 ng/ml for ΔsCD14 (83% sensitivity and 70% specificity). The OR for having high baseline sCD14 and being MTX responder was 8.4 ($p = 0.0126$), whereas the OR for a decreased sCD14 was 11.1 ($p = 0.0059$) (**Figure 8D**). Furthermore, after adjustment by variables related to MTX response such as age, gender, and baseline DAS28, the OR increased to 25.5 (for sCD14) and 40.35 (for ΔsCD14) (**Supplementary Table 1**). Altogether, these results indicate that determination of sCD14 levels could be a valuable tool to predict or evaluate MTX response in RA patients.

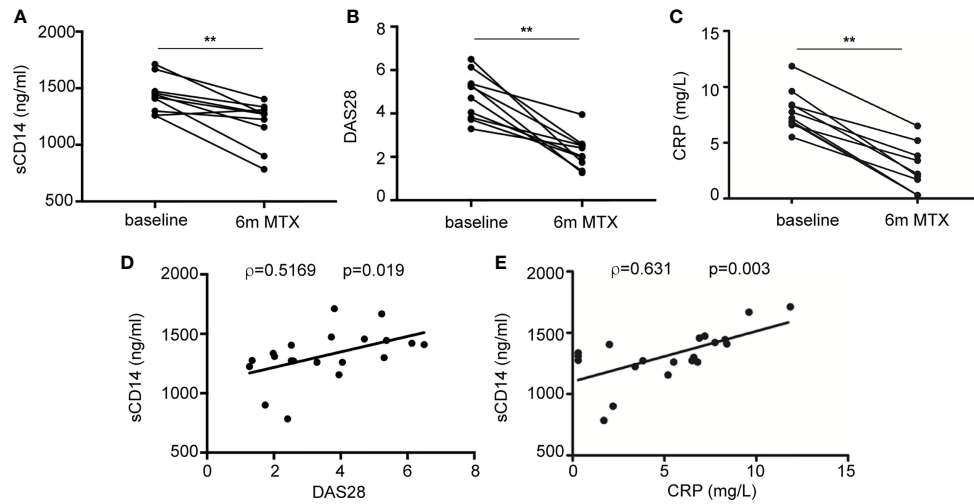


FIGURE 7 | Plasma level of sCD14 decreases in RA patients who are MTX responders. **(A)** sCD14 level in plasma from early RA patients at baseline and 6 months after initiating MTX treatment (15–25 mg/week), as determined by ELISA ($n = 10$, $**p < 0.01$, Wilcoxon test). Disease activity score (DAS28) **(B)** and C-reactive protein (CRP) **(C)** from early RA patients at baseline and 6 months after MTX treatment from the discovery cohort. Correlation between sCD14 and DAS28 **(D)** sCD14 and CRP **(E)** in early RA patients (two-tailed Spearman’s correlation). RA, rheumatoid arthritis; MTX, methotrexate; sCD14, soluble CD14.

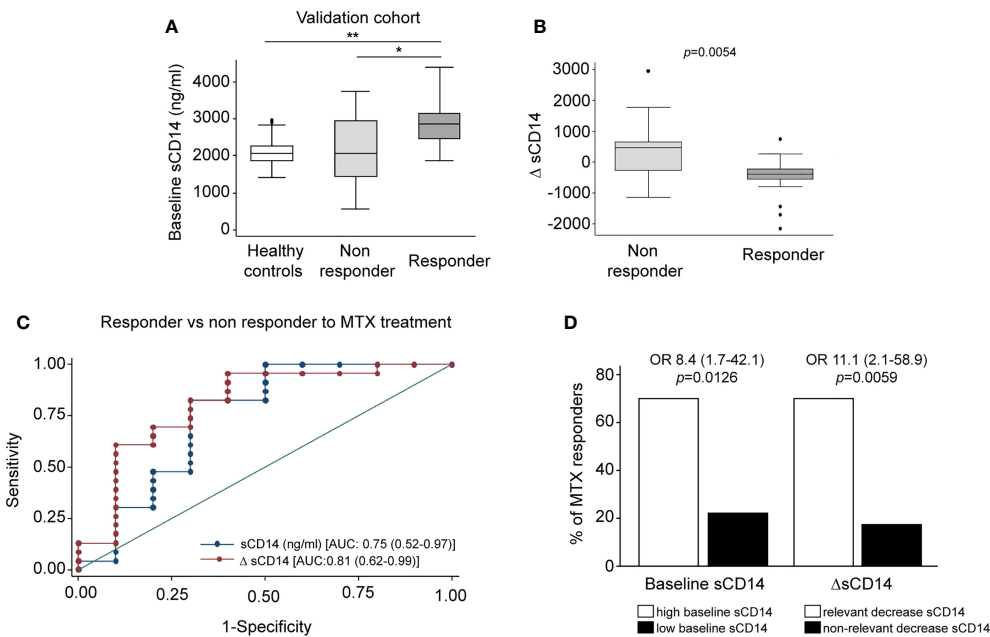


FIGURE 8 | Serum level of sCD14 decreases in RA patients who are MTX responders in a validation cohort. **(A)** Baseline sCD14 in healthy donors (white box, $n = 40$), MTX-non-responder (soft gray box, $n = 10$), and MTX-responder (dark gray box, $n = 23$) RA patients. Statistical significance respect to MTX-responders was determined through Mann–Whitney test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$). **(B)** Variation in sCD14 between baseline and 6 months’ follow-up visits (Δ sCD14: sCD14 value in 6-month visit – sCD14 value at baseline visit) in MTX-non-responder (soft gray box) and MTX-responder (dark gray box) RA patients. Data in panels A and B are shown as interquartile range (p75 upper edge of box, p25 lower edge, and p50 midline) as well as the p95 (line above box) and p5 (line below). **(C)** Receiver operating characteristic curve analysis to assess capacity of baseline sCD14 (blue line and dots) and Δ sCD14 (red line and dots) to discriminate between MTX-responder and MTX-non-responder RA patients. **(D)** Comparison of the percentage of MTX responders in patients with high (left white bar) versus low (left black bar) baseline sCD14 and in patients with relevant decrease of sCD14 (right white bar) versus non-relevant variation of sCD14 (right black bar). The cutoff for discriminating high and low sCD14 was 2,460 ng/ml, and the one to discriminate between relevant and not relevant decrease of sCD14 was 188 ng/ml, as described in the last section of *Results*. OR and its CI were estimated with the cs command of Stata 14.1 and the significance level with Fisher’s test. sCD14, soluble CD14; RA, rheumatoid arthritis; MTX, methotrexate.

DISCUSSION

OCM is a complex network of biosynthetic pathways that includes *de novo* biosynthesis of purines and thymidylate, amino acid metabolism, and methylation reactions (1). In the present report, we describe the impact of OCM on the functional and gene expression profile of GM-CSF-primed human monocyte-derived macrophages (GM-MØ). We have found that OCM blocker PMX induces the acquisition of a more proinflammatory and p53-dependent gene signature in human macrophages, an effect that resembles the transcriptomic changes triggered by MTX, another antifolate with OCM-blocking activity (**Figure 1** and **Supplementary Figure 1**) (21). Moreover, we describe that blocking OCM reprograms GM-MØ towards a tolerance state, as PMX-GM-MØ cells exhibit a reduced response to TLR ligands. LPS was used as a secondary stimulus because several TLR4 ligands have been detected in the synovial fluid of patients with active RA and also because low doses of LPS are commonly used to exemplify cross-tolerance in myeloid cells. The specificity of PMX effects was demonstrated by the absence of the inhibitory effect in the presence of FA, a reduced folate with high affinity for RFC (36). Mechanistically, PMX reduces LPS-induced p38, JNK, IRF3, and STAT1 activation; IκBα degradation; and inflammatory cytokine production in human macrophages. In line with these findings, PMX also diminished the expression of mCD14 and sCD14, a co-receptor for TLR4 required for MyD88-dependent signaling at low concentrations of LPS, and for LPS-induced TLR4 internalization into endosomes and activation of TRIF-mediated signaling (46, 47). Accordingly, PMX-GM-MØ cells exhibit diminished MyD88-dependent and TRIF-mediated signaling, as well as reduced cytokine production (IL-6 and IFNβ1), upon exposure to LPS. The relevance of sCD14 in the OCM-dependent pro-tolerant effect of PMX is supported by the ability of exogenous sCD14 to restore the LPS sensitivity of PMX-GM-MØ. Altogether, these results indicate that the global anti-inflammatory activity of PMX relies on its ability to induce a proinflammatory profile in GM-CSF-primed macrophages, making PMX-conditioned macrophages less responsive to secondary inflammatory stimuli. These results link OCM to innate immune tolerance (48) and demonstrate that antifolates promote a proinflammatory state in macrophages and, in parallel, trigger a loss of CD14 expression, all of which end up establishing a tolerant state and an impaired response to subsequent stimulation (LPS and LTA).

Cellular metabolism is a critical mediator of the reprogramming of myeloid cells that takes place during trained immunity (49). Increased aerobic glycolysis is a hallmark of β-glucan or *Bacillus Calmette–Guérin* (BCG)-induced trained immunity in monocytes (50, 51). Regarding innate tolerance, the metabolite itaconate inhibits LPS-mediated IκB induction and induces tolerance in human monocytes (52). The lipid and amino acid metabolisms are also important for the induction of trained immunity (49), as metabolites of the cholesterol synthesis pathway are crucial for establishing β-glucan-, BCG-, or oxidized low-density lipoprotein (oxLDL)-induced trained immunity in

macrophages (53). We now describe that exposure of human macrophages to antifolates (PMX or MTX) results in the acquisition of an innate tolerance state, thus demonstrating that the OCM is another metabolic circuit that critically mediates trained immunity.

CD14 acts both as a pattern recognition receptor (54, 55) and as a receptor for LPS (56). In the context of RA, Lewis et al. have recently defined three distinct histopathological entities based on transcriptional data from the synovium of early treatment-naive RA patients: fibroblastic pathotype, macrophage-rich myeloid pathotype, and lympho-myeloid pathotype (57). The analysis of CD14 mRNA expression in the three pathotypes (<https://peac.hpc.qmul.ac.uk/>) revealed that CD14 expression is higher in lymphoid pathotype (adjp 5.7e−0³ versus myeloid pathotype, adjp 6.8e−0⁷ versus fibroid pathotype), indicating that CD14 marks the lymphoid-rich pathotype with high plasma cell accumulation. Moreover, synovium CD14 expression correlated positively with disease activity (adjp 0.016) (57, 58). Along the same line, sCD14 levels are increased in RA synovial fluid and serum compared with osteoarthritis patients (59, 60). sCD14 plays an important role in mediating the immune responses to LPS of CD14-negative cells such as endothelial cells and epithelial cells and induces proinflammatory cytokines in fibroblast-like synovial cells from RA patients (61). The modulation of CD14 expression by antifolates that we now report supports the anti-inflammatory role of MTX in RA patients and leads us to suggest that MTX-treated RA patients would exhibit lower levels of sCD14 and mCD14 in myeloid cells, lower responsiveness to TLR4-dependent damage-associated molecular patterns (DAMPs), and a lower proinflammatory profile. In line with this hypothesis, we have observed that sCD14 level diminishes in serum of early RA patients responding to MTX treatment. Considering that MTX is the first line in RA treatment and the importance of taking advantage of the window of opportunity to achieve early remission, it would be of interest to select those patients with the highest odds to be MTX responders. In this regard, a low baseline sCD14 can identify patients who are MTX non-responders, in order to try a DMARD with other mechanism of action. We are aware that there is enough overlap of sCD14 baseline levels between responder and non-responder patients. In this case, it would be also useful to measure the variation in sCD14 levels that could help to better identify non-responder patients in doubtful cases. We acknowledge that a validation cohort with a larger number of patients should be analyzed in the future to gain more robust results.

On the other hand, it is well known that MTX withdrawal due to adverse events is more frequent than inefficacy (62). PMX is a chemotherapeutic drug with substantial activity against lung carcinomas usually considered as refractory to classical antifolates (63). Although not used as a DMARD in RA, PMX has been shown to suppress the release of TNFα from activated T cells of RA patients and also ameliorates experimental arthritis in a model of collagen-induced arthritis in rats, thus indicating that PMX exhibits an anti-inflammatory action both *ex vivo* and *in vivo* (12, 64). In spite of these antecedents, the anti-inflammatory

efficacy of PMX has not been previously tested in the case of innate immune cells. Our results indicate that besides a robust antifolate-mediated cytostatic effect, PMX exerts a huge reprogramming effect on human macrophages, thus opening further research of this drug to new opportunities beyond the limit of its actual clinical utility.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are publicly available. These data can be found here: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE159380> and GSE159380.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Hospital La Princesa Ethics Committee (PI-518, March 28, 2011). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SF-R, CB-A, RG, MT, IM, and AT-M designed the research, performed the research, and analyzed the data. LN, AV, RG-V, GJ, M-EM-C, and IG-A designed the research and analyzed the data. AP-K conceived the study, designed the research, analyzed

the data, and wrote the paper. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by grants PI17/00037 and PI20/00316 to AP-K; PI18/00371 to IG-A; and RIER RD16/0012/0007, RD16/0012/0011, and RD16/0012/0012 from Instituto de Salud Carlos III/FEDER to AP-K, M-EM-C, and IG-A and cofinanced by European Regional Development Fund “A way to achieve Europe” (ERDF). SF-R is supported by a contract from Instituto de Salud Carlos III (FI18/00109), and AT-M is supported by a PhD fellowship from the Autonomous Region of Madrid (PEJD-2019-PRE/BMB-16851).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Julia Villarejo for technical help and Dr. Angel L. Corbí, Dr. Juan Cañete, and Dr. Paloma Sánchez-Mateos for helpful discussions.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.776879/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Ducker GS, Rabinowitz JD. One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* (2017) 25(1):27–42. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.009
- Gonen N, Assaraf YG. Antifolates in Cancer Therapy: Structure, Activity and Mechanisms of Drug Resistance. *Drug Resist Update* (2012) 15(4):183–210. doi: 10.1016/j.drug.2012.07.002
- Fan J, Ye J, Kamphorst JJ, Shlomi T, Thompson CB, Rabinowitz JD. Quantitative Flux Analysis Reveals Folate-Dependent NADPH Production. *Nature* (2014) 510(7504):298–302. doi: 10.1038/nature13236
- de Gooijer CJ, Baas P, Burgers JA. Current Chemotherapy Strategies in Malignant Pleural Mesothelioma. *Trans Lung Cancer Res* (2018) 7(5):574–83. doi: 10.21037/tlcr.2018.04.10
- Hazarika M, White RM, Johnson JR, Pazdur R. FDA Drug Approval Summaries: Pemetrexed (Alimta). *Oncol* (2004) 9(5):482–8. doi: 10.1634/theoncologist.9-5-482
- Rossi G, Alama A, Genova C, Rijavec E, Tagliamento M, Biello F, et al. The Evolving Role of Pemetrexed Disodium for the Treatment of non-Small Cell Lung Cancer. *Expert Opin Pharmacother* (2018) 19(17):1969–76. doi: 10.1080/14656566.2018.1536746
- Qiu A, Jansen M, Sakaris A, Min SH, Chattopadhyay S, Tsai E, et al. Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell* (2006) 127(5):917–28. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.041
- Shih C, Chen VJ, Gossett LS, Gates SB, MacKellar WC, Habeck LL, et al. LY231514, a Pyrrolo[2,3-D]Pyrimidine-Based Antifolate That Inhibits Multiple Folate-Requiring Enzymes. *Cancer Res* (1997) 57(6):1116–23.
- Smolen JS, Landewe RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR Recommendations for the Management of Rheumatoid Arthritis With Synthetic and Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: 2019 Update. *Ann Rheum Dis* (2020) 79(6):685–99. doi: 10.1136/annrheumdis-2019-216655
- Cronstein BN, Aune TM. Methotrexate and its Mechanisms of Action in Inflammatory Arthritis. *Nat Rev Rheumatol* (2020) 16(3):145–54. doi: 10.1038/s41584-020-0373-9
- van Nies JA, Krabben A, Schoones JW, Huizinga TW, Kloppenburg M, van der Helm-van Mil AH. What is the Evidence for the Presence of a Therapeutic Window of Opportunity in Rheumatoid Arthritis? A systematic literature review. *Ann Rheum Dis* (2014) 73(5):861–70. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-203130
- Karatas A, Koca SS, Ozgen M, Dagli AF, Erman F, Sahin N, et al. Pemetrexed Ameliorates Experimental Arthritis in Rats. *Inflammation* (2015) 38(1):9–15. doi: 10.1007/s10753-014-0002-3
- Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host Microbe* (2011) 9(5):355–61. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.006
- Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained Immunity: A Program of Innate Immune Memory in Health and Disease. *Science* (2016) 352(6284):aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098
- Netea MG, Dominguez-Andres J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining Trained Immunity and its Role in Health and Disease. *Nat Rev Immunol* (2020) 20(6):375–88. doi: 10.1038/s41577-020-0285-6
- Song WM, Colonna M. Immune Training Unlocks Innate Potential. *Cell* (2018) 172(1–2):3–5. doi: 10.1016/j.cell.2017.12.034
- Choy EH, Panayi GS. Cytokine Pathways and Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* (2001) 344(12):907–16. doi: 10.1056/NEJM200103223441207
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid Arthritis. *Lancet* (2010) 376(9746):1094–108. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4
- McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* (2011) 365(23):2205–19. doi: 10.1056/NEJMra1004965

20. Soler Palacios B, Estrada-Capetillo L, Izquierdo E, Criado G, Nieto C, Muncio C, et al. Macrophages From the Synovium of Active Rheumatoid Arthritis Exhibit an Activin A-Dependent Pro-Inflammatory Profile. *J Pathol* (2015) 235(3):515–26. doi: 10.1002/path.4466
21. Muncio C, Soler Palacios B, Estrada-Capetillo L, Benguria A, Dopazo A, Garcia-Lorenzo E, et al. Methotrexate Selectively Targets Human Proinflammatory Macrophages Through a Thymidylate Synthase/P53 Axis. *Ann Rheum Dis* (2016) 75(12):2157–65. doi: 10.1136/annrheumdis-2015-208736
22. Muncio C, Dominguez-Soto A, Fuentelsaz-Romero S, Lamana A, Montes N, Cuevas VD, et al. Methotrexate Limits Inflammation Through an A20-Dependent Cross-Tolerance Mechanism. *Ann Rheum Dis* (2018) 77(5):752–9. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-212537
23. Smolen JS, Landewe R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR Recommendations for the Management of Rheumatoid Arthritis With Synthetic and Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: 2016 Update. *Ann Rheum Dis* (2017) 76(6):960–77. doi: 10.1136/annrheumdis-2016-210715
24. Visser K, Katchamart W, Loza E, Martinez-Lopez JA, Salliot C, Trudeau J, et al. Multinational Evidence-Based Recommendations for the Use of Methotrexate in Rheumatic Disorders With a Focus on Rheumatoid Arthritis: Integrating Systematic Literature Research and Expert Opinion of a Broad International Panel of Rheumatologists in the 3E Initiative. *Ann Rheum Dis* (2009) 68(7):1086–93. doi: 10.1136/ard.2008.094474
25. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Collaborative Initiative. *Ann Rheum Dis* (2010) 69(9):1580–8. doi: 10.1136/ard.2010.138461
26. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified Disease Activity Scores That Include Twenty-Eight-Joint Counts. Development and Validation in a Prospective Longitudinal Study of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* (1995) 38(1):44–8. doi: 10.1002/art.1780380107
27. Tate J, Ward G. Interferences in Immunoassay. *Clin Biochem Rev* (2004) 25(2):105–20.
28. Gonzalez-Alvaro I, Ortiz AM, Alvaro-Gracia JM, Castaneda S, Diaz-Sanchez B, Carvajal I, et al. Interleukin 15 Levels in Serum may Predict a Severe Disease Course in Patients With Early Arthritis. *PLoS One* (2011) 6(12):e29492. doi: 10.1371/journal.pone.0029492
29. Langmead B, Salzberg SL. Fast Gapped-Read Alignment With Bowtie 2. *Nat Methods* (2012) 9(4):357–9. doi: 10.1038/nmeth.1923
30. Li B, Dewey CN. RSEM: Accurate Transcript Quantification From RNA-Seq Data With or Without a Reference Genome. *BMC Bioinf* (2011) 12:323. doi: 10.1186/1471-2105-12-323
31. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene Set Enrichment Analysis: A Knowledge-Based Approach for Interpreting Genome-Wide Expression Profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102(43):15545–50. doi: 10.1073/pnas.0506580102
32. Fischer M. Census and Evaluation of P53 Target Genes. *Oncogene* (2017) 36(28):3943–56. doi: 10.1038/onc.2016.502
33. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI Gene Expression and Hybridization Array Data Repository. *Nucleic Acids Res* (2002) 30(1):207–10. doi: 10.1093/nar/30.1.207
34. Muse ED, Yu S, Edillor CR, Tao J, Spann NJ, Troutman TD, et al. Cell-Specific Discrimination of Desmosterol and Desmosterol Mimetics Confers Selective Regulation of LXR and SREBP in Macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* (2018) 115(20):E4680–E9. doi: 10.1073/pnas.1714518115
35. Kusnadi A, Park SH, Yuan R, Pannellini T, Giannopoulou E, Oliver D, et al. The Cytokine TNF Promotes Transcription Factor SREBP Activity and Binding to Inflammatory Genes to Activate Macrophages and Limit Tissue Repair. *Immunity* (2019) 51(2):241–57 e9. doi: 10.1016/j.immuni.2019.06.005
36. Matherly LH, Hou Z, Deng Y. Human Reduced Folate Carrier: Translation of Basic Biology to Cancer Etiology and Therapy. *Cancer Metastasis Rev* (2007) 26(1):111–28. doi: 10.1007/s10555-007-9046-2
37. Rackov G, Hernandez-Jimenez E, Shokri R, Carmona-Rodriguez L, Manes S, Alvarez-Mon M, et al. P21 Mediates Macrophage Reprogramming Through Regulation of P50-P50 NF-kappaB and IFN-Beta. *J Clin Invest* (2016) 126(8):3089–103. doi: 10.1172/JCI83404
38. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin Tolerance: New Mechanisms, Molecules and Clinical Significance. *Trends Immunol* (2009) 30(10):475–87. doi: 10.1016/j.it.2009.07.009
39. Park SH, Park-Min KH, Chen J, Hu X, Ivashkiv LB. Tumor Necrosis Factor Induces GSK3 Kinase-Mediated Cross-Tolerance to Endotoxin in Macrophages. *Nat Immunol* (2011) 12(7):607–15. doi: 10.1038/ni.2043
40. Yang TY, Chang GC, Chen KC, Hung HW, Hsu KH, Sheu GT, et al. Sustained Activation of ERK and Cdk2/cyclin-A Signaling Pathway by Pemetrexed Leading to S-Phase Arrest and Apoptosis in Human non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells. *Eur J Pharmacol* (2011) 663(1-3):17–26. doi: 10.1016/j.ejphar.2011.04.057
41. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, et al. Cutting Edge: Endotoxin Tolerance in Mouse Peritoneal Macrophages Correlates With Down-Regulation of Surface Toll-Like Receptor 4 Expression. *J Immunol* (2000) 164(7):3476–9. doi: 10.4049/jimmunol.164.7.3476
42. Murphy MB, Xiong Y, Pattabiraman G, Manavalan TT, Qiu F, Medvedev AE. Pellino-3 Promotes Endotoxin Tolerance and Acts as a Negative Regulator of TLR2 and TLR4 Signaling. *J Leukoc Biol* (2015) 98(6):963–74. doi: 10.1189/jlb.2VMA0515-229RR
43. Van Overmeire E, Stijlemans B, Heymann F, Keirsse J, Morias Y, Elkrim Y, et al. M-CSF and GM-CSF Receptor Signaling Differentially Regulate Monocyte Maturation and Macrophage Polarization in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* (2016) 76(1):35–42. doi: 10.1158/0008-5472.CAN.15-0869
44. Hamilton JA. Colony-Stimulating Factors in Inflammation and Autoimmunity. *Nat Rev Immunol* (2008) 8(7):533–44. doi: 10.1038/nri2356
45. Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD. Mechanism of Action of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis, and the Search for Biomarkers. *Nat Rev Rheumatol* (2016) 12(12):731–42. doi: 10.1038/nrrheum.2016.175
46. Zononi I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, et al. CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-Like Receptor 4. *Cell* (2011) 147(4):868–80. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.051
47. Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert SM, et al. CD11b/CD18 Acts in Concert With CD14 and Toll-Like Receptor (TLR) 4 to Elicit Full Lipopolysaccharide and Taxol-Inducible Gene Expression. *J Immunol* (2001) 166(1):574–81. doi: 10.4049/jimmunol.166.1.574
48. Palsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Targeting Immunometabolism as an Anti-Inflammatory Strategy. *Cell Res* (2020) 30(4):300–14. doi: 10.1038/s41422-020-0291-z
49. Dominguez-Andres J, Joosten LA, Netea MG. Induction of Innate Immune Memory: The Role of Cellular Metabolism. *Curr Opin Immunol* (2019) 56:10–6. doi: 10.1016/j.coi.2018.09.001
50. Cheng SC, Quintin J, Cramer RA, Shepardson KM, Saeed S, Kumar V, et al. mTOR- and HIF-1alpha-Mediated Aerobic Glycolysis as Metabolic Basis for Trained Immunity. *Science* (2014) 345(6204):1250684. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.011
51. Arts RJW, Carvalho A, La Rocca C, Palma C, Rodrigues F, Silvestre R, et al. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep* (2016) 17(10):2562–71. doi: 10.1016/j.celrep.2016.11.011
52. Dominguez-Andres J, Novakovic B, Li Y, Scicluna BP, Gresnigt MS, Arts RJW, et al. The Itaconate Pathway Is a Central Regulatory Node Linking Innate Immune Tolerance and Trained Immunity. *Cell Metab* (2019) 29(1):211–20 e5. doi: 10.1016/j.cmet.2018.09.003
53. Bekkering S, Arts RJW, Novakovic B, Kourtzelis I, van der Heijden C, Li Y, et al. Metabolic Induction of Trained Immunity Through the Mevalonate Pathway. *Cell* (2018) 172(1-2):135–46.e9. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.025
54. Zononi I, Granucci F. Role of CD14 in Host Protection Against Infections and in Metabolism Regulation. *Front Cell Infect Microbiol* (2013) 3:32. doi: 10.3389/fcimb.2013.00032
55. Leveque M, Simonin-Le Jeune K, Jouneau S, Moulis S, Desrués B, Belleguic C, et al. Soluble CD14 Acts as a DAMP in Human Macrophages: Origin and Involvement in Inflammatory Cytokine/Chemokine Production. *FASEB J Off Publ Fed Am Societies Exp Biol* (2017) 31(5):1891–902. doi: 10.1096/fj.201600772R
56. Zononi I, Tan Y, Di Gioia M, Springstead JR, Kagan JC. By Capturing Inflammatory Lipids Released From Dying Cells, the Receptor CD14 Induces Inflammation-Dependent Phagocyte Hyperactivation. *Immunity* (2017) 47(4):697–709 e3. doi: 10.1016/j.immuni.2017.09.010
57. Lewis MJ, Barnes MR, Blighe K, Goldmann K, Rana S, Hackney JA, et al. Molecular Portraits of Early Rheumatoid Arthritis Identify Clinical and

- Treatment Response Phenotypes. *Cell Rep* (2019) 28(9):2455–70.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.091
58. Humby F, Lewis M, Ramamoorthi N, Hackney JA, Barnes MR, Bombardieri M, et al. Synovial Cellular and Molecular Signatures Stratify Clinical Response to csDMARD Therapy and Predict Radiographic Progression in Early Rheumatoid Arthritis Patients. *Ann Rheum Dis* (2019) 78(6):761–72. doi: 10.1136/annrheumdis-2018-214539
59. Smiljanovic B, Radzikowska A, Kuca-Warnawin E, Kurowska W, Grun JR, Stuhlmuller B, et al. Monocyte Alterations in Rheumatoid Arthritis Are Dominated by Preterm Release From Bone Marrow and Prominent Triggering in the Joint. *Ann Rheum Dis* (2018) 77(2):300–8. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-211649
60. Smiljanovic B, Grutzkau A, Sorensen T, Grun JR, Vogl T, Bonin M, et al. Synovial Tissue Transcriptomes of Long-Standing Rheumatoid Arthritis Are Dominated by Activated Macrophages That Reflect Microbial Stimulation. *Sci Rep* (2020) 10(1):7907. doi: 10.1038/s41598-020-64431-4
61. Ichise Y, Saegusa J, Tanaka-Natsui S, Naka I, Hayashi S, Kuroda R, et al. Soluble CD14 Induces Pro-Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis Fibroblast-Like Synovial Cells *via* Toll-Like Receptor 4. *Cells* (2020) 9(7):1–95. doi: 10.3390/cells9071689
62. Lopez-Olivo MA, Siddhanamatha HR, Shea B, Tugwell P, Wells GA, Suarez-Almazor ME. Methotrexate for Treating Rheumatoid Arthritis. *Cochrane Database Systematic Rev* (2014) 6:CD000957. doi: 10.1002/14651858.CD000957.pub2
63. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, Manegold C, et al. Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients With Advanced-Stage non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* (2008) 26(21):3543–51. doi: 10.1200/JCO.2007.15.0375
64. van der Heijden JW, Assaraf YG, Gerards AH, Oerlemans R, Lems WF, Scheper RJ, et al. Methotrexate Analogues Display Enhanced Inhibition of TNF-Alpha Production in Whole Blood From RA Patients. *Scandinavian J Rheumatol* (2014) 43(1):9–16. doi: 10.3109/03009742.2013.797490

Conflict of Interest: IG-A reports personal fees from Lilly and Sanofi; personal fees and non-financial support from BMS; personal fees and non-financial support from AbbVie; research support, personal fees, and non-financial support from Roche Laboratories; and non-financial support from MSD, Pfizer, and Novartis, not related to the submitted work.

The remaining author declares that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Fuentelsaz-Romero, Barrio-Alonso, García Campos, Torres Torresano, Muller, Triguero-Martínez, Nuño, Villalba, García-Vicuña, Jansen, Miranda-Carús, González-Álvaro and Puig-Kröger. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.