

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto funcional del bloqueo selectivo de TGF-beta en el modelo murino de artritis inducida por colágeno**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Gonzalo Gil

Directora

María Galindo Izquierdo

**Madrid, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular

**Efecto Funcional del Bloqueo Selectivo  
de TGF-beta en el Modelo Murino de  
Artritis Inducida por Colágeno**

**Tesis Doctoral**

**Elena Gonzalo Gil**

Madrid, 2012

Directora: *María Galindo Izquierdo*



Esta tesis ha sido realizada en el laboratorio de enfermedades inflamatorias y autoinmunes del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (I+12), gracias a la beca de la Fundación Española de Reumatología de la convocatoria de 2010.

Agradecemos la colaboración del Dr. Javier Dotor (Digna Biotech) y la división de hepatología y terapia génica del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) por compartir el péptido con el que han sido realizados los experimentos en el modelo animal de artritis inducida por colágeno.



A María y Fernando,  
mis padres



## AGRADECIMIENTOS

Cuando llegas a este punto, te das cuenta de lo rápido que ha pasado el tiempo, y de todas las personas que han formado parte de esta etapa. Pero sobre todo que sin ellas, llegar hasta aquí habría sido muy difícil, por no decir imposible.

En primer lugar me gustaría dar las GRACIAS a la persona que me dio la oportunidad de comenzar este bonito camino, a mi directora de tesis, la doctora María Galindo Izquierdo. Gracias María por confiar en mí, por hacer del labo el mejor sitio de trabajo, por apoyarme siempre, por ser una gran compañera, una trabajadora nata, una persona increíble y sobre todo, gracias por tu amistad. Sabes que sin ti nada de esto habría sido posible. GRACIAS por demostrarme que podré contar contigo siempre.

GRACIAS al doctor Gabriel Criado, por su mente prodigiosa y por su CIA. Gracias por estar ahí siempre que te necesitamos. Parte de este trabajo te lo debo a ti. GRACIAS al doctor Jose Luís Pablos por sus consejos y por ser un ejemplo de trabajo y saber hacer.

Sin lugar a dudas, entre las personas que se merecen mi más sincero agradecimiento se encuentran mis compis reumáticos/as. GRACIAS a todos por ayudarme en esos días tan duros, por vuestras palabras de ánimo y por ser la mejor definición de buenos compañeros. GRACIAS Elena por enseñarme, por estar siempre ahí, no nos libramos nunca la una de la otra y eso me encanta. GRACIAS Alicia por ser siempre tan servicial, por ser un miembro de las 3 brujitas y por ser una excelente persona y amiga. GRACIAS María por tu constancia en el trabajo, y por estar ahí dentro y fuera del labo. Qué habría sido de mí sin nuestros momentos de risas. GRACIAS Vanessa por tu sonrisa, tu alegría y tu apoyo como una grandísima compañera. GRACIAS Manu, por ser un buen compañero, por tus gachas y por aguantarnos a todas. GRACIAS Regina por tu alegría y esfuerzo en el trabajo y sobre todo por ser como eres y hacerte querer tan rápido. GRACIAS Javi, por estar al pie del cañón aun cuando las cosas no salen como uno quiere, por tu trabajo y como no, gracias por tu búfer. Un GRACIAS muy especial para dos de mis mentoras, Bego y Mónica, por demostrarme que con trabajo y esfuerzo todo se consigue, por aceptarme como una más desde el primer día y por enseñarme mucho de lo que hoy sé hacer. GRACIAS, Minerva, Sara y César por vuestras ganas de aprender y vuestro esfuerzo. Vuestro paso por el laboratorio dejó huella.

GRACIAS a toda la gente del centro de investigación, por hacer que seamos una gran familia, en especial a Desi “reuma”, Noe, Sara porfis, Vanesa onco, Inés, Juan Carlos, Laura, Adolfo, Rocío, Nerea, Elena Tapia, Tere y Erika. Gracias por vuestras conversaciones, los momentos de trabajo compartidos, y como no, por los momentos de risas durante la comida. GRACIAS por ser como sois, por dejarme conocer un poquito más de cada uno de vosotros y por hacer que el centro sea un lugar muy especial. Gracias Julia, súper y Pedro porque además de vuestro buen hacer, sois los mejores en las fiestas de navidad.

GRACIAS a mis amig@s, Estefi, Desi, Laura, Susi, Ali, Andrea, Rocío, Carlitos y Mario, porque siempre estáis ahí cuando os necesito, porque poca gente puede dar las gracias de tener unos AMIGOS como vosotros. Gracias por vuestra alegría, nuestras conversaciones de querer cambiar el mundo, los viajes, los *alias* y simplemente por ser tan auténticos como sois. GRACIAS porque con amigos como vosotros se duerme mucho más tranquilo, y como dice Andrea, los amigos son la familia elegida, y yo ya he elegido. GRACIAS en especial a Estefi y a Rocío, por tantos años de amistad, por creer en mí y animarme en mi decisión de estudiar biología.

GRACIAS a mis chicas de la uni, Marías, Itxi, ruby e Isa, porque juntas hemos compartido y compartimos nuestra ilusión, por entenderme y por poder contar con vosotras.

GRACIAS a mi familia, en especial a mi hermano Carlos, Shandra, mis padrinos, mis abuelos, Ana y Maite. GRACIAS a mis padres, María y Fernando, por ser como sois, por darme siempre lo mejor, por ser mi ejemplo a seguir y por apoyarme incondicionalmente cuando tomo mis propias decisiones. Gracias por creer siempre en mí. GRACIAS por hacerme sentir tan orgullosa de vosotros y simplemente, gracias por existir.

GRACIAS a Gerard, mi pareja, mi amigo, mi compañero. Gracias porque siempre confías en mí, por tu cariño, tu amor y por no dejar de sorprenderme y demostrarme tanto cada día. Gracias por hacerme sentir la persona más especial y por saber que siempre podré contar contigo.

## **ABREVIATURAS**

---



Ac	Anticuerpos
ADN	Acido DesoxirriboNucleico
AIA	Antigen Induced Arthritis
anti-CCP	anti-Cyclic Citrullinated Peptides antibodies
AR	Artritis Reumatoide
ARN	Acido RiboNucleico
ARNm	ARN mensajero
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CAIA	<i>Collagen Antibody-Induced Arthritis</i>
CCR6	<i>C-C chemokine Receptor type 6</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CIA	<i>Collagen Induced Arthritis</i>
CII	Colágeno tipo II
CO-Smad	<i>COmmon partner-Smad</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte associated Antigen-4</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand</i>
DAB	<i>DiAminoBenzidine</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EAE	<i>Experimental Allergic Encephalomyelitis</i>
EDTA	<i>EthyleneDiamineTetraAcetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
Foxp3	<i>Forkhead box p3</i>
FR	Factor Reumatoide
FS	Fibroblastos Sinoviales
GAPDH	<i>GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor</i>
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
Hepes	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid</i>

HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IFA	<i>Incomplete Freund's Adjuvant</i>
IFN- $\gamma$	<i>InterFeroN-gamma</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IHQ	<i>InmunoHistoQuímica</i>
IL	<i>InterLeuquina</i>
IRF-4	<i>Interferon Regulatory Factor-4</i>
I-Smad	<i>Inhibitory-Smad</i>
KIR	<i>Killer-cells Immunoglobulin Receptor</i>
KO	<i>KnockOut</i>
LAP	<i>Latency-Associated Protein</i>
LB	<i>Linfocito B</i>
LPS	<i>LipoPoliSacárido</i>
LT	<i>Linfocito T</i>
LTBP	<i>Latent TGF-beta Binding Protein</i>
LTc	<i>Linfocito T citotóxico</i>
LTh	<i>Linfocito T helper</i>
Lyp	<i>Lymphoid specific phosphatase</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEC	<i>Matriz ExtraCelular</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIF	<i>Macrophage migration Inhibitory Factor</i>
MMP	<i>MetaloProteasas</i>
MS	<i>Membrana Sinovial</i>
NaCl	<i>Sodium Chloride</i>
NAFB002	<i>p17</i>
NF-AT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGS	<i>Normal Goat Serum</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OA	<i>OsteoArtritis</i>

OPG	OsteoProteGerina
PAGE-SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PGIA	<i>ProteoGlycan-Induced Arthritis</i>
PI3K	<i>PhosphatidyInositol 3-Kinase</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PIGF	<i>Placental Growth Factor</i>
PMA	<i>Phorbol Myristate Acetate</i>
PMSF	<i>PhenylMethylSulphonyl Fluoride</i>
PRKCQ	<i>Protein kinase C, theta</i>
PTPN22	<i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22</i>
RANKL	<i>Receptor Activator for Nuclear factor <math>\kappa</math>B Ligand</i>
RCLB	<i>Red Cell Lysis Buffer</i>
Roryt	<i>Retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma-t</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
R-Smad	<i>Receptor-regulated Smad</i>
rTGF- $\beta$ 1	<i>Human Recombinant CHO cell line</i>
SARA	<i>Smad Anchor for Receptor Activation</i>
SCW	<i>Streptococcal Cell Wall</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SE	<i>Shared Epitope</i>
Smurf	<i>Smad ubiquitination regulatory factor</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
STIA	<i>Serum Transfer-Induced Arthritis</i>
TA	Temperature Ambiente
TACI	<i>Transmembrane Activator and Calcium modulator</i>
TAGAP	<i>T-cell Activation RhoGTPase Activating Protein</i>
T-bet	<i>T-box-containing proteína Expressed in T cells</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>

TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
TNFAIP2	<i>Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 2</i>
TRAIL	<i>Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
Treg	células T reguladoras
Tris-HCl	<i>2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol hydrochloride</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WB	Western Blot
WT	<i>Wild Type</i>

## ÍNDICE

---



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. La artritis reumatoide.....	3
2. Factores etiológicos .....	4
2.1. Factores genéticos.....	5
2.2. Factores ambientales .....	6
3. Patogenia de la artritis reumatoide .....	7
3.1. Componentes celulares implicados en la patología de la AR.....	9
3.1.1. Papel de los LT .....	9
3.1.1.1. LT helper CD4+ .....	10
3.1.1.2. LT citotóxicos (LTc) CD8+.....	16
3.1.1.3. LT $\gamma\delta$ .....	17
3.1.1.4. Células Treg.....	18
3.1.1.5. Células NK .....	21
3.1.2. Papel de los LB.....	21
3.1.3. Neutrófilos .....	22
3.1.4. Macrófagos .....	22
3.1.5. Fibroblastos sinoviales .....	23
3.2. Mediadores solubles implicados en la patología de la AR.....	25
3.2.1. Papel de TGF- $\beta$ en la AR .....	28
4. Modelos animales de AR.....	34
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>39</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
1. Experimentos realizados con muestras procedentes de pacientes.....	49
1.1. Pacientes .....	49
1.2. Detección de proteínas Smad por inmunohistoquímica .....	49
1.3. Cultivos celulares de FS humanos.....	50
1.4. Fosforilación de Smad-2 en FS humanos mediante Western blot (WB)....	50
1.4.1. Extracción de proteínas totales.....	50
1.4.2. Inmunodetección de proteínas específicas .....	51
2. Experimentos realizados con muestras murinas.....	52
2.1. Detección de proteínas Smad tras el bloqueo de TGF- $\beta$ mediante WB .....	52

2.2.	Purificación de CII y confirmación de la pureza por WB.....	52
2.3.	Inmunización de los ratones .....	54
2.4.	Tratamiento de los ratones.....	54
2.5.	Monitorización de los ratones.....	55
2.5.1.	Evaluación clínica .....	55
2.5.2.	Tinción y evaluación histológicas .....	56
2.6.	Ensayo de proliferación celular. Respuesta específica al CII.....	57
2.7.	Análisis de la expresión de citoquinas en sobrenadantes de cultivo .....	58
2.8.	Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo (CMF).....	58
2.8.1.	Tinción intracelular de citoquinas .....	58
2.8.2.	Tinción de células Treg .....	59
2.9.	Extracción de ARN de tejido y PCR cuantitativa a tiempo real.....	61
2.10.	Cuantificación de los niveles séricos de Ac anti-CII.....	62
2.11.	Cuantificación de los niveles séricos de IL-6.....	63
3.	Análisis estadístico de los resultados .....	63
4.	Estrategia de búsqueda bibliográfica.....	64

## **RESULTADOS..... 65**

1.	Expresión de proteínas Smad en tejido sinovial reumatoide.....	67
2.	Fosforilación de Smad-2 en fibroblastos sinoviales .....	68
3.	P17 bloquea la vía de TGF- $\beta$ en tejido linfoide de ratón .....	69
4.	Bloqueo de TGF- $\beta$ en ratones inmunizados con CII.....	70
4.1.	Poblaciones celulares en ratones inmunizados tras el bloqueo de TGF- $\beta$ ..	70
4.2.	Respuesta de las células T a la estimulación con CII en ratones inmunizados tras el bloqueo de TGF- $\beta$ .....	72
4.3.	Cuantificación de los niveles séricos de IL-6 y Ac anti-CII en ratones inmunizados con CII.....	74
5.	Bloqueo de TGF- $\beta$ durante la fase de inducción de la artritis en ratones con CIA.....	75
5.1.	Efecto antiinflamatorio de p17 sobre el desarrollo clínico y la gravedad de la artritis.....	75
5.2.	Bloqueo de TGF- $\beta$ sobre el grado de inflamación y destrucción ósea y cartilaginosa en ratones con CIA.....	77

5.3.	Diferenciación y funcionalidad en las poblaciones de linfocitos T tratados con p17 .....	79
5.4.	Niveles séricos de IL-6 y Ac anti-CII tras el bloqueo de TGF- $\beta$ durante la fase de inducción de la artritis en ratones con CIA .....	82
5.5.	Expresión de citoquinas proinflamatorias y factores de transcripción en bazo y extremidades de ratones con CIA .....	85
6.	Bloqueo de TGF- $\beta$ en el modelo de CIA en ratones con la enfermedad establecida .....	87
6.1.	Efecto de p17 sobre el desarrollo clínico y la gravedad de la artritis.....	87
6.2.	Inflamación y destrucción ósea en ratones artríticos tras el tratamiento con p17.....	88
6.3.	Diferenciación y funcionalidad de los LT en ratones artríticos tratados con p17.....	91
6.4.	Niveles de IL-6 y anticuerpos anti-CII en ratones artríticos tratados con p17.....	94
6.5.	Expresión de citoquinas proinflamatorias y Treg en bazo y extremidades de ratones con CIA tras el bloqueo de TGF- $\beta$ .....	95
<b>DISCUSIÓN.....</b>		<b>99</b>
1.	Señalización de TGF- $\beta$ en FS y tejido sinovial de pacientes con AR.....	101
2.	TGF- $\beta$ en el desarrollo clínico y la gravedad de la artritis en el modelo murino de CIA .....	102
3.	TGF- $\beta$ en la inducción de CIA: diferenciación de las subpoblaciones de células T y consecuencias funcionales .....	103
4.	Papel de TGF- $\beta$ en ratones con la enfermedad establecida.....	106
<b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>113</b>
<b>ARTÍCULOS PUBLICADOS.....</b>		<b>139</b>



# INTRODUCCIÓN

---



## 1. La artritis reumatoide

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de etiología desconocida que se ajusta a un modelo genético poligénico, multifactorial, que parece desencadenarse por el efecto de agentes no específicos sobre una población genéticamente predispuesta. Afecta principalmente a las articulaciones, produciendo su deformidad y una severa discapacidad funcional (Bresnihan y Tak, 1999). La AR tiene un gran impacto en la calidad de vida del paciente, ya que afecta de manera significativa tanto a sus actividades diarias como sociales, psicológicas y económicas. Se calcula que en España hasta un 5% de todas las incapacidades laborales permanentes se deben directamente a la AR (Carmona y col., 2001). La incidencia de la AR aumenta en familiares entre 2-3 veces, y en gemelos monozigóticos tiene una concordancia del 20-30%, reflejando un evidente componente genético.

La patogenia de la AR se caracteriza por una alteración de las respuestas inmune e inflamatoria normales, de ahí que se considere como una enfermedad inflamatoria autoinmune o inmunomediada. La enfermedad se caracteriza por una alteración de la inmunidad celular y humoral y por una alteración de los elementos celulares residentes en el tejido conectivo de la Membrana Sinovial (MS), que se comportan de forma pseudotumoral, invadiendo y destruyendo los tejidos contiguos.

En la AR, la estructura anatómica primariamente afectada es el tejido o MS articular, una estructura especializada que tapiza la cavidad sinovial de las articulaciones diartrodiales. Esta membrana está constituida por una delgada capa de tejido conectivo que limita la cavidad articular (*lining*) ocupada por el líquido sinovial, y que se prolonga hasta la zona de la unión osteocartilaginosa a modo de manguito. Se trata de un tejido mesenquimal o conectivo con sus células residentes habituales, fundamentalmente macrófagos y Fibroblastos Sinoviales (FS), que se alinean en forma de una capa celular limitante de la cavidad articular (figura 1).

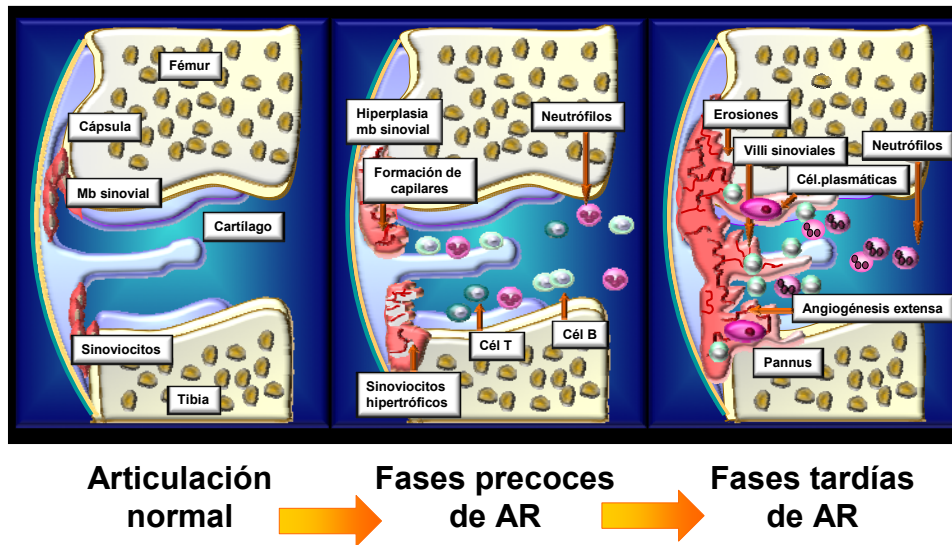


Figura 1. Cambios morfológicos producidos en la membrana sinovial reumatoide.

## 2. Factores etiológicos

La AR es una enfermedad de distribución universal, cuya prevalencia oscila entre 0,3-1,2% (De Blecourt, 1954; Kwoh, 1992; Kalla y Tikly, 2003). Afecta al 0,5-1% de la población adulta de nuestro país, siendo más frecuente en mujeres en una proporción aproximada 3:1, tal y como refleja el estudio EPISER realizado por la Sociedad Española de Reumatología (Carmona y col., 2002). La AR puede debutar a cualquier edad, aunque es más frecuente entre los 40-60 años (Sweeney y Firestein, 2004). La incidencia varía según el área geográfica y los diferentes grupos étnicos y, en fumadores, el riesgo de padecer AR es 1,5-2 veces mayor, aunque no existen muchos más datos epidemiológicos que impliquen a otros agentes causales exógenos conocidos.

La etiología de la AR es probablemente multifactorial, y aunque los modelos animales sugieren que depende tanto de factores exógenos como de una susceptibilidad genética, esta hipótesis no es absolutamente extrapolable a humanos. En la enfermedad humana no siempre existe un claro desencadenante externo que la preceda y, por otra parte, la AR humana es un síndrome que incluye diferentes formas clínicas, radiológicas y serológicas.

## 2.1. Factores genéticos

El primer factor genético que se descubrió asociado con enfermedades autoinmunes como la AR fue el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, de *Major Histocompatibility Complex*) (Winchester, 1981; Wandstrat y Wakeland, 2001), el locus más polimórfico de nuestro genoma constituido por dos tipos de genes que codifican para los antígenos HLA (de *Human Leukocyte Antigen*) de clase I y II. Los alelos más conocidos son los de HLA DRB1, subtipos de DR4 y DR1 que comparten una secuencia conservada de aminoácidos en la tercera región hipervariable del DR4, similar a “glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina” (QKRAA) (Gregersen y col., 1987). Esta secuencia o epítipo compartido (SE, de *Shared Epitope*) se sitúa en el dominio implicado en la presentación de antígenos al TCR (de *T Cell Receptor*). La hipótesis más aceptada es que estos individuos tienen especial afinidad para presentar antígenos potencialmente artritogénicos (Gregersen y col., 1987; Roudier, 2000). En este contexto, se ha observado una alta afinidad entre los péptidos citrulinados y el SE, lo que facilitaría la producción de anticuerpos (Ac) citrulinados (anti-CCP, de *anti-Cyclic Citrullinated Peptides antibodies*), de gran importancia en el desencadenamiento de la enfermedad. Los pacientes homocigotos para el SE y con estos autoanticuerpos padecen una AR más agresiva (Gregersen y col., 1987; Jawaheer y col., 1994; Klareskog y col., 2008; Snir y col., 2009). Otros estudios proponen como hipótesis el posible mimetismo de la molécula HLA con otras proteínas exógenas de virus y bacterias comunes, lo cual podría generar respuestas cruzadas entre antígenos exógenos y endógenos. No obstante, a pesar de la evidencia que asocia la presencia del SE con el desarrollo y gravedad de la AR, en algunas poblaciones el SE sólo aparece en la mitad de los pacientes (McDaniel DO y 1995; Balsa y col., 2000).

El segundo marcador genético más importante asociado a la AR es la variación en el gen *PTPN22* (de *Protein Tyrosine Phosphatase, Non-receptor type 22*), que codifica la fosfatasa citoplásmica Lyp (de *lymphoid specific phosphatase*), un potente regulador negativo de la activación de células T (Gregersen y col., 2006). Esta fosfatasa se expresa exclusivamente en células hematopoyéticas, con niveles elevados en neutrófilos y células *Natural Killer* (NK) (Begovich y col., 2004). Diversos estudios han mostrado una asociación entre el polimorfismo funcional 1858C→T del gen *PTPN22* con una mayor susceptibilidad a padecer AR (Begovich y col., 2004; Orozco y col., 2005).

Asimismo, dicho polimorfismo se ha encontrado significativamente asociado con la presencia de Ac anti-CCP (Johansson y col., 2006) y Factor Reumatoide (FR) (Lee y col., 2005), confiriéndole un papel como predictor del desarrollo de la AR.

Los análisis de GWAS (de *Genome-Wide Association Studies*) han confirmado la asociación de estos genes con la AR y han incluido otros genes como el *TNFAIP2* (de *Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 2*) o genes implicados en la regulación de la función de las células T (*GZMB* (de *Granzyme B*) y *PRKCQ* (de *protein kinase C, theta*) (2007).

Por último, existen otros genes asociados a una mayor susceptibilidad y/o gravedad de la AR, en su mayoría relacionados con la inmunidad, principalmente con mecanismos de presentación antigénica y activación de células T. Entre los genes asociados a una mayor susceptibilidad a la AR implicados en la activación de células T destacan *STAT* (de *Signal Transducer and Activator of Transcription*)-4 (Remmers y col., 2007; Orozco y col., 2008) y *TAGAP* (*T-cell Activation RhoGTPase Activating Protein*) (Chen y col., 2011). Asimismo, algunos estudios vinculan un polimorfismo de *CCR6* (de *C-C chemokine Receptor type 6*), con mayor riesgo de padecer AR (Stahl y col., 2010).

## 2.2. Factores ambientales

Los factores ambientales, en general, hacen referencia a infecciones y hábitos de vida. Aunque no existen pruebas epidemiológicas ni microbiológicas sólidas, algunos agentes infecciosos tanto virales (Virus linfotrópico humano tipo 1, Epstein-Barr, Herpes simple, Rubéola o Parvovirus B19) como bacterianos (*Mycoplasma*, *Mycobacteria*, *Campylobacter*, *Yersinia* o *Salmonella*) (Vaughan, 1990; Muller-Ladner y col., 1998; Saal y col., 1999), pueden contribuir en la aparición de alteraciones del sistema inmune que conducen al desarrollo de la AR en individuos genéticamente predispuestos. Otros factores ambientales que pueden participar indirectamente son la masa corporal, el antecedente de transfusiones sanguíneas o el tabaco (Silman y col., 1996; Stolt y col., 2003). El papel del tabaco como desencadenante de la enfermedad ha sido muy estudiado. Estudios recientes apuntan a una interacción entre los alelos del SE y el tabaco que aumenta el riesgo de presentar Ac anti-CCP (Lundstrom y col., 2009; Bang y col., 2010).

### 3. Patogenia de la artritis reumatoide

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada tanto por una alteración de la inmunidad celular y humoral, como por alteraciones de los elementos celulares residentes en el tejido conectivo que constituyen la MS. Múltiples células y mediadores inflamatorios se interrelacionan en un complejo entramado que tras iniciar una respuesta inflamatoria anómala, mantienen y perpetúan los mecanismos que conducirán a la destrucción articular.

Las primeras manifestaciones de la respuesta inflamatoria articular, parecen deberse a un cambio microvascular y a un incremento en el número de células del *lining* o hiperplasia sinovial. Aparte de la hiperplasia sinovial, existen numerosas características que definen la AR, como son la regulación alterada de citoquinas, aumento en el número de fibroblastos reumatoides (Mor y col., 2005) con proliferación en exceso de células inflamatorias (Pap y col., 2000) principalmente macrófagos y linfocitos, destrucción tisular y angiogénesis (Sakuma y col., 2007).

Las células endoteliales de los vasos se transforman y expresan en su superficie moléculas de adhesión (van Dinther-Janssen y col., 1990) que facilitan el reclutamiento de células mononucleares inflamatorias (Iguchi y Ziff, 1986; van den Berg y Bresnihan, 1999), en particular linfocitos T (LT) de memoria. La activación de estas células provoca la síntesis y liberación de citoquinas que actúan principalmente sobre macrófagos y Linfocitos B (LB), productores de inmunoglobulinas, FR y anti-CCP (Petersen y col., 1983; Dorner y Burmester, 2003).

Los macrófagos activados son los principales productores de citoquinas inflamatorias, entre ellas el TNF- $\alpha$  (de *Tumor Necrosis Factor-alpha*), que a su vez induce la liberación de otras citoquinas inflamatorias como IL (InterLeuquina)-1, IL-6 o IL-8, implicadas en la angiogénesis y la proliferación de los FS, induciendo PDGF (de *Platelet-Derived Growth Factor*), FGF (de *Fibroblast Growth Factor*), y TGF- $\beta$  (de *Transforming Growth Factor-beta*). La activación mantenida de estos tipos celulares provoca las alteraciones estructurales propias de la AR.

Los neutrófilos son el componente celular predominante en el líquido sinovial, mientras que las células T y macrófagos, y en menor medida las células B, plasmáticas, dendríticas y mastocitos, se acumulan en el *sublining* sinovial (Helder y col., 1973).

Desde el punto de vista histológico, la AR se caracteriza por un excesivo crecimiento del *lining* sinovial, con aumento en el número de sinoviocitos tipo A o macrófagos sinoviales y tipo B o FS. El importante crecimiento de la MS, formando el denominado *pannus*, contribuye a la destrucción del cartílago, hueso subcondral y ligamentos. Los osteoclastos por su parte, ejercen su acción osteolítica produciendo erosiones óseas que contribuyen a la destrucción progresiva de la articulación.

El proceso de angiogénesis comienza con la producción de proteasas desde células endoteliales activadas, que degradan la membrana basal (Moses, 1997). Como consecuencia, las células endoteliales migran a los tejidos, dónde proliferan y se diferencian formando nuevos vasos (Hirschi y D'Amore, 1996). La angiogénesis es un proceso altamente activo en la AR, especialmente en fases iniciales y está regulada por diversos mediadores proangiogénicos como TGF- $\beta$ , angiopoyetina y los factores de crecimiento de placenta (PIGF, de *Placental Growth Factor*), de fibroblastos y de crecimiento vascular (VEGF). Estos factores activan a las células endoteliales e inducen la producción de enzimas proteolíticas que degradan la membrana basal y la Matriz ExtraCelular (MEC) perivascular. Los vasos de nueva formación mantienen el estado crónico inflamatorio transportando células inflamatorias y supliendo con nutrientes y oxígeno al *pannus* (Koch, 1998). Sin embargo, también se ha descrito la presencia de vasos inmaduros en el tejido sinovial reumatoide, donde la densidad de los vasos aumenta en paralelo con la progresión de la enfermedad (Izquierdo y col., 2009).

Los FS en cultivo o transplantados a ratones inmunodeficientes muestran un fenotipo proinflamatorio y agresivo consistente en un aumento de su capacidad de adhesión, de la expresión de citoquinas y quimioquinas y de la producción de Metaloproteasas (MMP) y RANKL (de *Receptor Activator for Nuclear factor  $\kappa$ B Ligand*) (Muller-Ladner y col., 1996). Esto les permite perpetuar el reclutamiento de células mieloides y linfoides y destruir el cartílago y hueso articulares (Qu y col., 1994). Además, estas células muestran un crecimiento anormal, fundamentalmente mediado por una resistencia a la apoptosis dependiente de receptores de muerte estimulados por TNF- $\alpha$ , Fas o TRAIL (de *Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) (Drynda y col., 2005; Morel y col., 2005).

Las hiperplasias sinovial y vascular no son ilimitadas, sino que paralelamente al proceso de proliferación existe un proceso de eliminación activa de células endoteliales y de sinoviocitos. En ambos tipos se observa apoptosis, aunque esta compensación no

parece completa en la AR y el resultado neto es que predomina la proliferación de ambos tipos celulares.

### **3.1. Componentes celulares implicados en la patología de la AR**

#### **3.1.1. Papel de los LT**

Inicialmente, la AR fue considerada como una enfermedad dependiente de LB y mediada por inmunocomplejos formados por el FR. Sin embargo, esta teoría no explicaba la ausencia de FR en algunos pacientes con AR, ni la presencia de FR en otras enfermedades autoinmunes o en individuos sanos. El papel de los LT empezó a definirse tras describirse la presencia de agregados de células TCD4<sup>+</sup> (CD, de *Cluster of Differentiation*) de memoria CD45RO en fases tempranas de la enfermedad y por la asociación de la AR con determinados genes del HLA tipo II. Las moléculas HLA participan directamente en la presentación de antígenos a las células T por las células presentadoras de antígeno, macrófagos o células dendríticas, necesaria para su respuesta.

La MS en la AR contiene gran cantidad de células T (Firestein, 2003). Sin embargo, ha sido difícil definir el papel que éstas juegan en el mantenimiento y la propagación de la inflamación articular. Recientemente, la utilización en el tratamiento de la AR de una proteína de fusión CTLA-4 (de *Cytotoxic T-Lymphocyte associated Antigen-4*) humano que inhibe la coestimulación T vía CD28, ha proporcionado una prueba indirecta pero contundente de la importancia de los LT en la AR (Kremer y col., 2003). Los LT participan activando o interaccionando con otras células implicadas en el mantenimiento de la inflamación y en la destrucción articular mediante la liberación de mediadores locales. Igualmente interaccionan con las células B, promoviendo la producción de autoanticuerpos. Además, las células T inducen la liberación de proteasas en macrófagos, fibroblastos, condrocitos y osteoclastos.

### 3.1.1.1. LT helper CD4+

La diferenciación de las células Th está regulada por la interacción de células TCD4+ *naive* con células inmunes innatas que expresan MHC de clase II, moléculas coestimuladoras y citoquinas inflamatorias.

Inicialmente se describieron dos tipos de LT helper (LTh), Th1 y Th2, (Tada y col., 1978) capaces de actuar independiente y sinérgicamente para aumentar la respuesta de las células B. Ambos subtipos celulares, se diferencian por su patrón de producción de citoquinas (Mosmann y col., 1986). En presencia de IFN (InterFeroN)- $\gamma$ , las células presentadoras de antígeno secretan IL-12 favoreciendo la diferenciación de las células TCD4+ *naive* a Th1 (Hsieh y col., 1993), productoras de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  e implicadas en la inmunidad celular y en la protección frente a patógenos intracelulares (Manetti y col., 1994; McKnight y col., 1994). En su diferenciación intervienen factores de transcripción como STAT-4 activado por IL-12 (Jacobson y col., 1995) y T-bet (de *T-box-containing protein expressed in T cells*) estimulado por IFN- $\gamma$ . Por otra parte, en presencia de IL-4, las células TCD4+ *naive* se diferencian a células Th2 productoras de IL-4, IL-10, IL-5, IL-13 (Mosmann y col., 1986; Mosmann y Coffman, 1989) e IL-25 (Fort y col., 2001) y median la inmunidad humoral y las respuestas alérgicas. En este caso, STAT-6 activado por IL-4, induce la expresión de GATA-3, favoreciendo el desarrollo de las células Th2 (figura 2).

Clásicamente se ha asumido que la AR era una enfermedad de tipo Th1 mediada por células productoras de IFN- $\gamma$  con ausencia de citoquinas Th2, debido al bloqueo de la artritis observado en ratones tratados con Ac específicos o deficientes en la subunidad p40 de IL-12 (McIntyre y col., 1996). Sin embargo, numerosos trabajos posteriores hicieron pensar en un subtipo celular diferente responsable del desarrollo de la enfermedad. Por un lado, se describió la existencia de IL-23 (Oppmann y col., 2000), un miembro de la familia de IL-12 implicado en el desarrollo de las células T CD4 productoras de IL-17, que comparte la subunidad p40, aunque con una cadena diferente (IL-23p19 en vez de IL-12p35). En este sentido, sólo aquellos ratones deficientes en la subunidad IL-12p35 eran susceptibles al desarrollo de CIA (Murphy y col., 2003). Por otro lado, se evidenció el desarrollo de la artritis en ratones tratados con Ac anti-IFN- $\gamma$  y en ratones deficientes en IFN- $\gamma$  o en la señalización mediada por su receptor (Vermeire y col., 1997; Chu y col., 2003).

El IFN- $\gamma$ , es capaz de activar macrófagos que contribuyen al proceso inflamatorio aumentando la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- $\alpha$ , causando daño del cartílago articular (van Roon y col., 1995). Asimismo, estimula la producción de Ac IgG, los cuales se unen con elevada afinidad a receptores Fc $\gamma$  y proteínas del complemento (Abbas y col., 1996). En la MS reumatoide se encuentra expresión de IFN- $\gamma$  y otras citoquinas Th1, aunque en menor medida que otras citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 (Firestein, 2003).

Diversos estudios han mostrado el papel de IL-4 en la AR, capaz de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias, la proliferación de los sinoviocitos y la destrucción y degradación del cartílago articular (Dechanet y col., 1993) disminuyendo la producción de MMP y condrocitos. Asimismo, un estudio reciente muestra un descenso en los niveles de CXCR3 y el receptor de IL-12 (marcadores de Th1) y un aumento en los receptores CCR4 e IL-4R (marcadores de respuesta Th2) tras la terapia con anti-TNF en pacientes con AR (Herman y col., 2011). El papel del factor de transcripción GATA-3 como regulador de la artritis ha sido demostrado *in vivo* en ratones transgénicos GATA-3 con artritis experimental, los cuales presentan niveles reducidos de IL-17 y Ror $\gamma$ t (de *Retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma-t*) y una reducción de la inflamación articular (van Hamburg y col., 2009) con aumento en la expresión de citoquinas Th2.

Recientemente, se ha descrito una nueva línea de células TCD4<sup>+</sup> efectoras relacionadas con la autoinmunidad, las Th17, caracterizadas por la producción de IL-17 (Harrington y col., 2005; Park y col., 2005), y potencialmente inhibidas por IFN- $\gamma$  e IL-4. Un estudio realizado *in vivo* en un modelo animal de artritis, ha demostrado que el bloqueo de IFN- $\gamma$  acelera el curso de la artritis y aumenta los niveles de IL-17 tanto en suero como en articulación (Sarkar y col., 2009). Las células Th17 son cruciales en la defensa frente a infecciones fúngicas (Huang y col., 2004) y bacterias extracelulares (Happel y col., 2005). Muchas investigaciones actuales desarrolladas en modelos animales demuestran la relevancia de IL-17 (Murphy y col., 2003), al tiempo que estudios descriptivos de perfiles de citoquinas muestran la abundancia de esta citoquina en la sinovial reumatoide (Chabaud y col., 1999; Ziolkowska y col., 2000). Esta citoquina actúa sobre células epiteliales, endoteliales, fibroblastos y células mieloides, induciendo la secreción de diferentes mediadores como IL-8, CXCL [*chemokine (C-X-C motif Ligand)*]-1, CXCL6, GM-CSF (de *Granulocyte-Macrophage-Colony-*

*Stimulating Factor*), TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . La IL-17 induce la activación de RANK-L en condrocitos y osteoblastos (Lubberts y col., 2003) favoreciendo la erosión de hueso y cartílago y la osteoclastogénesis y estimula la actividad MMP de la matriz (Koenders y col., 2006). Además, IL-17 promueve la granulopoyesis y la acumulación de neutrófilos para la eliminación de patógenos (Forlow y col., 2001).

Las dianas celulares y los efectos biológicos de la IL-17 en modelos murinos son consistentes con el papel clave de las células Th17 en la sinovitis, el daño articular y la destrucción de hueso y cartílago (Pollinger y col., 2011). Diversos estudios han definido el papel de la IL-17 no solo en la inducción de la inflamación local de las articulaciones en ratones con CIA (de *Collagen Induced Arthritis*), sino también en la activación de las células T específicas para el CII en la fase temprana de la enfermedad (Nakae y col., 2003). De la misma manera, el bloqueo de la IL-17 en una fase tardía de la enfermedad puede reducir la producción de citoquinas proinflamatorias, así como la gravedad del proceso inflamatorio (Lubberts y col., 2004). Al principio, se asumió que la producción de esta citoquina dependía de las células Th1 ya que se describió siempre en asociación con IFN- $\gamma$  pero no con IL-4 en las células T procedentes de la sinovial reumatoide (Chabaud y col., 1999).

Las características fenotípicas y funcionales de las Th17 murinas están bastante definidas y existe mucha información sobre los factores implicados en su diferenciación y activación. Inicialmente, se describió que la diferenciación de células T $\alpha\beta$  CD4+ *naive* a células Th17 murinas era dependiente de la presencia de TGF- $\beta$  e IL-6 (Bettelli y col., 2006; Mangan y col., 2006; Veldhoen y col., 2006), y de la activación de los factores de transcripción Ror $\gamma$ t y Ror $\alpha$  (Ivanov y col., 2006; Yang y col., 2008). En contraste con lo que ocurre en la diferenciación de las células Th1 y Th2, en la que es necesaria la presencia de IFN- $\gamma$  e IL-4 respectivamente, la diferenciación y expansión de las células Th17 no requiere la presencia de IL-17. Diversos estudios han mostrado, por otra parte, que la IL-21, un miembro de la familia de citoquinas IL-2, coopera con TGF- $\beta$  para inducir la diferenciación de células Th17 en ausencia de IL-6 (Korn y col., 2007; Nurieva y col., 2007). En este sentido, células T deficientes en el receptor de IL-21, no son capaces de generar una respuesta Th17 (Korn y col., 2007; Nurieva y col., 2007). La IL-21 es un factor regulador importante en la producción de IgG en la respuesta humoral dependiente de células T (Mehta y col., 2004; Leonard y Spolski, 2005). En asociación con IL-23, inducen Ror $\gamma$ t, un factor de transcripción que en

sinergismo con STAT-3 promueve la expresión de IL-17 (Zhou y col., 2007). Otros autores han descrito que la delección en células T de los genes que codifican la transcripción de STAT-3, impide la producción de IL-17 (Yang y col., 2011). Los miembros de la familia de proteínas STAT, activados por diversas citoquinas, proporcionan una regulación, positiva o negativa, en el desarrollo de las Th17. De hecho, estudios de GWAS han asociado la señalización de diversas citoquinas y STAT con varias enfermedades autoinmunes. STAT-3 es necesario para la expresión de los genes IL-17 y *Roryt*, análogo a lo que ocurre con STAT-4 y STAT-6 en la diferenciación de Th1 y Th2, respectivamente (Mathur y col., 2007).

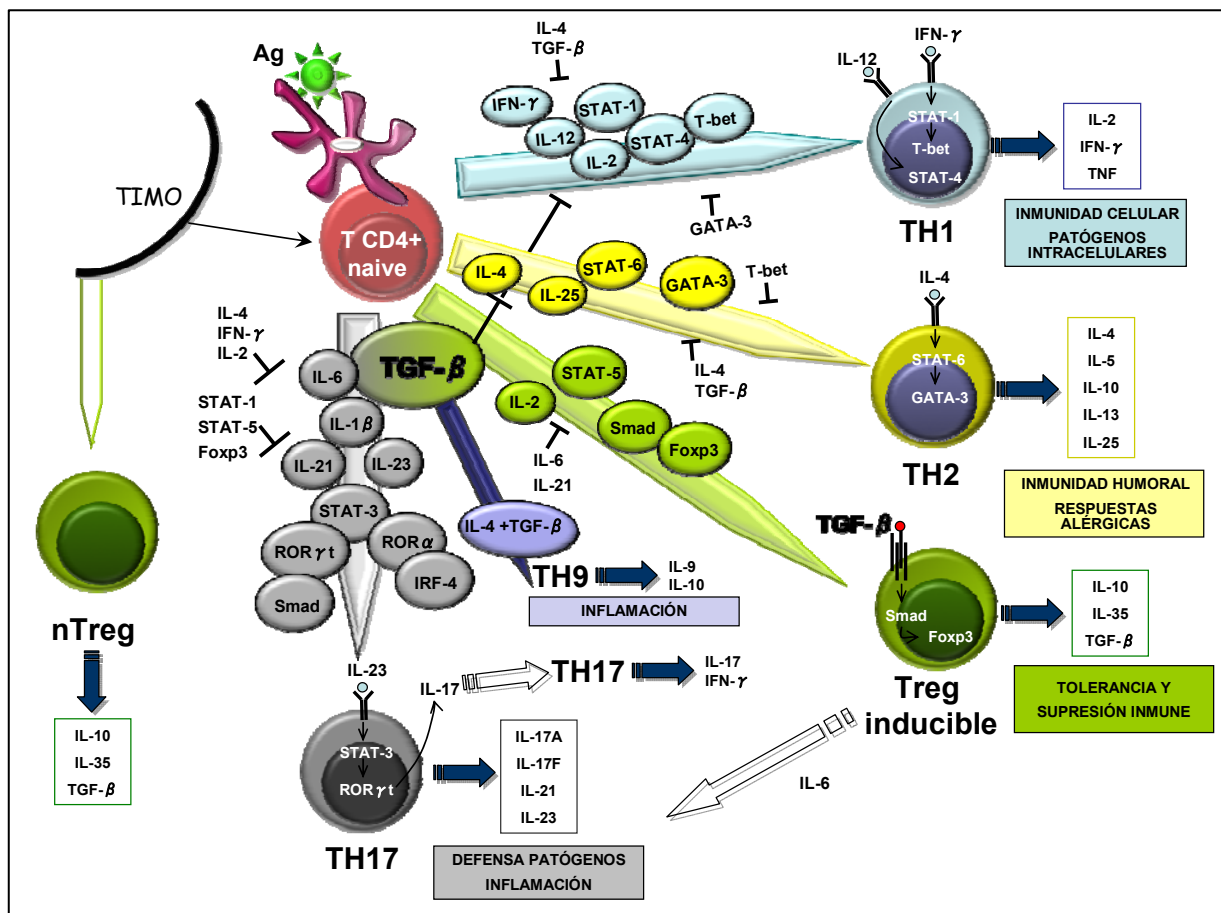


Figura 2. Proceso de diferenciación de las células T naive.

Aunque la IL-6 activa tanto STAT-3 como STAT-1, la activación de STAT-3 se mantiene mientras que la activación de STAT-1 está suprimida en las células Th17

(Kimura y col., 2007). De hecho, IL-27 e IFN- $\gamma$  inhiben el desarrollo de las células Th17 por un mecanismo dependiente de STAT-1. Otros factores de transcripción implicados son el IRF-4 (de *Interferon Regulatory Factor-4*), que participa tanto en la diferenciación de las células Th2 como en las Th17 (Brustle y col., 2007) y T-bet, regulador negativo de las Th17 (Rangachari y col., 2006) y capaz de suprimir el desarrollo de la artritis (Kondo y col., 2012).

De forma paralela, se ha descrito el papel de la señalización de la IL-1 en el desarrollo de las células Th17. La expresión de su receptor (IL-1R1) en células T es necesaria para la diferenciación de las células Th17 e induce la expresión de IRF-4 y Ror $\gamma$ t (Chung y col., 2009). Por lo tanto, IL-1 favorece la expresión génica de IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-23R, el receptor de la IL-23 (Sha y Markovic-Plese, 2011). Ratones deficientes en el antagonista de IL-1R, no deficientes en IL-17, desarrollan artritis espontánea debida a la activación de IL-23 y la consecuente diferenciación de las células Th17 (Horai y col., 2000).

La IL-23 es producida por células dendríticas activadas e induce la supervivencia y expansión de las células Th17 previamente diferenciadas (Veldhoen, Hocking et al. 2006). En ausencia de IL-23, las células Th17 se detienen en una fase temprana de su activación, su proliferación disminuye, y por lo tanto, se reduce el porcentaje de células Th17 efectoras en los nodos linfoides (McGeachy y col., 2009). Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que la diferenciación de las células Th17 murinas en EAE (de *Experimental Allergic Encephalomyelitis*), puede ocurrir en ausencia de TGF- $\beta$  y en presencia de IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$  (Ghoreschi y col., 2010), similar a lo propuesto inicialmente en humanos. Estas células Th17 inducidas por IL-23 con fenotipo patogénico, coexpresan Ror $\gamma$ t y T-bet y pueden dar lugar a células productoras de IL-17/IFN- $\gamma$ , a diferencia de las células Th17 inducidas por TGF- $\beta$ , consideradas como no patogénicas.

La diferenciación de las Th17 humanas tiene una enorme flexibilidad y plasticidad. Un ejemplo de ello es que se han descrito células productoras sólo de IL-17 y otras que producen tanto IL-17 como IFN- $\gamma$  (Annunziato y col., 2007). Se desconoce si corresponden a dos subtipos celulares distintos o si están relacionados durante el desarrollo. Ambos subtipos expresan CCR6 e IL-23R en su superficie, pero las células que sólo sintetizan IL-17 expresan además CCR4 y las que producen IL-17/IFN- $\gamma$  expresan CXCR3 y expresan niveles similares de los factores de transcripción Ror $\gamma$ t y

T-bet. Funcionalmente, el primer subtipo participa en la defensa frente a *Candida albicans* y el segundo lo hace frente a *Mycobacterium tuberculosis* (*M. Tuberculosis*). Su diferenciación no depende de la presencia de TGF- $\beta$ , y la síntesis de IL-17 puede inducirse por múltiples vías como la activación del TCR a través del factor de transcripción NF-AT (de *Nuclear Factor of Activated T cells*) o en presencia de IL-23 que activa la expresión de STAT-3 y STAT-4 (Chen y col., 2007; Chen y O'Shea, 2008). Otros trabajos, apuntan a la presencia de IFN- $\gamma$ , que junto con IL-12, producen células Th1/Th17, a partir de células Th17 (Lexberg y col., 2010). Quizá el rasgo más distintivo de las células Th17 tanto productoras de IL-17 como de IL-17/IFN- $\gamma$  es que son altamente resistentes al efecto regulador de las Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>bright</sup>Foxp3<sup>+</sup> (de *Forkhead box p3*).

En la diferenciación de las Th17 humanas, diversos mecanismos pueden estar implicados. En primer lugar, se definió que la diferenciación de las células Th17 humanas ocurría en ausencia de TGF- $\beta$  (Acosta-Rodriguez y col., 2007), y que la combinación de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23 eran capaces de actuar sobre células T de memoria para producir IL-17. Sin embargo, otros trabajos exponen un papel de TGF- $\beta$ , que junto con IL-21 y la expresión de Rorc2 promueven la diferenciación de TCD4<sup>+</sup> *naive* a células Th17 (Yang y col., 2008). En este sentido, TGF- $\beta$ , a través de IL-21, suprimiría la inducción de T-bet. Los últimos trabajos, apuntan a una interacción de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea o FS con células T como promotoras de la activación y expansión de las células Th17, las cuales podrían contribuir a la cronicidad de la AR (Eljaafari y col., 2012).

Recientemente se ha descrito un nuevo subtipo de células Th, las Th9, productoras de IL-9 e IL-10. La diferenciación de estas células a partir de células T *naive* depende de TGF- $\beta$  e IL-4 (Dardalhon y col., 2008), aunque el tratamiento de células Th2 con TGF- $\beta$  también es capaz de producir células Th9. A pesar de la producción de IL-10, al no expresar Foxp3, no se consideran células reguladoras sino células promotoras de la inflamación. De hecho, aunque su papel en la AR no ha sido investigado, en otros modelos de enfermedad inflamatoria como la EAE se ha señalado que pueden actuar como inductoras de la inflamación (Jager y col., 2009). Asimismo, se ha demostrado que la estimulación con TGF- $\beta$  e IL-1- $\beta$  induce células CD4 IL-9<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> en pacientes con diabetes autoinmune (Beriou y col., 2010), de ahí su posible papel en otras patologías autoinmunes.

Las células Th22 se caracterizan por producir IL-22 pero no IL-17 o IFN- $\gamma$  (Trifari y col., 2009) y expresar CCR10 en su superficie. A diferencia de las células Th9, para su diferenciación no es necesaria la presencia de TGF- $\beta$ . Este subtipo celular fue identificado por primera vez en enfermedades inflamatorias de la piel. En pacientes con AR, se ha observado que la presencia de células Th22 y los niveles elevados de IL-22 correlacionan con parámetros clínicos de enfermedad (Zhang y col., 2011).

### **3.1.1.2. LT citotóxicos (LTc) CD8+**

Los LTc están encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular reconociendo células infectadas o tumorales para destruirlas mediante moléculas que activan la apoptosis de la célula diana. Los LTc constituyen aproximadamente un 40% del infiltrado total de LT en la sinovial reumatoide (McInnes, 2003). Las células TCD8+ efectoras de la sinovial reumatoide, inducen la síntesis de granzima B y citoquinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 o IL-6), las cuales juegan un papel importante en el mantenimiento de la sinovitis crónica en el modelo de ratón K/BxN de artritis crónica espontánea (Raposo y col., 2010). Sin embargo, el papel de las células CD8+ en el inicio de la artritis no está muy definido, como demuestran numerosos estudios realizados en modelos animales. Unos autores apuntan a su importancia como supresoras de la artritis (Kadowaki y col., 1994), mientras que otros muestran un papel de las células CD8+ como desencadenantes de la enfermedad (Tada y col., 1996), aunque únicamente en la fase previa al refuerzo con Colágeno tipo II (CII). Incluso se ha postulado que la depleción de las células CD8+ no afecta al desarrollo de la artritis (Ehinger y col., 2001). El papel de TGF- $\beta$  en las células CD8+ es múltiple. Por un lado, TGF- $\beta$  induce la expresión de Foxp3 en las células CD8+, dando lugar a células TregCD8+. Por otro lado, es capaz de suprimir la expresión de IFN- $\gamma$  y perforina producida por las células CD8+, y controlar su proliferación (Ahmadzadeh y Rosenberg, 2005). Aparte de las células TCD8+ secretoras de granzima, se ha descrito otro subtipo de células proinflamatorias TCD8+ productoras de IL-17, no productoras de granzima, implicadas en el reclutamiento celular pero con baja actividad citotóxica (Huber y col., 2009). Dichas células se diferencian gracias a IL-6 o IL-21 en

combinación con TGF- $\beta$ , y se caracterizan por una elevada expresión de STAT-3 y Ror $\gamma$ t.

### 3.1.1.3. LT $\gamma\delta$

Los LT  $\gamma\delta$  poseen un TCR específico compuesto por las cadenas glicoproteicas  $\gamma\delta$  y constituyen aproximadamente el 5% del total de los LT. Estudios previos realizados mediante citometría de flujo, ya mostraban la presencia de células T $\gamma\delta$  en sangre periférica (Kowal-Bielecka y col., 2001) y en mayor medida en el tejido sinovial de pacientes con AR (Brennan y col., 1988). Las células T $\gamma\delta$  producen elevadas cantidades de citoquinas efectoras, incluyendo IL-17 e IFN- $\gamma$ , inducen polarización funcional de células T $\alpha\beta$  y la eliminación directa de patógenos (Roark y col., 2008). Estudios basados en el modelo de CIA en ratones muestran el papel de estas células como principales productoras de IL-17 (Ito y col., 2009; Martin y col., 2009) en la articulación inflamada. Sin embargo, el desarrollo de la artritis en ratones deficientes en células T $\gamma\delta$  ha demostrado que estas células no son necesarias para la inducción de CIA (Corthay y col., 1999), a diferencia de lo que ocurre con la ausencia de células T $\alpha\beta$ . Las células T $\gamma\delta$  no reconocen el CII pero sí proliferan en respuesta a IL-23, de ahí su papel inflamatorio en fases más tardías. La diferenciación de las células T $\gamma\delta$  productoras de IL-17 no ha sido tan estudiada como la diferenciación de las Th17. Sin embargo, se ha sugerido que la producción de IL-17 en estas células podría estar mediada por citoquinas inflamatorias, más que por un proceso mediado por la señal del TCR. Las células T $\gamma\delta$  productoras de IL-17 expresan Ror $\gamma$ t, IL-23R, TLR2 y CCR6, el receptor de CCL20, una quimioquina expresada en FS y regulada en procesos inflamatorios (Martin y col., 2009). Además de producir IL-17, producen IL-21 e IL-22 en respuesta a IL-1 $\beta$  e IL-23 y son capaces de amplificar la producción de IL-17 en células Th17 (Sutton y col., 2009).

### 3.1.1.4. Células Treg

Las células Treg son una subpoblación especializada de LT que actúa suprimiendo la activación del sistema inmunitario, para mantener la homeostasis y favorecer la tolerancia inmune. Defectos en la función de las células Treg pueden dar lugar al desarrollo de la autoinmunidad (Brunkow y col., 2001), mientras que un aumento en su función puede conducir a la supresión de la inmunidad tumoral. Uno de los factores patogénicos propuestos en la sinovitis crónica es un defecto de los mecanismos fisiológicos que controlan la respuesta inflamatoria, entre los que se encuentran estas células Treg. Las células Treg humanas fueron caracterizadas por primera vez como células TCD4<sup>+</sup> con expresión constitutiva de la proteína transmembrana CD25, que corresponde a la cadena *alpha* del receptor de la IL-2 (Sakaguchi y col., 1995).

Las células Treg pueden desarrollarse dentro del timo a partir de precursores de células TCD4<sup>+</sup> en presencia de TGF- $\beta$  e IL-2, dando lugar a células Treg naturales (nTreg) productoras del factor de transcripción Foxp3 (Fontenot y col., 2005). Estas células expresan el factor de transcripción Helios, que se une al promotor de Foxp3 para regular su expresión (Getnet y col., 2010). En la periferia, las células TCD4<sup>+</sup> *naive* pueden convertirse en células Treg inducibles (iTreg) a través de la señalización de STAT-5 en presencia de TGF- $\beta$ , incrementando así la expresión de Foxp3 (Chen y col., 2003). La señalización a través de TGF- $\beta$  en las células TCD4<sup>+</sup> es absolutamente necesaria para inducir la expresión de Foxp3, ya que se ha demostrado que células TCD4<sup>+</sup> deficientes en dicha señalización no pueden generar células Treg/Foxp3<sup>+</sup> tanto *in vivo* como *in vitro* (Fantini y col., 2004; Liu y col., 2008). Por el contrario, citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-21 pueden inhibir la diferenciación de las iTreg inducida por TGF- $\beta$ . Las células Treg secretan pequeñas cantidades de IL-2 e IFN- $\gamma$ , mientras que producen elevadas cantidades de IL-10, IL-35 y TGF- $\beta$  (Nakamura y col., 2001; Collison y col., 2007), favoreciendo la supresión inmune. Las células Treg inhiben la proliferación de las células T y su producción de citoquinas y, en este sentido, su déficit se ha asociado a procesos autoinmunes tanto en ratones como en humanos. Asimismo, las células Treg ejercen una función reguladora en monocitos, macrófagos y células B. Las células Treg generadas durante la respuesta inmune normal, se caracterizan por expresar los marcadores de superficie CD25, CD27 y bajos niveles CD127 (cadena alfa del receptor de IL-7) (Liu y col., 2006; Seddiki y col., 2006), así como el factor de transcripción Foxp3.

Hasta el momento, se han descrito otros tipos de células con capacidad reguladora: las células Tr1 que ejercen su función supresora dependiente de la presencia de IL-10 (Roncarolo y col., 2006) y pueden desarrollarse a partir de células Th1 o Th2, células Th3 productoras de TGF- $\beta$  (Chen y col., 1994) y células Treg CD8+ que pueden ejercer una función supresora muy potente aunque su papel *in vivo* aún no está muy definido. Muy recientemente, se ha descrito un tipo de células iTreg productoras de IL-35, las iT35. La señalización de estas células está mediada por los factores de transcripción STAT-1 y STAT-4. IL-35 suprime la proliferación de las células T y produce células iT35 a partir de células T *naive* (Collison y col., 2012).

La incapacidad relativa para controlar la sinovitis crónica puede deberse bien a que las células CD4+CD25- no respondan a los efectos reguladores de las células Treg o bien a un fallo primario de éstas. De acuerdo con lo observado en modelos animales como el de CIA, o artritis inducida por antígeno (AIA, de *Antigen Induced Arthritis*), se ha demostrado que la depleción de células CD25+ previa a la inmunización o a la presentación de la enfermedad, lleva a una respuesta inmune celular y humoral incrementadas y a una exacerbación de la artritis (Morgan y col., 2003; Frey y col., 2005). Por el contrario, la transferencia de células T CD4+CD25+ en el momento de la inmunización disminuye la gravedad de la enfermedad observándose una mayor acumulación de estas células en la sinovial. Algo parecido ocurre si la transferencia de células Treg es previa a la inmunización, siendo el efecto más potente si la inyección se realiza de forma sistémica que directamente en la articulación (Ohata y col., 2007). En los pacientes con AR, las células Treg CD4+CD25+ están presentes tanto en el líquido sinovial (van Amelsfort y col., 2004; Leipe y col., 2005) como en sangre periférica. En estos pacientes, las células Treg representan un 5-10% de las células CD4+ en sangre periférica (Dieckmann y col., 2001), y se ha descrito un número menor de las células CD25bright que son las que realmente se consideran como células reguladoras (de Kleer y col., 2004). Estas células mantienen algunas características de las células Treg, como la expresión de Foxp3, la anergia a la estimulación del TCR y la capacidad de inhibir la proliferación *in vitro* de células T efectoras procedentes de la sinovia y de sangre periférica. Sin embargo, han perdido la capacidad para suprimir la secreción de citoquinas proinflamatorias (Ehrenstein y col., 2004). En presencia de niveles elevados de TNF- $\alpha$ , que actúa a través del receptor TNFR2, se inhibe la función reguladora de las células Treg y la expresión de ARN (Acido RiboNucleico) mensajero (ARNm) y

proteína correspondiente a Foxp3 (Valencia y col., 2006). Asimismo, diversos estudios han demostrado que IL-4 puede inhibir la inducción de Foxp3 por un mecanismo dependiente de GATA-3 y STAT-6 (Mantel y col., 2007). La regulación del promotor de Foxp3 depende, entre otros, del factor de transcripción NF-AT y la señalización de Smad-3 inducida por TGF- $\beta$  (Tone y col., 2008). De hecho, TGF- $\beta$  media la expresión de Foxp3 por unión directa al promotor de Smad.

El tratamiento de la AR con terapia anti-TNF- $\alpha$ , inhibe la proliferación de las células T y la síntesis de citoquinas y restablece el fenotipo supresor de las células Treg (Ehrenstein y col., 2004; Valencia y col., 2006; Bayry y col., 2007). El incremento en el número de las células Treg en sangre periférica se asocia proporcionalmente con el descenso en los niveles de proteína C reactiva. Un posible mecanismo de acción de este tipo de terapia es que actúe incrementando la proporción de células CD4+CD25<sup>bright+</sup>, o bien que el tratamiento sea capaz de inducir la diferenciación de células Treg a partir de células CD4+CD25<sup>+</sup>. Esta población se diferencia del de las células nTreg en que no expresan CD62L ni CCR7 y en que su efecto depende de la producción de TGF- $\beta$  e IL-10 (Nadkarni y col., 2007). Un estudio reciente realizado en pacientes con AR tratados de forma combinada con anti-TNF- $\alpha$  y metotrexato muestra una disminución en el ratio Th17/Treg con niveles reducidos de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17, e IL-23 y un aumento significativo de TGF- $\beta$  (Lina y col., 2011). Similar a lo que ocurre con la terapia anti-TNF, se ha demostrado que el tratamiento con CTLA-4Ig (abatacept) aumenta la función reguladora de los linfocitos CD4+CD25<sup>+</sup> (Alvarez-Quiroga y col., 2011). Asimismo, en un modelo de CIA, CTLA-4Ig fue capaz de reducir los signos de inflamación, aumentando el porcentaje de células Treg tanto en bazo como en articulación (Ko y col., 2010). Por el contrario, el tratamiento de los pacientes de AR con Ac anti-IL-6R (tocilizumab) o anti-CD20 (rituximab) no han mostrado hasta el momento diferencias en la frecuencia de células Treg (Betts y col., 2011; van de Veerdonk y col., 2011).

### 3.1.1.5. Células NK

Las células NK constituyen alrededor del 10% de la población linfoide y participan activamente en la defensa del organismo frente al crecimiento de células tumorales y en infecciones, principalmente de tipo viral. El fenotipo característico de las NK es CD16-CD56+, CD3-, y TCR-. Estas células se encuentran mayoritariamente en sangre periférica, donde pueden recibir señales activadoras o inhibitoras. En procesos inflamatorios como la AR, las células NK migran al líquido sinovial donde se encuentran en porcentajes semejantes a los de sangre periférica. El uso de Ac capaces de activar a las células NK, ha sido probado en el modelo murino de CIA (Leavenworth y col., 2011), donde se ha descrito que reduce la progresión de la enfermedad. Sin embargo, otros estudios muestran un efecto terapéutico beneficioso en el mismo modelo de CIA tras el bloqueo del receptor NKG2D (Andersson y col., 2011).

### 3.1.2. Papel de los LB

Las células B, además de producir Ac, pueden contribuir como células presentadoras de antígeno y productoras de citoquinas y quimioquinas que potencian la activación de las células T. El patrón de distribución de estas células y su relación con las células dendríticas foliculares puede ser muy variable. Pueden organizarse formando folículos secundarios, redes irregulares con las células dendríticas o dando un patrón difuso con alguna célula dendrítica aislada. De esta manera, se establece un entorno adecuado para la maduración del LB, que derivará en la formación de autoanticuerpos, entre ellos el FR, un autoanticuerpo IgM dirigido contra la parte terminal de la región constante de la cadena pesada de la IgG. Además del FR, se ha descrito la presencia de otros autoanticuerpos, en particular, los anti-CCP que reconocen diferentes proteínas en forma citrulinada en las que se ha producido una transformación enzimática (deiminación) de sus residuos de arginina a citrulina (Cantaert y col., 2006). Los LB del tejido sinovial muestran además especificidad para el CII, ADN (Ácido Desoxirribonucleico), toxoide tetánico, antígenos mitocondriales y “*heat shock protein*” (HSP) bacterianas, aunque la contribución de estos autoanticuerpos es de momento hipotética (Tsoulfa y col., 1989; Klareskog y Olsson, 1990; Lydyard y col.,

1990). Además de producir autoanticuerpos y diferentes citoquinas y quimioquinas, los LB en la sinovial reumatoide son los principales productores de RANKL (Yeo y col., 2011).

La relevancia patogénica de los LB viene demostrada además por la eficacia de los fármacos actualmente desarrollados frente a esta diana celular. Entre ellos destacan el rituximab, el único aprobado para uso terapéutico en la AR, particularmente eficaz en los pacientes con AR que tienen FR positivo (Silverman y Weisman, 2003), ofatumumab y veltuzumab (Castillo y col., 2009) y otros como belimumab o TACI-Ig.

### **3.1.3. Neutrófilos**

Los neutrófilos son el tipo celular más abundante del líquido sinovial, y tienen capacidad para sintetizar TGF- $\beta$  e IL-8, mediadores esenciales en el reclutamiento de neutrófilos, estableciendo así un circuito autocrino. Este componente celular es capaz de fagocitar complejos inmunes generando mediadores proinflamatorios como leucotrienos, prostaglandinas y productos derivados de su propia degranulación. De esta manera, los neutrófilos dañan el cartílago articular al liberar al líquido sinovial el contenido de sus lisosomas, con proteasas y radicales libres de oxígeno (Chatham y col., 1993).

### **3.1.4. Macrófagos**

Los macrófagos sinoviales, junto con los FS, desempeñan un papel importante en la destrucción tisular característica de la AR y constituyen la fuente principal de producción de MMP. La producción de MMP está directamente regulada por citoquinas proinflamatorias como IL-1, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , secretadas a su vez por los macrófagos residentes de la sinovial. Los condrocitos responden a las mismas citoquinas con una disminución en la síntesis de colágeno y proteoglicanos y sintetizan colagenasa responsable de la degradación de estas proteínas. Por último, los macrófagos inducen angiogénesis mediada por TNF- $\alpha$  y participan en la fibrogénesis favoreciendo la

quimiotaxis de otras células inflamatorias mediante la producción de quimioquinas y proteasas que dan lugar a la destrucción de la articulación (Leibovich y col., 1987; Kennedy y col., 2011). El tratamiento de los pacientes con AR con abatacept ha demostrado un efecto antiinflamatorio sobre los macrófagos sinoviales reumatoides (Brizzolara y col., 2011). Asimismo, algunos inhibidores de kinasas reducen la localización nuclear de NF- $\kappa$ B (de *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), bloquean la activación de los macrófagos sinoviales reumatoides y suprimen el desarrollo de la artritis (Yarilina y col., 2012).

### 3.1.5. Fibroblastos sinoviales

Los FS son células mesenquimales CD45- con un fenotipo diferente según la localización tisular en la capa íntima o subíntima de la sinovial. Se identifican por su morfología en forma de huso, su capacidad de adherencia y la ausencia de marcadores de otras líneas celulares. Incluso *in vitro*, los FS son capaces de mantener su fenotipo tras varios pases celulares. Fisiológicamente, actúan proporcionando nutrientes para el cartílago y proteoglicanos para lubricar la superficie articular. Numerosos trabajos demuestran la implicación patogénica de los FS en el desarrollo de la artritis (Huber y col., 2006; Bartok y Firestein, 2010). Los FS expresan diferentes receptores de membrana de adhesión por los que se anclan a la MEC y regulan el reclutamiento de células al espacio sinovial. Estas células son muy versátiles con capacidad para diferenciarse a otros tipos de células del tejido conectivo como cartílago, hueso, adipocitos y células musculares lisas.

El aumento de la proliferación, característico de los FS en la MS, se debe a su capacidad para seguir haciéndolo *in vitro* incluso en ausencia de estímulos externos y porque expresan de forma aumentada determinados factores de crecimiento como PDGF, determinados protooncogenes como *c-myc*, *ras* o *myb*, y el factor MIF (de *Macrophage migration Inhibitory Factor*). Sin embargo, *in vitro*, los FS de AR no proliferan más rápido que los procedentes de pacientes con artrosis, y, por tanto, el exceso de proliferación no justifica aisladamente la hiperplasia sinovial. La otra explicación alternativa consiste en un defecto de apoptosis de los FS (Franz y col.,

2000; Baier y col., 2003; Palao y col., 2004; Drynda y col., 2005), bien por ser incapaces de completar las vías iniciadas por estímulos proapoptóticos, o bien por ser parcialmente resistentes a los estímulos apoptóticos.

La activación de los FS en la AR puede producirse de manera dependiente e independiente de la presencia de citoquinas proinflamatorias. En presencia de citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , se activan vías de señalización intracelular dependientes de NF- $\kappa$ B, MAPK (de *Mitogen-Activated Protein Kinase*) y PI-3 quinasa lo que mantiene el entorno inflamatorio sinovial al inducir a su vez la expresión de enzimas catabólicos y favorecer la resistencia a la apoptosis. Pero, además, los FS en la AR expresan TLR (de *Toll Like Receptor*) en su membrana, sobre todo TLR2 y TLR3 que tras ser activados en presencia de células Th1 y Th2 son capaces de activar AP-1 y NF- $\kappa$ B y, de manera secundaria, la producción y secreción de citoquinas, quimioquinas y MMP (Schurigt y col., 2008). Esto demuestra la implicación directa de los FS en la inmunidad innata, su participación desde fases muy precoces de la AR y en la inducción de una respuesta inflamatoria dependiente de TLR. Los FS reumatoides, como consecuencia de las dos vías de activación, secretan mediadores efectores implicados en diferentes procesos que componen la respuesta inflamatoria como la angiogénesis o la quimiotaxis. En este sentido, liberan citoquinas proinflamatorias y angiogénicas, otros factores de crecimiento angiogénicos, quimioquinas y factores implicados en la degradación de la MEC.

Mediante análisis por microarrays se han identificado dos subgrupos de fibroblastos en la MS reumatoide. En los tejidos más inflamatorios predomina el grupo que expresa TGF- $\beta$  y el gen inducible por activina A, ambos característicos de los miofibroblastos. El otro grupo expresa genes regulados por el factor de crecimiento de tipo insulina (IGF, de *Insulin-like Growth Factor*) y aparecen en membranas sinoviales menos inflamadas (Kasperkovitz y col., 2005). Otros estudios han demostrado la influencia de la hipoxia en el patrón diferencial de expresión génica entre FS de pacientes con AR y pacientes sanos. Esto puede deberse a cambios adquiridos en la articulación tras su exposición prolongada a la hipoxia. Entre los genes más relevantes relacionados con respuestas inflamatorias observados en FS de pacientes con AR bajo condiciones de hipoxia, se han encontrado el gen de la IL-6 y el gen del receptor de la IL-17 (IL-17R) (Del Rey y col., 2010).

### 3.2. Mediadores solubles implicados en la patología de la AR

El proceso de inflamación crónica de la AR va a depender tanto de las interacciones celulares como de la presencia de mediadores solubles liberados por las células inflamatorias y residentes, y que actúan tanto sobre las células adyacentes como a distancia. Entre los mediadores solubles, se encuentran quimioquinas, citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión o factores de crecimiento.

Las quimioquinas constituyen una superfamilia de citoquinas con propiedades quimiotácticas, con función activadora sobre los leucocitos y el desarrollo linfóide. Están implicadas en procesos de proliferación y supervivencia celular, angiogénesis y regulación de la apoptosis. Las quimioquinas ejercen su acción a través de receptores específicos de membrana, que pueden unirse a más de una quimioquina. En la sinovial reumatoide se ha detectado la expresión de múltiples quimioquinas con un efecto global proinflamatorio e inductor de una respuesta Th1. Algunas quimioquinas presentes en la AR como SDF-1, considerada como una quimioquina constitutiva y no inducible, están implicadas en la angiogénesis de la MS (Pablos y col., 2003). Los FS son capaces de producir SDF-1 y CXCL16 favoreciendo la acumulación de células T de memoria en la articulación inflamada (Nanki y col., 2000; Patel y Haynes, 2001; Patel y col., 2001; Schmutz y col., 2005; Tsubaki y col., 2005).

En la cavidad sinovial reumatoide, múltiples citoquinas proinflamatorias desempeñan un papel esencial en el desencadenamiento y mantenimiento de la respuesta inflamatoria. Dentro de las citoquinas destacan fundamentalmente IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-15, IL-17, IL-23 e IL-27. Todas ellas han supuesto una diana terapéutica y frente a todas se han desarrollado diferentes estrategias. La IL-1 y el TNF- $\alpha$  son sintetizadas mayoritariamente por macrófagos en respuesta a estímulos inflamatorios, y, actualmente se consideran los principales mediadores de la respuesta inflamatoria en la AR. En concreto, contribuyen de forma esencial a la degradación de la MEC (Migita y col., 1996), destrucción del cartílago y resorción ósea (Migita y col., 1996; Joosten y col., 1999). Además, inducen la proliferación de los FS contribuyendo a la hiperplasia sinovial característica de la AR, favorecen el reclutamiento de las células inflamatorias, inducen la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 (de *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) sobre células endoteliales, monocitos y FS, y favorecen el desarrollo de la neoangiogénesis (Hu y col., 1994; Jorgensen y col., 1996).

El significado patológico de la IL-6 en la AR se ha establecido por su elevada concentración en suero y líquido sinovial (Hirano y col., 1988), así como por su capacidad para activar los osteoclastos favoreciendo la resorción ósea. Los niveles séricos de IL-6 en los pacientes con AR se han relacionado con el grado de actividad y gravedad clínica y de daño radiológico (Houssiau y col., 1988; Madhok y col., 1993). La IL-6 es capaz de activar las células T, inducir el crecimiento y la supervivencia de las células plasmáticas y favorecer la síntesis de Ac para contribuir al mantenimiento de la respuesta autoinmune reumatoide. Asimismo, la IL-6 es el principal inductor de la proteína C reactiva, implicada en la respuesta sistémica a la inflamación. En la actualidad existe una estrategia terapéutica, tocilizumab, un Ac monoclonal frente al receptor de IL-6 (Choy y col., 2002).

La IL-15 es una citoquina que se expresa en múltiples tipos celulares. Tanto la citoquina como su receptor se expresan en la sinovial reumatoide. Entre sus funciones, se ha descrito su participación induciendo la proliferación de células T sinoviales y la liberación de citoquinas, la activación de los neutrófilos, la degranulación de las células NK, la activación y migración de las células endoteliales y previene la apoptosis de los FS (McInnes y col., 1996; Kurowska y col., 2002).

La IL-17, como se ha explicado anteriormente, es una citoquina secretada por las células T y los granulocitos, que participa favoreciendo la hematopoyesis, la migración y activación de los leucocitos y particularmente, la activación de los osteoclastos y consiguiente resorción ósea (Kotake y col., 1999). La familia de citoquinas IL-17 comprende seis tipos diferentes de IL-17, IL-17-A, -B, -C, -D, -E, -F. IL-17A e IL-17F que movilizan neutrófilos a través de la granulopoyesis y la inducción de quimioquinas CXCL. La producción de ambas citoquinas por los LT está regulada por IL-23. La IL-23 es un heterodímero compuesto por la subunidad p40 (que comparte con IL-12) y la subunidad específica p19 (Oppmann y col., 2000). Actúa preferentemente sobre células TCD4<sup>+</sup> de memoria y participa en el mantenimiento del fenotipo activo de las células Th17 una vez que se han diferenciado (Stritesky y col., 2008).

La IL-27 es una citoquina heterodimérica, compuesta por la subunidad p28 y el gen 3 inducido por el virus de Epstein-Barr. Su papel como factor de crecimiento de las células Tr1 (Awasthi y col., 2007; Stumhofer y col., 2007) y la inhibición de la diferenciación de las células Th17 por bloqueo en los factores de transcripción Ror $\gamma$ t y Rorc, han hecho que se considere esta citoquina como una posible terapia para controlar la inflamación. De hecho, la administración de IL-27 en ratones con CIA,

reduce la gravedad de la enfermedad, la infiltración celular y la erosión del hueso (Niedbala y col., 2008; Pickens y col., 2011). Otras citoquinas descritas en la AR como IL-18, IL-33 e IL-32 son producidas por fibroblastos estimulados (Brennan y McInnes, 2008) y desempeñan un papel proinflamatorio en la patogenia de la AR.

En el endotelio y MS reumatoides se ha descrito una expresión aumentada de moléculas de adhesión como selectinas, integrinas, VCAM-1 e ICAM-1 que juegan un papel esencial en el reclutamiento de los leucocitos circulantes en las articulaciones inflamadas (Cook-Mills, 2002; Yang y col., 2010). En el líquido articular de la AR se han detectado gran variedad de enzimas proteolíticas que proceden principalmente de FS, condrocitos, y neutrófilos siendo las más importantes las MMP y las catepsinas.

En la pérdida generalizada de masa ósea que ocurre en la AR participan activamente tanto la osteoprotegerina (OPG) como el sistema RANK-RANKL. La unión RANK-RANKL provoca la activación de los osteoclastos maduros *in vitro*, mientras que la OPG compite con RANK por su unión, lo que le otorga un papel como inhibidor de la osteoclastogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* (Simonet y col., 1997; Haynes y col., 2001). Los osteoclastos se encuentran en la sinovial reumatoide en las zonas adyacentes al *pannus* que invade el hueso y pueden derivar de los macrófagos presentes en la sinovial. Los FS expresan RANKL en su superficie y, una vez activados, secretan citoquinas y quimioquinas que atraen linfocitos activados que expresan RANKL. Además de los elementos celulares, factores solubles de la sinovial reumatoide como determinadas citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-17) participan en la osteoclastogénesis al estimular la expresión de RANKL y M-CSF, y al activar directamente los precursores de los osteoclastos (Lam y col., 2000; Lubberts y col., 2003). Recientemente, se ha descubierto que los osteoclastos secretan IL-10, TGF- $\beta$  e IL-6 y pueden actuar como células presentadoras de antígeno y activar células T CD4+ y CD8+ (Li y col., 2010).

Por último, en la sinovial reumatoide se ha descrito la expresión de cuatro factores de crecimiento implicados en los procesos de proliferación, diferenciación y función de células de estirpe mesenquimal. A este grupo de factores pertenecen TGF- $\beta$ , PDGF, FGF e IGF (Qu y col., 1995; Sarkissian y Lafyatis, 1998).

### 3.2.1. Papel de TGF- $\beta$ en la AR

El TGF- $\beta$  es una proteína homodimérica implicada en el control de múltiples procesos biológicos, tales como desarrollo embrionario, inmunomodulación, proliferación, diferenciación, angiogénesis, migración y apoptosis celular (Moses y col., 1987; Massague, 1990; Letterio y Roberts, 1998).

TGF- $\beta$  forma parte de una superfamilia que incluye más de 40 factores relacionados estructuralmente, entre los que se incluyen: TGF- $\beta$ , activinas, inhibinas y BMP (de *Bone Morphogenetic Proteins*) (Piek y col., 1999). Estas proteínas se comportan como agonistas multifuncionales cuyos efectos dependen de la célula diana y de los propios factores. Estos factores regulan la transcripción de genes efectores de las funciones celulares como reguladores del ciclo celular que median respuestas antiproliferativas, o reguladores de la síntesis de proteínas de MEC, determinando así la adhesión y movimientos celulares.

En mamíferos existen 3 isoformas diferentes de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3) con funciones similares pero expresadas en diferentes tejidos. TGF- $\beta$ 1 es producido por muchos subtipos celulares, sobre todo, células T y macrófagos activados (Kehrl y col., 1986). Las células linfoides producen principalmente la isoforma TGF- $\beta$ 1 (Letterio y Roberts, 1998; McCartney-Francis y col., 1998), de ahí que tenga la función más relevante en el sistema inmune en particular en el control de la proliferación, activación y diferenciación de células T. TGF- $\beta$ 3 ha sido detectado principalmente en células de origen mesenquimal, sugiriendo un papel diferente al de TGF- $\beta$ 1 y 2. Ratones deficientes en las isoformas 2 y 3 desarrollan defectos letales en el desarrollo embrionario. Sin embargo, mutaciones del gen de TGF- $\beta$ 1, dan lugar a un desorden inflamatorio multiorgánico severo y necrosis tisular que rápidamente genera letalidad prenatal (entre las semanas 3-5 de edad) (Shull y col., 1992). Asimismo, la ausencia de TGF- $\beta$ 1 funcional, se asocia con acúmulo de células y citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) en los órganos linfoides, una producción incrementada de antígenos MHC de clase I y II y un déficit en la proliferación de células hematopoyéticas y endoteliales (Dickson y col., 1995). Histopatológicamente, estos ratones presentan infiltración masiva de linfocitos y macrófagos, principalmente en pulmones y corazón (Kulkarni y Karlsson, 1993), aunque pueden observarse también en

músculo, hígado, páncreas y cerebro, entre otros órganos. Estos ratones presentan además Ac anti-dsDNA y anti-ssDNA y depósitos de inmunocomplejos glomerulares.

Hasta el momento, se han descrito tres receptores de TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ RI, TGF- $\beta$ RII y TGF- $\beta$ RIII), pero son los dos primeros los mediadores de las respuestas biológicas de TGF- $\beta$ 1 (Chen y col., 1993). Ratones dnT $\beta$ RII (que expresan un TGF- $\beta$ RII con el dominio quinasa intracelular truncado bajo un promotor específico de células T), presentan una inflamación masiva (Gorelik y Flavell, 2000), indicando la importancia de la señalización de TGF- $\beta$  en la homeostasis de las células T.

En la señalización de TGF- $\beta$  intervienen una amplia variedad de factores reguladores. TGF- $\beta$  se secreta como un precursor latente formado por TGF- $\beta$  maduro, el propéptido TGF- $\beta$  (también llamado LAP [de *Latency-Associated Protein*]) y la proteína LTBP (de *Latent TGF-beta Binding Protein*). LAP se encuentra anclada mediante uniones no covalentes a un homodímero de TGF- $\beta$  maduro, el cual previene la unión de TGF- $\beta$ 1 a sus receptores. La activación de TGF- $\beta$ 1 se produce a través de la degradación o la alteración de la conformación de LAP, un proceso mediado por proteasas, trombospondina 1, MMP e integrinas (Annes y col., 2004).

Los efectos producidos por TGF- $\beta$  se realizan tras la unión de estos ligandos de la familia TGF- $\beta$  a sus receptores de membrana tipo I y II formando complejos tetraméricos activos tras la fosforilación de sus residuos serina/treonina que, a su vez, fosforilan a las proteínas Smad, encargadas de transmitir la señal intracelular y de generar complejos de unión al ADN (Heldin y col., 1997) (figura 3).

De acuerdo con su estructura y función, las Smad pueden dividirse en tres subgrupos:

- R-Smad (Smad-1, -5, -8, -2, y -3), de *Receptor-regulated Smad*, substratos directos de los receptores con actividad quinasa.
- CO-Smad (Smad-4), de *COmmon partner Smad*, que participan en la señalización al asociarse a las primeras.
- I-Smad (Smad-6, -7), de *Inhibitory Smad*, que interfieren con la fosforilación de las R-Smad por unión a diferentes miembros de la familia de receptores de TGF- $\beta$ .

En situación basal, las Smad forman homo-oligómeros que residen en el citoplasma. Tras la activación del complejo receptor II por el ligando, el receptor tipo I fosforila

específicamente las R-Smad, que forman complejos con Smad-4 y migran al núcleo (Zhang y col., 1996), donde solos, o en asociación con subunidades de unión al DNA, activan los genes diana al unirse a regiones específicas del promotor. El reclutamiento de las R-Smad al TGF- $\beta$ RI requiere la expresión de la molécula SARA (de *Smad Anchor for Receptor Activation*) (Tsukazaki y col., 1998), que se disocia del complejo una vez fosforiladas las R-Smad.

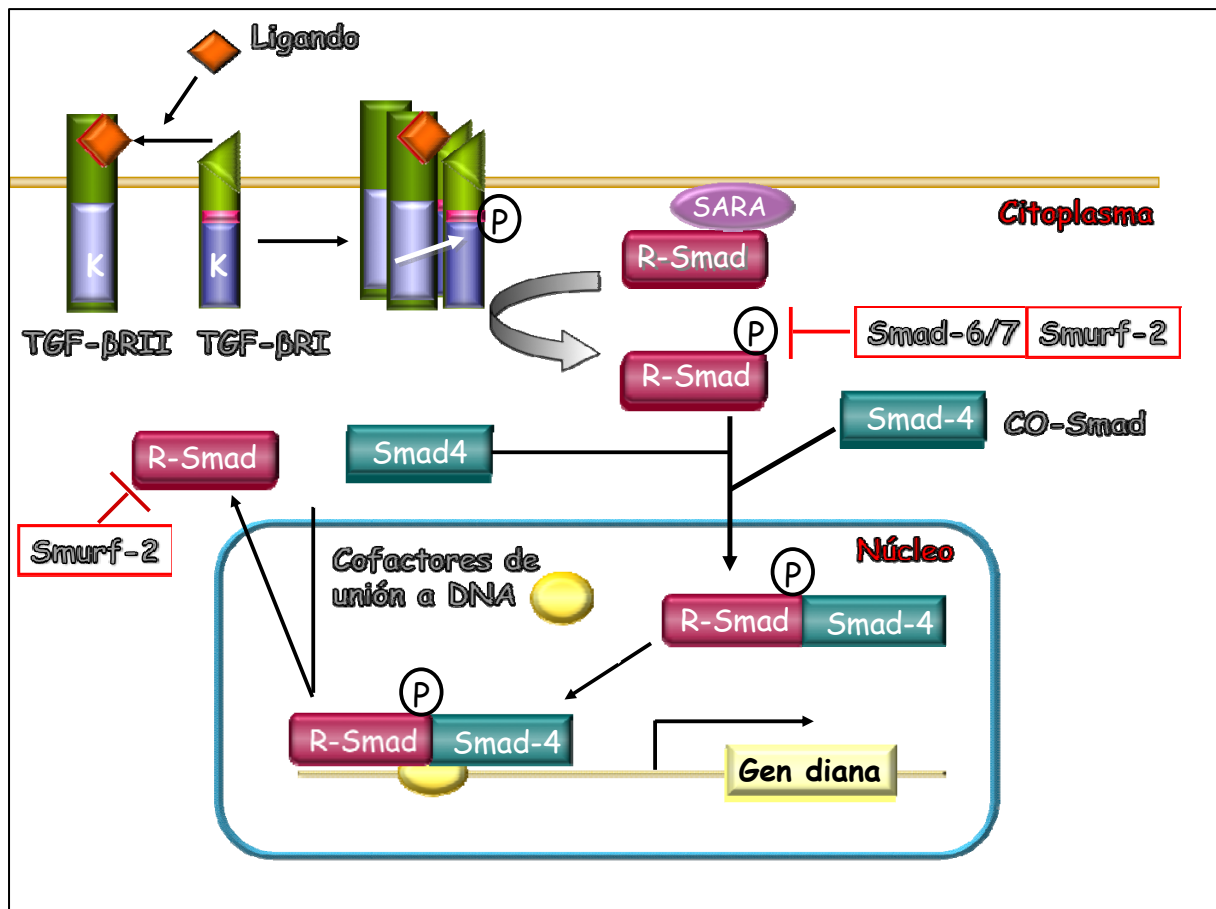


Figura 3. Vía de señalización de proteínas Smad inducida por TGF- $\beta$ .

Las señales de las proteínas BMP están mediadas por las Smad -1, -5 y -8, mientras que Smad-2 y -3 son los substratos de activinas y TGF- $\beta$ .

Las ligasas ubiquitinas Smurf (de *Smad ubiquitination regulatory factor*)-1 y -2 participan en el efecto inhibitorio de las I-Smad, ya que al unirse a Smad-7 favorecen su salida del núcleo y la degradación de los receptores de TGF- $\beta$ . Smurf-1 interacciona con

Smad-1 y -5 afectando así las respuestas dependientes de BMP. Por el contrario, Smurf-2 interacciona con un espectro más amplio de R-SMAD interfiriendo con señales dependientes tanto de BMP como de TGF- $\beta$  y activinas.

Las Smad carecen de actividad enzimática y su señal no se amplifica. Al ser los mediadores principales de las señales dependientes de TGF- $\beta$ , están sujetas a mecanismos de regulación que integran y adaptan su potencial señalización al estado de la célula. Otras vías de señalización intracelular, como las de MAPK, PI3K (de *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) o PKC (*Protein Kinase C*) pueden fosforilar las proteínas Smad-2 y -3. A su vez, TGF- $\beta$  puede activar otras vías de señal independientes de Smad como MAP quinasas con posibilidad de interacción entre ambas vías aunque no se conoce la consecuencia funcional.

La actividad transcripcional de las Smad requiere la presencia de cofactores para inducir la expresión génica. Entre los genes cuya expresión está regulada por estas proteínas se incluyen los de proteínas de MEC, ciertos factores de crecimiento y factores antiapoptóticos (Massague, 1998; Derynck y Zhang, 2003).

La alteración de las vías de señalización de TGF- $\beta$  ha sido objeto de estudio en diferentes modelos de enfermedad, en particular anomalías embrionarias, cáncer, enfermedades autoinmunes, aterosclerosis, hipertensión, osteoporosis y enfermedades fibrosantes (Kulkarni y col., 1995). De esta manera, se han identificado alteraciones en la expresión de las proteínas Smad-2, -3, y -7. Estos cambios provocan respuestas anómalas dependientes de TGF- $\beta$  condicionando una alteración del comportamiento celular. Por otra parte, modelos animales genéticamente modificados demuestran el efecto modulador de TGF- $\beta$  sobre la respuesta inmune. Los animales Smad-3<sup>-/-</sup> presentan una respuesta inflamatoria exagerada (Ashcroft y col., 1999), mientras que el déficit de Smad-2<sup>-/-</sup> es letal (Waldrip y col., 1998). Asimismo, ratones transgénicos para Smad-7 se asocian con elevada producción de citoquinas Th1 y Th2.

En estudios realizados *in vitro* con células de la sinovial reumatoide, los efectos dependientes de TGF- $\beta$  son muy dispares y según las condiciones actúa como un agente anti o proinflamatorio. Entre los efectos antiinflamatorios, se encuentran la inhibición de la degeneración del cartílago mediada por citoquinas proinflamatorias y dependiente de MMP-1, la proliferación de linfocitos y de la producción de superóxido por los macrófagos. De esta manera, favorece el proceso de reparación tisular frente al efecto

de destrucción osteocartilaginosa dependiente de TNF- $\alpha$  e IL-1. Sin embargo, también puede actuar como factor proinflamatorio al estimular la secreción de citoquinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 (Rosengren y col., 2010), actuar como potente quimioatrayente de neutrófilos (Allen y col., 1990), activar la expresión de quimioquinas y MMP (Buckley y col., 2000; Cheon y col., 2002), inducir la expresión de VEGF (Berse y col., 1999), esencial en el desarrollo de angiogénesis en la AR, y modular la apoptosis de los FS por un mecanismo no bien definido. En este sentido, TGF- $\beta$  inhibe la expresión de Fas y aumenta la de Bcl (*B-cell lymphoma*)-2 y Bclx (Kawakami y col., 2004), aunque otros autores apuntan a la vía de PI3K y activación de Akt como responsables del efecto antiapoptótico de TGF- $\beta$  (Kim y col., 2002).

Diversos estudios realizados en modelos de fibrosis han mostrado el efecto beneficioso de bloquear TGF- $\beta$  con oligonucleótidos antisentido (Arias y col., 2003; Philipp y col., 2005), Ac específicos anti-TGF- $\beta$  (Denis, 1994; McCormick y col., 1999) o péptidos sintéticos (Ezquerro y col., 2003; Kondou y col., 2003; Santiago y col., 2005). Sin embargo, estudios realizados en modelos de artritis, han expuesto resultados muy dispares en cuanto al papel de TGF- $\beta$ . Múltiples trabajos han descrito que la administración intraperitoneal de TGF- $\beta$ 1 reduce la incidencia y gravedad de la artritis en ratones con CIA, principalmente si la inyección se realiza en fases tardías de la enfermedad (Kuruvilla y col., 1991; Santambrogio y col., 1993). En ratas con artritis inducida por SCW (de *Streptococcal Cell Wall*), la administración intraperitoneal de TGF- $\beta$  en fase aguda suprime el desarrollo de artritis (Brandes y col., 1991). Lo mismo ocurre si la administración de TGF- $\beta$  se realiza intramuscularmente (Song y col., 1998), aunque sólo se ha visto un efecto si se realiza en el pico máximo de la inflamación. Un estudio muy reciente ha demostrado que células madre mesenquimales derivadas de médula ósea e inducidas con TGF- $\beta$ , disminuyen la incidencia y gravedad de la artritis en ratones con CIA con la enfermedad establecida. Asimismo, incrementan el ratio Foxp3/IL-17 en bazo y cavidad peritoneal y disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias (Park y col., 2011). Otro estudio realizado en ratones con CIA, mostró un aumento significativo de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 en la articulación (Marinova-Mutafchieva y col., 2006), principalmente durante la fase de remisión, sugiriendo que ambas citoquinas están implicadas en la regulación de la actividad de la enfermedad. En este sentido, se ha demostrado que tanto la inyección local, como intraperitoneal de Ac anti-TGF- $\beta$  en ratones con artritis, aumenta su gravedad y los niveles de citoquinas

proinflamatorias (Thorbecke y col., 1992; Sancho y col., 2003). Ratones transgénicos para TGF- $\beta$ RII (dnT $\beta$ RII), presentaron una mayor susceptibilidad a la artritis comparada con ratones WT (*Wild Type*), acompañada de un aumento en la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en las células T de nodos linfoides (Schramm y col., 2004). Sin embargo, también son numerosos los trabajos que exhiben un papel de TGF- $\beta$  totalmente contrario. De hecho, inyecciones repetidas de TGF- $\beta$ 1 en la articulación de ratones sanos, inducen inflamación, hiperplasia sinovial y formación de osteocitos (van Beuningen y col., 1994). Igualmente, la inyección articular de TGF- $\beta$ 1 en ratas induce reclutamiento de neutrófilos, eritema, proliferación e infiltrado sinovial, principalmente de linfocitos T (Allen y col., 1990; Fava y col., 1991). Varios trabajos apoyan este concepto de TGF- $\beta$  como agente proinflamatorio. El tratamiento con un Ac anti-TGF- $\beta$  directamente en la articulación de ratas con artritis inducida mediante el modelo de SCW, inhibe la inflamación sinovial, la resorción ósea y la producción de citoquinas proinflamatorias (Wahl y col., 1993). Otros autores muestran que el tratamiento con un Ac-anti-TGF- $\beta$ RI en ratones con CAIA previene los signos de la artritis, el desarrollo de la hiperplasia, la inflamación y la angiogénesis sinovial (Sakuma y col., 2007).

NAFB002 o p17 (KRIWFIPRSSWYERA) es un péptido de 15 aminoácidos con afinidad de unión a TGF- $\beta$ 1, identificado utilizando una librería de péptidos derivados de fagos (*phage-displayed random 15-mer*). Su capacidad como el mejor inhibidor de TGF- $\beta$ 1, se ha definido *in vitro* y ha demostrado ser el péptido más activo entre 20 péptidos identificados (Dotor y col., 2007). La actividad de este péptido es dependiente de los primeros 11 aminoácidos. De esta forma, se ha comprobado que la eliminación de la Lys del extremo N-terminal, disminuye la actividad de p17. El efecto funcional de p17 ha sido probado con éxito en modelos animales de daño hepático y de fibrosis pulmonar. En este sentido, p17 ha demostrado ser capaz de inhibir casi el 100% de la expresión de ARNm de colágeno tipo I dependiente de TGF- $\beta$ 1 en el hígado de ratones expuestos a tetracloruro de carbono. Asimismo, estudios posteriores han demostrado la capacidad de p17 de inhibir tanto *in vitro* como *in vivo* la actividad de las células Treg inducidas humanas y murinas (Gil-Guerrero y col., 2008) y bloquear así la actividad inmunosupresora de TGF- $\beta$ 1.

#### 4. Modelos animales de AR

Hasta el momento, se han utilizado varios modelos experimentales de artritis autoinmune, unos espontáneos y otros inducidos, para tratar de comprender la patogenia de la AR y la implicación de los diferentes tipos celulares.

Los modelos espontáneos de artritis murina, aunque son similares a la AR humana, no permiten conocer el inicio y la causa de la enfermedad. Entre los más destacados se encuentran los ratones K/BxN, que presentan una respuesta a la glucosa-6-fosfato isomerasa, el modelo SKG (mutación puntual en ZAP-70) o el modelo de artritis inflamatoria de ratones transgénicos para el TNF humano. Excepto en el modelo transgénico de TNF, en estos modelos las células T y las células B juegan un papel en el desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, se encuentran los modelos de artritis inducida que proporcionan un entorno más controlado, con la posibilidad de estudiar la enfermedad en las diferentes fases del desarrollo de la artritis, ya sea durante la inducción de la misma o una vez establecida. Entre los modelos más destacados de artritis murina inducida, se encuentran los modelos realizados por inmunización con antígeno. Dentro de este grupo se encuentran los modelos de AIA, CIA y el modelo de PGIA (de *ProteoGlycan-Induced Arthritis*) inducido con proteoglicanos derivados del cartílago humano en especies genéticamente susceptibles (BALB/c y C3H). Otros modelos, como el modelo de artritis inducida por zymosan y el modelo inducido por SCW mediante inyección articular de fragmentos de estreptococo, destacan por ser modelos activadores del sistema inmune innato. Por último se encuentran los modelos de artritis inducida dependientes de la administración de los anticuerpos del suero de ratones con artritis. En este grupo se encuentran los modelos de CAIA (de *Collagen Antibody-Induced Arthritis*) y el modelo de STIA (de *Serum Transfer-Induced Arthritis*) realizado por transferencia del suero de los ratones K/BxN. De todos los modelos de artritis inducida, el modelo de CIA destaca por ser el mejor caracterizado y más utilizado como modelo de artritis inducida.

Los modelos de AIA o CIA son dependientes de células T (Monach y col., 2004; Sakaguchi y Sakaguchi, 2005). AIA es un modelo animal de monoartritis inicialmente inducido en conejos y extendido a ratones (Brackertz y col., 1977). Se basa en la inmunización intradérmica con un antígeno, BSA (de *Bovine Serum Albumin*) metilada (mBSA), seguida de la administración local del mismo en la articulación. Al cabo de una o dos semanas, los ratones presentan numerosas características similares a AR,

como hiperplasia sinovial del *lining*, proliferación celular del *sublining*, infiltración de células inflamatorias, neovascularización, formación del *pannus* y destrucción del cartílago articular (Ohshima y col., 1998). La ventaja de este modelo es poder comparar histológicamente la afectación articular dentro del mismo individuo.

CIA es un modelo experimental de artritis inflamatoria inducido por inyección intradérmica de CII en CFA (de *Complete Freund's Adjuvant*) inicialmente desarrollado en ratas (Trentham y col., 1977), y posteriormente en ratones (Courtenay y col., 1980; Wooley y col., 1981). Este modelo se induce por inmunización con CII heterólogo, ya sea aislado de cartílago bovino, humano o de pollo. Sin embargo, los primeros estudios realizados mostraron que la capacidad de inducir una respuesta inmune era dependiente de la especie de CII utilizado para la inmunización. De esta manera, ratones del haplotipo H-2<sup>q</sup>, fueron susceptibles a CII de pollo, bovino, ciervo, rata y humano y resistentes a CII porcino (Wooley y col., 1985).

La elevada producción de autoanticuerpos como Ac anti-CII (Sakuma y col., 2007) y la respuesta específica de las células T al CII durante la fase aguda indican que el CII, uno de los principales autoantígenos de la AR en humanos (Kim y col., 1999; Kim y col., 2000), juega un papel importante en el inicio de la inflamación en la articulación. De ahí que el modelo de CIA en ratones sea uno de los más utilizados para estudiar la AR humana. Aunque CIA no es idéntica a la AR, ambas comparten numerosas características como sinovitis, erosiones de hueso y cartílago y susceptibilidad asociada al MHC clase-II (Anthony y Haqqi, 1999). Al igual que ocurre en la AR en humanos, existe un aumento de la expresión de citoquinas pro- y antiinflamatorias en la articulación de ratones con CIA, entre las que se incluyen el TNF- $\alpha$  y algunas IL como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-1Ra, IL-10 o TGF- $\beta$  (Williams, 2007).

Actualmente, existen dos cepas en ratones mayoritariamente utilizadas por su elevada susceptibilidad a CIA, los DBA/1 (H-2<sup>q</sup> y H-2<sup>r</sup>) que responden a CII de pollo, murino, bovino, porcino y humano (Williams, 2007) y los B10.RIII (H-2<sup>r</sup>) que responden exclusivamente a CII bovino y porcino. Las cepas DBA/1 y B10.Q contienen los haplotipos I-A<sup>q</sup> y I-A<sup>r</sup> que las hacen altamente susceptibles a CIA (Fugger y col., 1996; Rosloniec y col., 1997). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que es posible inducir artritis en ratones C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), utilizando CII de pollo (Inglis y col., 2007).

Diversos estudios han mostrado la capacidad de los haplotipos HLA-DR1, HLA-DR4 de unir péptidos derivados de CII humano. Ratones transgénicos con sobreexpresión de haplotipos HLA-DR4/DR1 desarrollan artritis tras la inmunización con CII (Rosloniec y col., 1997; Rosloniec y col., 1998). Asimismo, muestran un epítipo inmunodominante (aminoácidos 261 a 273 en CII humano) que se corresponde con el epítipo inmunodominante en ratones DBA/1 con CIA (aminoácidos 256 a 270 en CII murino) (Fugger y col., 1996).

Para la inducción de la artritis en ratones es esencial el CFA, una mezcla de aceites minerales y agua, combinada con una micobacteria (generalmente *M. tuberculosis*) inactivada con calor. Dicha emulsión es utilizada como inmunopotenciador del antígeno específico con el que se combina (CII), liberándolo lentamente para lograr un estímulo persistente. El LPS y el peptidoglicano de *M. tuberculosis* presente en el CFA, son los ligandos patogénicos más potentes para la maduración de las células dendríticas, que migran a los nodos linfoides y presentan el CII procesado en moléculas MHC clase II a células T *naive* necesarias para inducir la inmunidad adaptativa al CII (Cho y col., 2007).

En la inducción de la artritis, los niveles de autoanticuerpos anti-CII de los tipos IgG1 e IgG2a son esenciales para la activación del complemento (Watson y Townes, 1985; Reife y col., 1991) y dependen de la concentración de *M. tuberculosis* del CFA (Watson y Townes 1985). Un estudio realizado en ratones C57BL/6 demostró que se requieren dosis altas de *M. tuberculosis* para la activación y maduración de las células dendríticas y así preparar a las células Th CD4<sup>+</sup> específicas para el CII en los nódulos linfoides (Kai y col., 2006). Como consecuencia de esto, se produce un aumento de expresión de los TLR en las células mononucleares de los nódulos linfoides (Cho y col., 2007). Los Ac específicos del CII producidos por las células B activadas inducen la respuesta local inflamatoria mediada por macrófagos, granulocitos y células T que son atraídas a la articulación, dando lugar a la destrucción de hueso y cartílago (Luross y Williams, 2001).

El papel de las células TCD4<sup>+</sup> específicas de CII en el inicio de la enfermedad se ha analizado en numerosos estudios en modelos murinos de AR (Kadowaki y col., 1994; Mauri y col., 1997). La administración oral de CII de pollo en un modelo de CIA en ratas, demostró efectos beneficiosos por regulación del balance Th1/Th2 y Th17/Treg (Tong y col., 2010). Un estudio realizado en ratas tratadas con un Ac anti-TCR mostró

un efecto preventivo, pero no curativo, en el desarrollo de la artritis (Yoshino y Cleland, 1992). Asimismo, se ha observado que el uso de un Ac anti-CD4 (Chu y Londei, 1996) tanto en ratones con CIA como en ratones SCID mediante transferencia de CIA previene el desarrollo de la artritis.

Utilizando una mezcla de Ac monoclonales anti-CII, sólo o en combinación con LPS (de *LipoPolySaccharide*), se puede inducir una artritis similar a CIA (Nandakumar y col., 2003). Este modelo de CAIA, permite inducir artritis severa en aproximadamente 24-48 horas en casi todas las cepas de ratones, incluyendo ratones resistentes a CIA, ratones KO (*KnockOut*) y ratones transgénicos. Permite aumentar la gravedad, incrementando la dosis de Ac, así como sincronizar el inicio de la enfermedad. Sin embargo, las células T y las células B no juegan un papel en el desarrollo de la enfermedad.



**HIPÓTESIS**

---



El papel de TGF- $\beta$  como agente modulador de la respuesta inmune, su implicación como agente pro- y antiinflamatorio, así como su papel en la diferenciación de las distintas poblaciones de células T (Treg, Th17 y Th9), hacen que sean necesarias más investigaciones acerca de la implicación de TGF- $\beta$  en el desarrollo de la AR.

La hipótesis de este trabajo es que el bloqueo funcional específico de TGF- $\beta$  en el modelo de CIA puede tener diferentes consecuencias en función del momento de la enfermedad. Así, durante la fase de inducción, este bloqueo podría afectar tanto la diferenciación como la funcionalidad de las células Th17 y Treg, con la consecuente inhibición o disminución en el desarrollo y la gravedad de la artritis dependiendo del efecto predominante. Por el contrario, el bloqueo funcional específico de TGF- $\beta$  una vez establecida la artritis provocaría un empeoramiento de la enfermedad debido al bloqueo funcional de las células Treg



## **OBJETIVOS**

---



- 1.- Analizar la señalización de TGF- $\beta$  en el tejido sinovial reumatoide y estudiar la fosforilación de proteínas Smad en respuesta a la estimulación con TGF- $\beta$  en fibroblastos sinoviales reumatoides.
- 2.- Analizar el efecto clínico de bloquear selectivamente TGF- $\beta$  sobre el desarrollo clínico de la artritis inducida por CII y su gravedad durante la fase de inducción de la artritis y una vez establecida la enfermedad.
- 3.- Evaluar histológicamente el efecto del tratamiento sobre el grado de inflamación y destrucción ósea y cartilaginosa en ratones con CIA.
- 4.- Analizar el efecto de inhibir TGF- $\beta$  sobre la diferenciación y funcionalidad de las diferentes poblaciones de células T (Th1, Th17, Th2 y Treg), en el modelo de CIA.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 1. Experimentos realizados con muestras procedentes de pacientes

### 1.1. Pacientes

Las muestras de tejido sinovial de pacientes con AR y OA, se obtuvieron de sinovectomías quirúrgicas coincidiendo con colocación de prótesis de rodilla y por artroscopia en pacientes sometidos a cirugía de meniscopatía o lesión de ligamentos cruzados en muestras de tejido sinovial sano. Dependiendo de la finalidad de las muestras, unas biopsias se utilizaron para obtener cultivos de fibroblastos y otras biopsias se fijaron en una solución de formalina al 10% y se incluyeron en parafina para los ensayos InmunoHistoQuímicos (IHQ).

### 1.2. Detección de proteínas Smad por inmunohistoquímica

Las biopsias de MS procedentes de pacientes con AR, OA e individuos sanos se incluyeron en parafina para realizar los estudios por IHQ.

Los tejidos parafinados se cortaron con un microtomo a 4 $\mu$ m y se montaron en portaobjetos silanizados (Dako; California, EEUU). Las muestras se desparafinaron en un bloque térmico (Techne; Cambridge, Reino Unido) a 60°C y se rehidrataron con xilenos (Merck; Darmstadt, Alemania) durante 10 minutos y alcoholes (Merck) seriados (100%, 96%, 70%) durante 2 minutos cada uno.

La detección de los Ac se realizó siguiendo el método indirecto de avidina-biotina-peroxidasa. Previamente, las muestras se bloquearon con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich; Steinheim, Alemania) al 3% en metanol (Lab-Scan; Sowinskiogo, Polonia) durante 15 minutos a Temperatura Ambiente (TA), para bloquear la peroxidasa endógena. Posteriormente, se lavaron los tejidos con PBS y se bloquearon con el suero correspondiente (NGS, de *Normal Goat Serum* o NHS, de *Normal Horse Serum*), de la misma especie animal del Ac secundario, durante 30 minutos a TA. A continuación, se añadieron los Ac primarios anti-fosfo-Smad-2/3 (anti-p-Smad-2/3; Ser 423/425) policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Inc; California, EEUU) o anti-Smad-7 (N-19) policlonal de cabra (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:50 en solución de bloqueo y se incubaron toda la noche en la cámara húmeda a 4°C. Las muestras se lavaron con PBS (*Phosphate Buffered Saline*) y se incubaron con el Ac secundario anti-

IgG biotinilado a una dilución 1:200, durante 20 minutos en la cámara húmeda a TA. Los complejos avidina-biotina-peroxidasa se prepararon según el protocolo del producto (*Vectastain elite ABC kit*; Vector; Burlingame, California, EEUU) incubando las secciones durante 30 minutos a TA en la cámara húmeda. Las muestras se revelaron con el cromógeno DAB (*DiAminoBenzidine peroxidase substrate kit*; Vector) según las instrucciones del fabricante. Las secciones se tiñeron con hematoxilina (Vector) y por último, tras deshidratar los tejidos con alcoholes seriados (70%, 96%, 100%) y xilenos, se montaron con medio DPX (Panreac; Barcelona, España).

En todos los experimentos se incluyeron controles negativos en los que se omitió el Ac primario.

### **1.3. Cultivos celulares de FS humanos**

Los cultivos de FS se establecieron a partir del crecimiento de explantes procedentes de pacientes con AR, OA e individuos sanos, incubados en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con un contenido de glucosa del 4.5g/L (Lonza; Viviers, Bélgica), y suplementado con 20mM de glutamina (Invitrogen; Piesley, Reino Unido), una mezcla de antibióticos que contenía 50U/ml de penicilina y 50µg/ml estreptomina (Lonza) y con un 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Lonza). Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera controlada con 5% CO<sub>2</sub>. Todos los experimentos se llevaron a cabo cuando los cultivos de FS se encontraban en crecimiento subconfluyente entre los pases tercero y noveno.

### **1.4. Fosforilación de Smad-2 en FS humanos mediante Western blot (WB)**

#### **1.4.1. Extracción de proteínas totales**

Los FS en cultivo se mantuvieron en medio DMEM completo privado de suero durante 24 horas, y se incubaron en presencia y/o ausencia de TGF-β 5ng/ml, durante 1 hora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Las células se lavaron con PBS y fueron resuspendidas en una solución de lisis que contenía Tris-HCl (*2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol hydrochloride*) pH 8.1 10mM, EDTA (*EthyleneDiamineTetraAcetic acid*) 1mM, NaCl

(*Sodium Chloride*) 150mM, SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 0.1%, suplementado con los inhibidores de proteasas leupeptina 10µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, pepstatina A 2µg/ml y PMSF (*PhenylMethylSulphonyl Fluoride*) 0.5mM (Sigma-Aldrich). Las células se mantuvieron en hielo durante 30 minutos agitando ocasionalmente con el vórtex y el lisado se centrifugó a 14000g durante 10 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante resultante. Por último, la concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford, utilizando el reactivo *Bio-Rad Protein Assay* de Bio-Rad.

#### 1.4.2. Inmunodetección de proteínas específicas

Una cantidad de 40µg de proteínas de cada uno de los extractos se calentó a 100°C durante 5 minutos en solución de carga de SDS con β-mercaptoetanol. Posteriormente, las proteínas se separaron mediante PAGE-SDS (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate*) al 10% y se transfirieron a membranas de PVDF (*PoliVinilDenediFloride*, GE Healthcare; Buckinghamshire, Reino Unido) mediante transferencia húmeda a 100V durante 1 hora. Las uniones inespecíficas se bloquearon durante 2 horas a TA con la solución PhosphoBLOCKER (Cell Biolabs; San Diego California, EEUU) al 5% en TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween-20*; Tris 20mM pH 7.6, NaCl 137mM y Tween-20). Después de lavar con TBS-T, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los Ac primarios anti-p-Smad-2 policlonal de conejo (Cell Signaling; Beverly Massachusetts, EEUU) a una dilución 1:200 en solución de bloqueo, o anti-β-actina monoclonal de ratón (clon AC-15, Sigma; Steinheim, Alemania) a una dilución 1:20000. Las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron 1 hora con el Ac secundario correspondiente conjugado con peroxidasa. Tras lavar durante 30 minutos, se visualizaron las bandas con el reactivo *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce; Rockford IL, EEUU) y se analizaron por densitometría con el equipo Chemidoc (BioRad; Hercules California, EEUU).

## 2. Experimentos realizados con muestras murinas

### 2.1. Detección de proteínas Smad tras el bloqueo de TGF- $\beta$ mediante WB

Para comprobar el bloqueo específico de p17 sobre TGF- $\beta$ , se recogieron células de bazo de un ratón macho DBA/10IaHsd obtenidas mediante digestión mecánica con un separador celular de nylon de 40 $\mu$ m de tamaño de poro (BD Falcon; Erembodegem, Bélgica). Posteriormente, y tras previa lisis de los eritrocitos con RCLB (de *Red Cell Lysis Buffer*), se sembraron las células en una concentración de 2x10<sup>6</sup> células/ml en medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute medium*, Lonza) con un contenido de Hepes (*N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic acid*) de 25mM (Lonza), y suplementado con glutamina 20mM (Invitrogen),  $\beta$ -mercaptoetanol 50 $\mu$ M (Invitrogen), una mezcla de antibióticos constituida por penicilina 50U/ml y estreptomycin 50 $\mu$ g/ml (Lonza) y privadas de suero.

El rTGF- $\beta$ 1 humano (de *human recombinant CHO cell line*, Calbiochem; Darmstadt, Alemania) a una concentración de 5ng/ml en HCl 4mM/BSA 0,1% se incubó en presencia y/o ausencia de p17 (50 $\mu$ M) durante 1 hora a 37°C, antes de ser añadido a la suspensión celular para favorecer el bloqueo del TGF- $\beta$ . Tras 4 horas con el estímulo, las células se lavaron con PBS y fueron resuspendidas en tampón de lisis para extraer las proteínas totales (ver apartado 1.4.1).

Las proteínas totales (40 $\mu$ g de cada muestra) fueron separadas mediante PAGE-SDS al 10% y transferidas mediante transferencia húmeda. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los Ac primarios anti-p-Smad-2 (Cell Signaling) a una dilución 1:200 o anti- $\beta$ -actina (Sigma) a una dilución 1:20000 (ver apartado 1.4.2).

### 2.2. Purificación de CII y confirmación de la pureza por WB

El CII utilizado para la inmunización de los ratones se purificó a partir de cartílago de pollo procedente del esternón. En primer lugar, se separó el pericondrio, incubando el cartílago a 4°C toda la noche en agitación en una solución de TrisCl 50mM pH 7,5 y NaCl 1M. Es importante separar el pericondrio, ya que podría ser un contaminante del colágeno purificado por su alto contenido en colágeno tipo I. Posteriormente, el

cartílago se pulverizó en nitrógeno líquido y se mantuvo toda la noche a 4°C en agitación en una solución de guanidina 4M-HCl (5 volúmenes de solución por gramos de peso seco) para eliminar los proteoglicanos. Una vez eliminados los proteoglicanos del cartílago, se centrifugó a 14.000g durante 1h a 4°C y se retiró el sobrenadante, repitiendo este paso una vez más. A continuación, el sedimento se resuspendió en 20 volúmenes de ácido acético 0.5M, se ajustó a un pH 2.8 con ácido fórmico y se añadió 1gr de pepsina por cada 20gr de peso seco de cartílago, manteniéndolo en agitación durante 48 horas a 4°C. La solución se centrifugó a 14.000g durante 1h a 4°C y se recogió el sobrenadante para obtener el CII. Para precipitar el colágeno, se añadió NaCl gradualmente en agitación y se mantuvo toda la noche a 4°C. A continuación, se centrifugó a 14.000g durante 1h a 4°C, se disolvió el *pellet* en 100ml de ácido acético 0.1M y se dializó tres veces con Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 M pH 9.4 hasta obtener un precipitado. Por último, se centrifugó a 14.000g durante 1h a 4°C y se resuspendió en 100ml de ácido acético 0.5M, dializando contra la misma solución de ácido acético. El colágeno se liofilizó en el liofilizador Lyoquest (Telstar; Barcelona, España) y se mantuvo a 4°C para preparar la emulsión de colágeno necesaria para la inmunización de los ratones.

El análisis de la pureza del CII se realizó mediante PAGE-SDS. Para comprobar su pureza, se utilizó una muestra de CII de concentración conocida (1µg/µl) previamente purificado como control. El gel se visualizó mediante tinción de azul de Coomassie al 0.2% y una única banda de aproximadamente 100KDa fue visualizada (figura 4), sin observarse degradación ni presencia de impurezas.

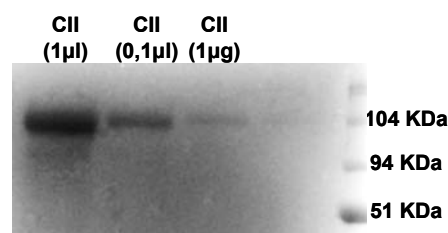


Figura 4. Análisis de la pureza del CII por PAGE-SDS. Colágeno de tipo II de pollo (purificado a partir de esternón) se separó en un gel de poliacrilamida al 10% y se visualizó mediante tinción de azul de Coomassie. Se muestran los marcadores de peso molecular.

### 2.3. Inmunización de los ratones

Ratones macho DBA/10laHsd de 10-11 semanas de edad, se inmunizaron intradérmicamente en la base de la cola con 100 $\mu$ l de una emulsión de CII de pollo 4 mg/ml, en CFA 3,3 mg/ml (dilución 1:1) (figura 5). Previamente, el CII se disolvió en ácido acético 0,1M mediante agitación a 4°C durante toda la noche. Para preparar la emulsión de CFA, se homogeneizaron 100mg de *M. tuberculosis* H37 RA inactivado por calor (Difco Laboratories; Detroit Michigan, EEUU) en 30 ml de IFA (de *Incomplete Freund's Adjuvant*) (Difco Laboratories).



Figura 5. Inmunización intradérmica con CII (200 $\mu$ g) en ratones macho DBA/10laHsd.

### 2.4. Tratamiento de los ratones

Según el tipo de experimento, los ratones fueron tratados durante la fase de inducción de la artritis, o una vez establecidos los signos de inflamación.

En los experimentos de tratamiento realizados durante la fase de inducción de la artritis, los ratones se trataron diariamente y durante 21 días desde la fecha de inmunización, con 75 $\mu$ g del péptido p17 (cedido por el Centro de Investigación de Medicina Aplicada de la Universidad de Navarra, Pamplona, España) mediante inyección intraperitoneal. Como tratamiento control, se utilizó PBS en las mismas condiciones. Los ratones se sacrificaron bajo anestesia con isoflurano (Forane, Abbott; Madrid, España) a las 6 semanas desde la fecha de inmunización. En el momento del sacrificio, se recogió la sangre para obtener el suero y a continuación, se recogieron las muestras de bazo, ganglios linfáticos inguinales y articulaciones para su posterior análisis.

En los experimentos de tratamiento realizados durante la fase de enfermedad establecida, ratones previamente inmunizados con CII, se trataron con p17 (100 $\mu$ g) o PBS (control), diariamente desde el comienzo de la enfermedad y durante 10 días, hasta la fecha de sacrificio (figura 6).

La dosis recomendada de p17 para uso *in vivo*, varía entre 75 $\mu$ g-100 $\mu$ g. Los experimentos de tratamiento durante la fase de inducción de la artritis se realizaron con la dosis de 75 $\mu$ g. En la fase de tratamiento en ratones con la artritis establecida se probaron ambas dosis 75 y 100 $\mu$ g y sin observarse diferencias entre ambas.

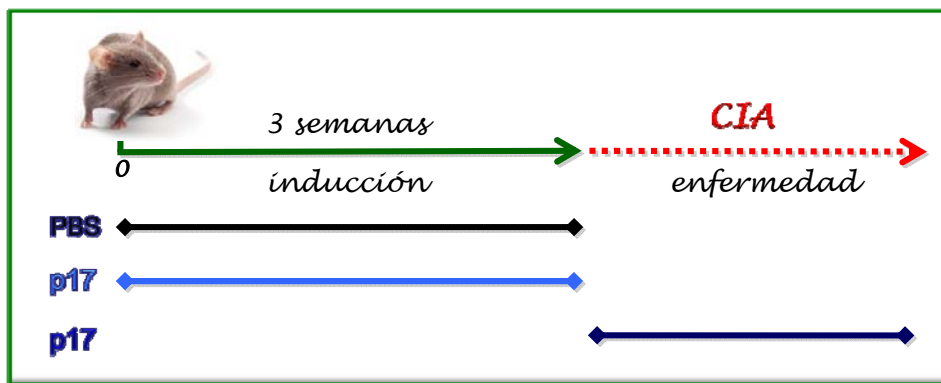


Figura 6. Ratones macho DBA/101aHsd de 10-11 semanas de edad fueron inmunizados y tratados diariamente con p17 o PBS intraperitoneal durante 3 semanas desde la fecha de inmunización en la fase de inducción y 10 días desde el inicio de la inflamación en la fase de enfermedad establecida.

## 2.5. Monitorización de los ratones

### 2.5.1. Evaluación clínica

Los signos de artritis fueron examinados y monitorizados diariamente utilizando como parámetros la inflamación de las articulaciones y el score clínico. La inflamación de las articulaciones se cuantificó con un calibre de 0-10mm (Mitutoyo; Japón) (figura 7a). Como criterios para evaluar el score clínico se utilizaron los siguientes: (0) normal, (1) ligera inflamación y eritema, (2) inflamación con edema pronunciado, y (3) rigidez de la articulación hasta un score máximo de 12 por ratón (figura 7b-e).

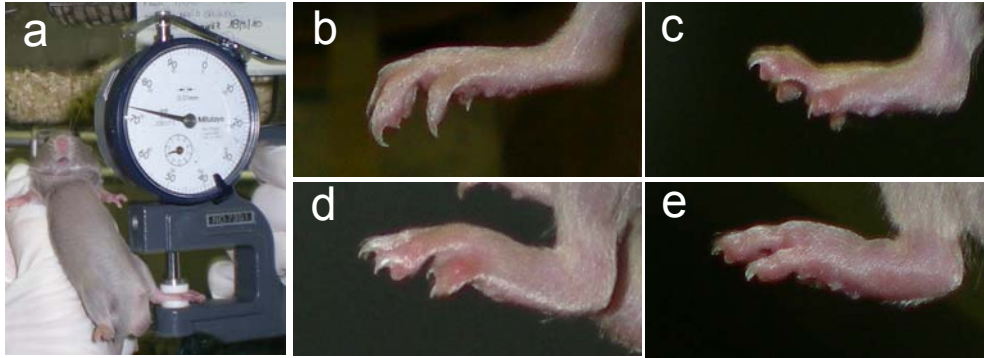


Figura 7. Evaluación diaria del score clínico. (a) Cuantificación de la inflamación mediante un calibre de diámetro conocido (0-10mm). (b-e) criterios de evaluación del score clínico. (b) score 0. (c) score 1. (d) score 2. (e) score 3.

### 2.5.2. Tinción y evaluación histológicas

El grado de inflamación y destrucción articular se analizó en articulaciones superiores e inferiores incluidas en parafina mediante tinción con hematoxilina-eosina. Los tejidos se desparafinaron en un bloque térmico (Techne; Cambridge, Reino Unido) a 60°C y se mantuvieron durante 10 minutos en xileno (Merck) y posteriormente en alcoholes (Merck) seriados (100%, 96%, 70%) durante 2 minutos cada uno. Tras lavar con PBS, las muestras se tiñeron con hematoxilina (Vector) y eosina (Sigma-Aldrich) y se deshidrataron con alcohol (70%, 96%, 100%) y xileno, manteniendo los mismos tiempos utilizados con anterioridad. Por último, se montaron con el medio de montaje DPX (Panreac) y se visualizaron en el microscopio para evaluar la inflamación y destrucción de las articulaciones.

De este modo, el daño de las articulaciones se cuantificó teniendo en cuenta los siguientes parámetros: normal (0), infiltración moderada con erosiones discretas (1), infiltración severa y erosiones moderadas (2) y erosiones severas con pérdida de la estructura de la articulación (3). Para evaluar el daño articular se hizo una media del score histológico por articulación y se sumó el score histológico de todas las articulaciones hasta obtener un máximo de 12 por ratón.

Las tinciones con safranina O destinadas a valorar el cartílago articular, se realizaron sobre tejido parafinado cortado en un microtomo (4µm) y montados en portaobjetos silanizados (Dako). Los tejidos se desparafinaron como se citó

anteriormente, y se hidrataron con agua destilada. A continuación, se tiñeron con la solución de hematoxilina *Weigert's iron hematoxylin* (hematoxilina al 1% en alcohol al 95% (Sigma-Aldrich), cloruro férrico al 29% en agua con un contenido de ácido clorhídrico del 1%; proporción 1:1 hematoxilina:cloruro férrico) durante 10 segundos y se lavaron abundantemente con agua. Seguidamente, las muestras se tiñeron con la solución *Fast green* (FCF) al 0,01% (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos y se lavaron rápidamente con ácido acético al 1% durante 15 segundos. Posteriormente, los tejidos se tiñeron con la solución de safranina O al 0,1% (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos y se deshidrataron las muestras con alcohol y xileno durante 2 minutos cada uno. Por último, las muestras se montaron con el medio de montaje DPX (Panreac) y se visualizaron al microscopio. Como resultado de esta tinción, los núcleos se tiñeron de negro, mientras que el cartílago y la mucina articular se visualizaron de rojo, debido a la safranina, quedando el resto del citoplasma de color verde.

La destrucción del cartílago articular se evaluó de 0 a 4, en función de la pérdida del cartílago articular dependiendo de los siguientes parámetros: (0) 0%, (1) < 25%, (2) 25-50%, (3) 50-75% y (4) 75-100%. Por último, se calculó el score histológico de cada individuo, analizado como la suma de los scores de las cuatro articulaciones.

## **2.6. Ensayo de proliferación celular. Respuesta específica al CII**

El ensayo de proliferación celular se realizó en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Se preparó una suspensión celular de linfocitos procedentes de ganglio linfático inguinal de ratones con CIA tratados con p17 o PBS y se sembraron 200.000 células por pocillo, cultivados en presencia y ausencia de 50µg/ml de CII, o 100ng/ml de anti-CD3 (a-CD3, *purified anti-mouse CD3ε clone 145-2C11*, BioLegend; San Diego California, EEUU) como control positivo de la proliferación celular.

El CII utilizado para la estimulación celular *in vitro*, se disolvió en una solución de Tris-HCl 0,05M/NaCl 0,2M, mediante agitación toda la noche a 4°C. Previamente a añadirlo al cultivo, el CII se inactivó con calor durante 30 minutos a 60°C.

A las 48 horas de cultivo, se recogieron 100µl de los sobrenadantes para medir la producción de citoquinas por ELISA (de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y a las 72 horas se midió la proliferación celular en respuesta a los estímulos. Para ello, se añadieron 10µl del reactivo WST-1 (*cell proliferation reagent*, Roche; Mannheim,

Alemania) por pocillo, se incubó durante 4 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y se midió la absorbancia a 450nm usando como nivel de referencia una longitud de onda de 620nm.

## 2.7. Análisis de la expresión de citoquinas en sobrenadantes de cultivo

La producción de IFN- $\gamma$  e IL-17 en los sobrenadantes recogidos a las 48 horas se cuantificó mediante ELISA, a partir del cultivo de linfocitos aislados de ganglio linfático inguinal. Se siguieron las indicaciones del fabricante en ambos casos (*mouse IFN- $\gamma$  ELISA max set standard* y *mouse IL-17A ELISA max set standard*, BioLegend) para determinar la cantidad de dichas citoquinas en respuesta a la estimulación con CII y  $\alpha$ -CD3.

## 2.8. Análisis de poblaciones celulares por citometría de flujo (CMF)

### 2.8.1. Tinción intracelular de citoquinas

Se realizaron las siguientes combinaciones de Ac:

- Marcaje triple IFN $\gamma$ +/IL17+/CD4+ como indicadores de la respuesta Th1/Th17
- Marcaje triple IL10+/IL4+/CD4+ como indicador de la respuesta Th2
- Marcaje triple IFN $\gamma$ +/IL17+/CD8+ para analizar el porcentaje de células CD8 productoras de citoquinas
- Marcaje triple IFN $\gamma$ +/IL17+/ $\gamma$  $\delta$ TCR+ para analizar el porcentaje de células  $\gamma$  $\delta$ TCR productoras de citoquinas

Las suspensiones celulares se obtuvieron de ganglio linfático inguinal de ratón mediante separación mecánica. Se sembraron 500.000 células por pocillo (placas de fondo redondo de 96 pocillos, Nunc; Roskilde, Dinamarca) en medio RPMI 1640 completo y se estimularon con PMA (de *Phorbol Myristate Acetate*) 20ng/ml (Sigma-Aldrich) e ionomicina 1 $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich), en presencia de brefeldina A 10 $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich) durante 4 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Posteriormente, las células se tiñeron en superficie con los Ac anti-CD4-PerCP (*PerCP rat anti-mouse CD4, clon RM4-5*, BD Biosciences; San Diego, California, EEUU), anti-CD8-PE-Cy5 (*PE/Cy5 rat anti-mouse CD8a, clon 53-6.7*, BioLegend) o

anti- $\gamma\delta$ TCR PE-Cy5 (*PE-Cy5 rat anti-mouse gamma delta TCR, clon eBioGL3*, eBioscience; San Diego, California EEUU) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Tras lavar las muestras con buffer (PBS-BSA 0,5%-EDTA 2mM), se centrifugaron a 500g durante 5 minutos, se fijaron con PFA al 1% durante 15 minutos a 4°C y se permeabilizaron con buffer de permeabilización (PBS-BSA 0,5%-EDTA 2mM-saponina 0,5%), durante 30 minutos en oscuridad a TA.

A continuación se tiñeron intracelularmente con anti-IFN $\gamma$ -FITC (*clon XMGI.2*, BD Biosciences), anti-IL17-PE (*clon TC11-18H10*, Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Alemania), anti-IL10-FITC (*clon JES5-16E3*, BD Biosciences) y anti\_IL4-PE (*clon 11B11*, BD Biosciences) y se mantuvieron durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. En el caso de las tinciones triples para CD4+, el Ac se incluyó también al hacer la tinción intracelular. Por último se lavaron las células, se resuspendieron en PBS y se analizaron con el Citómetro FACSCalibur (BD Biosciences).

La adquisición y análisis de las muestras se realizó con el programa *Cell Quest Pro* (BD Biosciences). En primer lugar, se definió la población de linfocitos del total de células de ganglio linfático inguinal por su tamaño y complejidad y se seleccionó la región de interés, correspondiente a las células positivas (CD4, CD8 o  $\gamma\delta$ TCR) según la tinción. Posteriormente se calculó el porcentaje de estas células productoras de citoquinas. En la figura 8 se muestra un esquema del proceso.

### 2.8.2. Tinción de células Treg

Se realizaron las siguientes combinaciones de Ac:

- Marcaje triple CD25+/Foxp3+/CD4+ como indicador de la respuesta Treg en los LT CD4+.
- Marcaje triple CD25+/Foxp3+/CD8+ como indicador de la respuesta Treg en los LT CD8+.

Partiendo de la misma suspensión de células de ganglio inguinal de ratón utilizada para la tinción de citoquinas y los ensayos de estimulación, se sembraron 500.000 células por pocillo, se lavaron con buffer y se centrifugaron a 500g durante 5 minutos a 4°C. Consecutivamente, se tiñeron con los marcadores extracelulares anti-CD4-PerCP, anti-CD8-PE-Cy5 y anti-CD25-FITC (*FITC rat anti-mouse CD25, IL-2 receptor  $\alpha$  chain p55, clon 7D4*, BD Biosciences) mediante incubación de 30 minutos a 4°C en

oscuridad. Se lavaron las células una vez más con buffer y se fijaron con el buffer de fijación 1X para Foxp3 (*Mouse Foxp3 buffer set*, BD Biosciences) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Se lavaron las células y se resuspendieron en buffer de permeabilización 1X de ratón para Foxp3 (BD Biosciences), centrifugando a 500g durante 5 minutos. Se permeabilizaron las células con buffer de permeabilización 1X mediante incubación a 37°C en oscuridad durante 30 minutos, se lavaron con buffer y se tiñeron intracelularmente con anti-Foxp3-PE (*clon MF-23*, BD Biosciences) durante 20 minutos a TA en oscuridad. Por último, se lavaron las células y se resuspendieron en PBS para analizarlas inmediatamente con el Citómetro BD FACSCalibur. El análisis de las muestras se realizó con el programa *Cell quest pro* (BD Biosciences). En primer lugar se calculó el porcentaje de células (CD4 o CD8) y se seleccionó la región positiva para analizar las células dobles positivas (CD25+/Foxp3) (en la figura 9 se observa un ejemplo significativo de la tinción de células Treg CD4+).

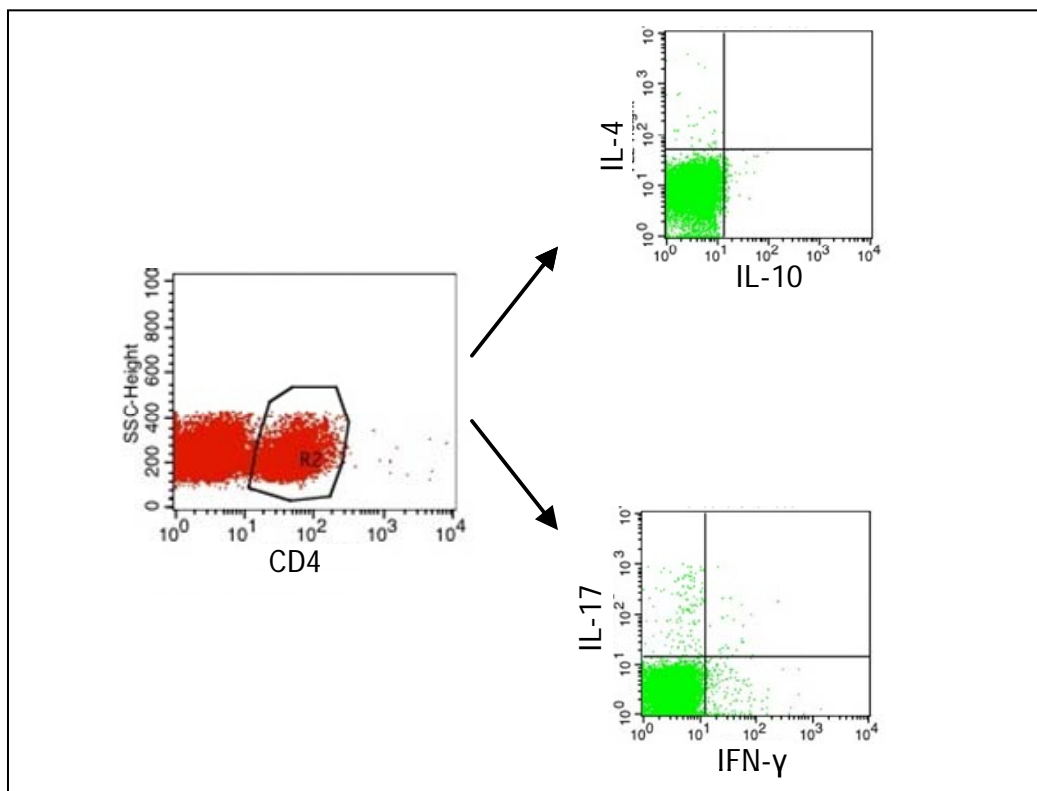


Figura 8. Tinción intracelular de citoquinas en la población de células T CD4+ de una muestra representativa. Se muestran las células CD4 totales y doble productoras de IL-17/IFN- $\gamma$  e IL-4/IL-10.

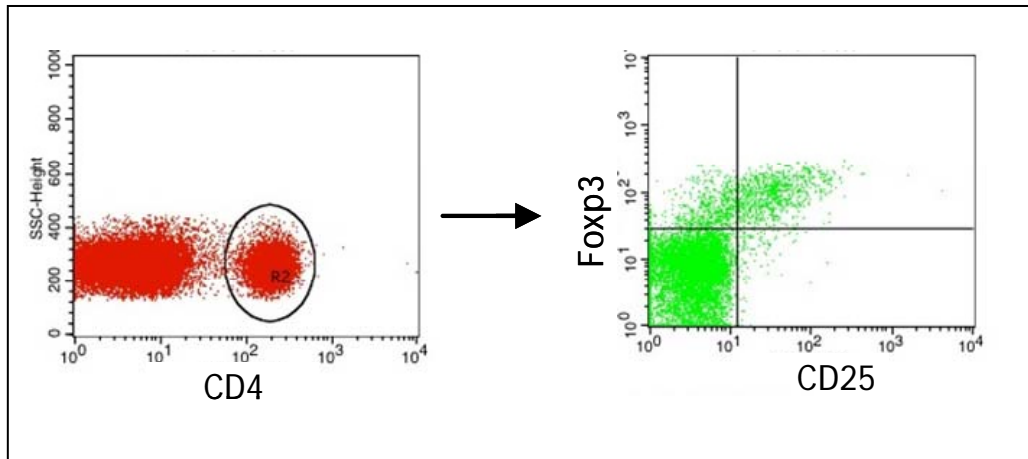


Figura 9. Tinción representativa de células Treg CD4<sup>+</sup> analizadas por citometría de flujo.

## 2.9. Extracción de ARN de tejido y PCR cuantitativa a tiempo real

Se utilizaron muestras de bazo y articulación inflamada procedentes de ratones con CIA tratados y no tratados con p17 para analizar la expresión de diferentes citoquinas y factores de transcripción: IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , Ror $\gamma$ t, IL-23 y FoxP3, utilizando GAPDH (*GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase*) como control endógeno.

En el momento del sacrificio, se congelaron las muestras en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta ser procesadas. El tejido procedente de cada ratón se pesó y pulverizó con nitrógeno líquido. Para extraer el ARN, se añadió 1ml de TRI Reagent (Sigma-Aldrich) por cada 50-100mg de tejido. El ARN total se extrajo siguiendo las instrucciones del producto, se cuantificó con el Nanodrop (Thermo Fisher; Wilmington Delaware EEUU) y se obtuvo ADN complementario (ADNc) a partir de 1 $\mu$ g de ARN, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*High capacity cDNA reverse transcription*, Applied Biosystems; Warrington, Reino Unido). La PCR cuantitativa a tiempo real se llevó a cabo en un termociclador (*7500 Fast Real-Time PCR*, Applied Biosystems) utilizando SYBR Green (*Power SYBR Green PCR Master Mix*, Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se emplearon las siguientes secuencias de oligonucleótidos:

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.

Oligonucleótidos	Secuencia directa 5' → 3'	Secuencia reversa 5' → 3'
<b>IL-6</b>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<b>IL-17</b>	GCAATGAAGACCCTGATAGATATCC	TTCATGTGGTGGTCCAGCTTT
<b>IFN-γ</b>	GCGGCTGACTGAACTCAGATT	CACTGCAGCTCTGAATGTTTCTTATT
<b>Foxp3</b>	CCCATCCCCAGGAGTCTTG	ACCATGACTAGGGGCACTGTA
<b>IL-23</b>	AAAATAATGTGCCCGTATCCAG	GCTCCCCTTTGAAGATGTCAG
<b>Roryt</b>	AGTGTAATGTGGCCTACTCCT	GCTGCTGTTGCAGTTGTTTCT
<b>GAPDH</b>	CATGGCCTTCCGTGTTCTTA	GCGGCACGTCAGATCCA

Se realizó una cuantificación relativa de la expresión génica. Para ello se comparó la cantidad de ARNm de cada uno de los genes, normalizada con el gen de referencia endógeno GAPDH. La expresión de todos los genes se obtuvo mediante el uso de curvas estándar.

### 2.10. Cuantificación de los niveles séricos de Ac anti-CII

La presencia de Ac IgG1 e IgG2a frente a CII se cuantificó por ELISA en el suero de ratones con CIA tratados y no tratados con p17. Para obtener el suero, la sangre se recogió en un tubo seco, se mantuvo 2 horas a TA y se conservó toda la noche a 4°C para favorecer la formación del coágulo. Posteriormente, la sangre se centrifugó a 3000rpm durante 10 minutos a 4°C y se recogió el suero, manteniéndolo a -20°C hasta su posterior análisis.

El experimento se realizó en placas de 96 pocillos de fondo plano (*EIA plate*, Costar; Washington, EEUU) cubiertas con 2µg/ml de CII disuelto en Tris buffer (0,05M Tris, 0,2M NaCl, pH 7.4) que se incubaron toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 0,05% (PBST) y se bloquearon con 2% de BSA en PBS durante 1 hora a TA. Tras lavar con PBST, las muestras se incubaron durante 2 horas a TA con la dilución correspondiente, utilizando diluciones seriadas de una mezcla de sueros de concentración conocida procedente de ratones con CIA como curva estándar. La concentración más elevada de la muestra de referencia se asignó arbitrariamente a una concentración de 1 UR/ml. Los niveles de Ac anti-CII IgG1 e IgG2a se detectaron

mediante incubación con los Ac secundarios *rat anti-mouse* IgG1 e IgG2a-HRP (BD Biosciences), durante 1 hora a TA. Las placas se lavaron con PBST y se incubaron con el sustrato TMB (*3,3', 5,5'-TetraMethylBenzidine*, BD Biosciences). La reacción colorimétrica se detuvo con HCl 2N y por último se midió la densidad óptica a 450nm, utilizando una absorbancia de 560nm como referencia. La concentración de Ac de cada muestra de suero se obtuvo refiriendo cada valor a la curva estándar.

### **2.11. Cuantificación de los niveles séricos de IL-6**

El suero extraído de los ratones, se utilizó para determinar mediante ELISA (*Mouse IL-6 ELISA max set standard*, BioLegend) la concentración de IL-6 como indicador de inflamación aguda. Para ello, placas de 96 pocillos de fondo redondo (*EIA plate*, Costar), se incubaron con 200µl del Ac de captura toda la noche a 4°C y se continuó con el protocolo según las indicaciones del producto.

## **3. Análisis estadístico de los resultados**

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de cada experimento referente a la incidencia y la gravedad de la enfermedad y, posteriormente, se realizaron las comparaciones entre grupos de tratamiento empleando un test de ANOVA para medidas repetidas con el fin de comparar el score clínico y el número de articulaciones afectadas. Paralelamente, se calculó el área bajo la curva del score clínico y del incremento del score clínico (score diario respecto al score del inicio de la inflamación) para cada uno de los individuos a lo largo del proceso inflamatorio. La comparación del análisis histológico, la cuantificación de las poblaciones celulares, los ensayos de proliferación y producción de citoquinas, los niveles de Ac en suero y el análisis de ARNm entre ambos grupos de tratamiento se realizó utilizando el test de Mann-Whitney U. La comparación de medias entre más de dos grupos se analizó por ANOVA de una vía utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. La correlación entre variables se analizó mediante el test no paramétrico de Spearman.

Los datos fueron analizados con los programa Graph Pad Prism Software (versión 5.01, Graph Pad; California, EEUU) y SPSS (versión 15.0, SPSS Iberica; Madrid,

España). Los resultados fueron considerados significativos cuando el valor de  $p$  fue menor de 0,05.

#### **4. Estrategia de búsqueda bibliográfica**

Para realizar la búsqueda bibliográfica de las publicaciones relevantes, se utilizó la base de datos electrónica Medline a través de la página web de Pubmed. La búsqueda se realizó mediante términos MeSh y libres. A continuación se realizó una combinación de los términos MeSh con los términos “OR” y “AND” para búsquedas avanzadas.

Adicionalmente se realizó una búsqueda activa de todas las referencias incluidas en los artículos seleccionados, relacionadas con nuestro trabajo, tratando de buscar los manuscritos más pioneros en cada uno de los temas.

Para realizar la búsqueda de las referencias seleccionadas y establecer la bibliografía se utilizó el programa EndNoteX3 (<http://www.myendnoteweb.com:80/>).

## RESULTADOS

---



## 1. Expresión de proteínas Smad en tejido sinovial reumatoide

Con el fin de obtener evidencias de la activación de TGF- $\beta$  en la sinovial reumatoide, estudiamos la presencia y distribución de proteínas Smad reguladoras/inhibidoras (Smad-2/3 y Smad-7) en el tejido sinovial reumatoide (n=7), artrósico (n=8) y control sano (n=10). El análisis realizado por IHQ mostró la presencia de niveles elevados de fosforilación de Smad-2/3 en los vasos sanguíneos y en las células del *lining* de pacientes con AR (figura 10a) y OA (OsteoArtritis) (figura 10c), siendo menor en las muestras procedentes de individuos sanos (figura 10e). La expresión de Smad-7 fue similar en los tres grupos y apareció homogéneamente distribuída en las células tanto del *lining* como del endotelio vascular (figura 10b, d y f). Los agregados mononucleares de los infiltrados inflamatorios en la sinovial reumatoide expresaron p-Smad-2/3 y, en menor medida, Smad-7 (figura 10a y b). Asimismo, dichos infiltrados inflamatorios fueron menores en las muestras de pacientes con OA y ausentes en pacientes sanos. Estos datos sugieren activación de la vía de TGF- $\beta$  en las células de los infiltrados linfocitarios.

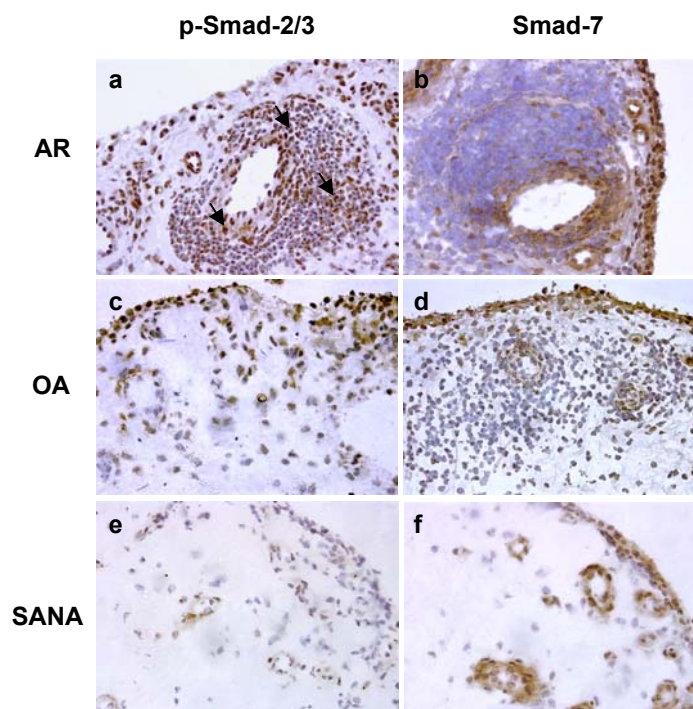


Figura 10. Inmunodetección de proteínas Smad (p-Smad-2/3 y Smad-7) en tejido procedente de MS reumatoide (AR) (a-b), artrósica (OA) (c-d) y sana (e-f) representativa de cada grupo. Análisis realizado por inmunohistoquímica en muestras parafinadas. (400X). Las flechas señalan las células de los agregados de tejido sinovial reumatoide.

## 2. Fosforilación de Smad-2 en fibroblastos sinoviales

A continuación, se analizó el patrón de fosforilación de proteínas Smad en FS reumatoides, para identificar posibles diferencias con células sinoviales artrósicas y sanas, y poder estudiar la implicación de factores extracelulares como TGF- $\beta$  en la fosforilación de dichas proteínas. Mediante análisis de los niveles de fosforilación de proteínas Smad por WB, se observó que en los FS de pacientes con AR, OA e individuos sanos cultivados en ausencia de suero, no se inducía fosforilación de Smad-2 (Figura 11). Esta inducción apareció tras la estimulación con TGF- $\beta$  siendo significativamente superior en pacientes con AR (ratio p-Smad-2/ $\beta$ -actina  $4,22 \pm 1,10$ ) respecto a pacientes con OA ( $1,38 \pm 0,34$ ;  $p=0,04$ ) o controles sanos ( $1,82 \pm 0,49$ ;  $p=0,04$ ) (Figura 11).

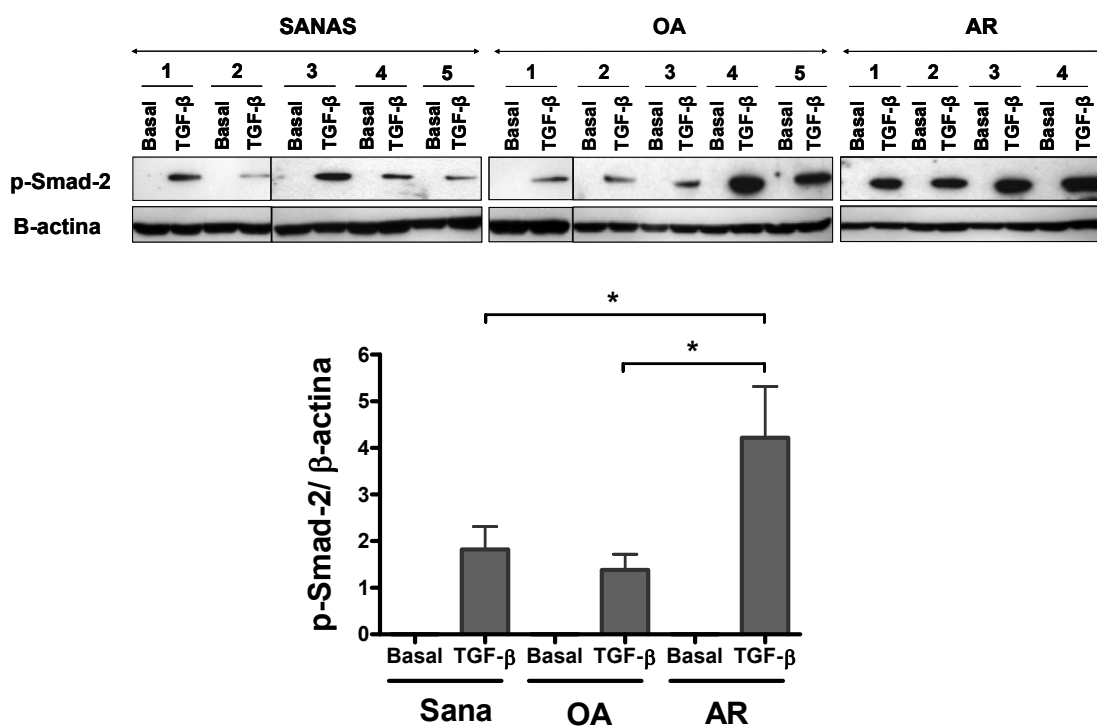


Figura 11. Fosforilación de Smad-2 inducida por TGF- $\beta$  en FS de pacientes con AR, OA e individuos sanos. FS cultivados en ausencia de suero durante 24h, fueron estimulados con TGF- $\beta$  (5ng/ml) durante 1h. El análisis de proteínas Smad se realizó en FS procedentes de pacientes con AR (n=7), OA (n=8) e individuos sanos (n=10) mediante WB, cuantificando la expresión por densitometría respecto a la  $\beta$ -actina. Los datos que se muestran son representativos de cada uno de los grupos. Se consideró como significativo \*  $p < 0.05$ .

### 3. P17 bloquea la vía de TGF- $\beta$ en tejido linfoide de ratón

En primer lugar, se evaluó *in vitro* la actividad bloqueante de p17 sobre TGF- $\beta$  en células linfoides procedentes de bazo de ratón. Para ello, se estudió la vía de señalización clásica de la fosforilación de proteínas Smad inducida por TGF- $\beta$ , en presencia y ausencia de p17. El análisis realizado mediante WB mostró la inducción de la fosforilación de Smad-2 tras la estimulación con TGF- $\beta$  (figura 12). El tratamiento con p17 disminuyó específicamente dicha fosforilación en un 70% (figura 12) acorde con lo observado previamente en fibroblastos embrionarios de pulmón humano (IMR-90) (Dotor y col., 2007), sin afectar la fosforilación basal independiente de TGF- $\beta$ .

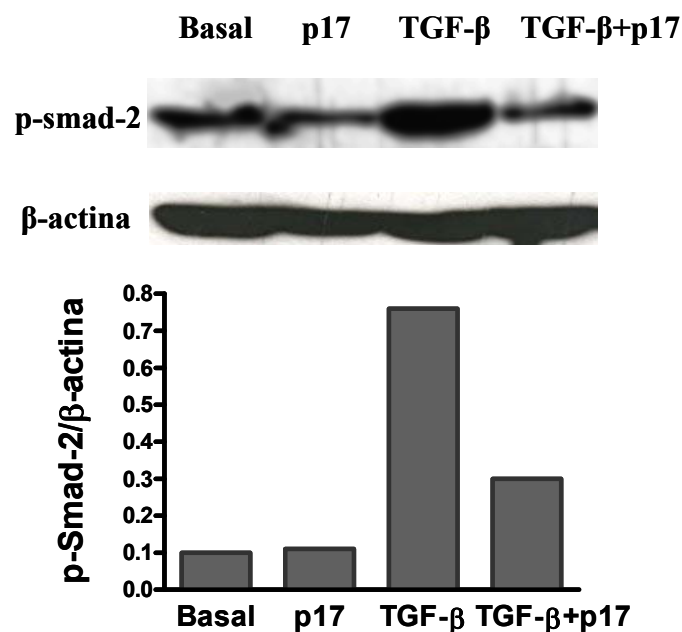


Figura 12. Bloqueo de la fosforilación de Smad-2 inducida por TGF- $\beta$  en células linfoides de bazo de ratón cultivadas durante 4 horas en presencia de 5ng/ml de TGF- $\beta$  y 50 $\mu$ M de p17. La fosforilación de Smad-2 se detectó mediante WB utilizando Ac específicos utilizando como referencia un Ac específico para la  $\beta$ -actina. La gráfica muestra el análisis densitométrico de las bandas.

Una vez comprobada la eficacia del péptido *in vitro* sobre las células linfoides de ratón, se estudió el efecto de bloquear selectivamente TGF- $\beta$  *in vivo* en el modelo murino de CIA.

#### **4. Bloqueo de TGF- $\beta$ en ratones inmunizados con CII**

Con el objetivo de estudiar el efecto de bloquear TGF- $\beta$  en ratones inmunizados con CII, ratones DBA/10IaHsd fueron tratados con PBS (control) o p17 durante 2 semanas desde la fecha de inmunización y sacrificados al finalizar el tratamiento. Se realizaron 2 experimentos en las mismas condiciones. Los datos mostrados corresponden a la suma de ambos experimentos con un total de 12 ratones por grupo.

##### **4.1. Poblaciones celulares en ratones inmunizados tras el bloqueo de TGF- $\beta$**

La frecuencia de las diferentes poblaciones de LT CD4 (Th2, Th17, Th1 y Treg) se analizó en suspensiones celulares de ganglios linfáticos inguinales obtenidas de ratones tratados con PBS o p17.

El porcentaje de células T CD4<sup>+</sup> fue comparable en ambos grupos. Asimismo, la frecuencia de linfocitos T CD4 productores de citoquinas (IL-4, IL-17, IFN- $\gamma$ ) no se modificó tras el tratamiento con p17 (figura 13a). El bloqueo de TGF- $\beta$  durante las 2 semanas de tratamiento en ratones inmunizados no modificó el porcentaje de células Treg CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (figura 13b).

De forma paralela, se estudió la producción de citoquinas (IL-17 e IFN- $\gamma$ ) en las subpoblaciones de células T CD8<sup>+</sup> y  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> tras el bloqueo de TGF- $\beta$ . Las células  $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup>, principales productoras de IL-17, disminuyeron ligeramente tras el tratamiento con p17, aunque dicha diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 14b). Tampoco se observaron diferencias significativas en el porcentaje total de células CD8<sup>+</sup> ni en su producción de citoquinas (figura 14a).

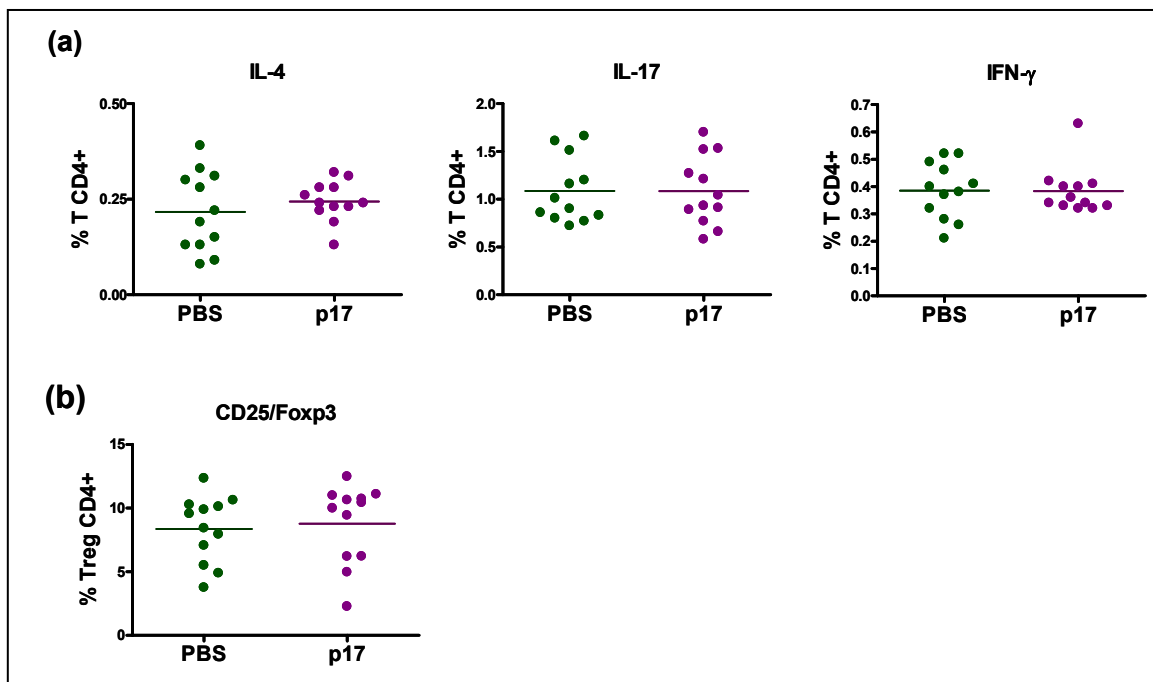


Figura 13. Suspensiones celulares de ganglios linfáticos inguinales fueron teñidas con anti-CD4-PerCP y analizadas por la producción de IL-4, IL-17 e IFN- $\gamma$  mediante citometría de flujo (a). (b) Porcentaje de células Treg CD4+ en ganglio inguinal de ratones inmunizados. N=12 individuos por grupo. Se muestran los datos de 2 experimentos realizados.

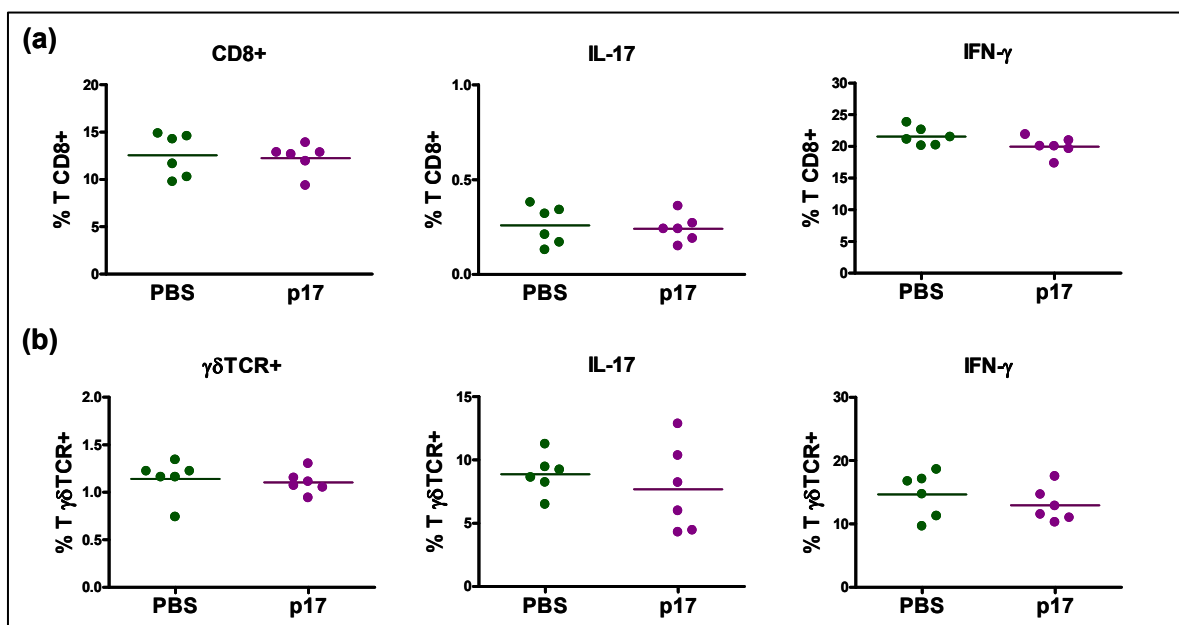


Figura 14. Suspensiones celulares de ganglios linfáticos inguinales fueron teñidas con anti-CD8-PeCy5 (a) o anti- $\gamma\delta$ TCR-PeCy5 (b) y analizadas por la presencia de células productoras de IL-17 e IFN- $\gamma$  mediante citometría de flujo. Se muestran resultados de n=6 por grupo.

#### **4.2. Respuesta de las células T a la estimulación con CII en ratones inmunizados tras el bloqueo de TGF- $\beta$**

Se analizó si el bloqueo de TGF- $\beta$  en ratones inmunizados era capaz de modular la respuesta de las células T cuantificando la producción de citoquinas en respuesta al CII. Para ello, células de ganglio linfático inguinal de ratones inmunizados con CII y tratados con PBS o p17 se cultivaron en presencia de a-CD3 y CII y se cuantificó por ELISA la producción de IL-17 e IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo. Los resultados mostraron diferencias significativas en la producción de IL-17 en el grupo control, siendo mayor en respuesta a a-CD3 ( $73,14 \pm 26,18$  pg/ml;  $p=0,009$ ) y a CII ( $62,92 \pm 24,69$  pg/ml;  $p=0,004$ ) respecto a los niveles basales ( $1,91 \pm 1,59$  pg/ml) (figura 15a).

Sin embargo, aunque la tendencia fue similar, no se observaron diferencias significativas en el grupo tratado con p17 en las mismas condiciones debido a la gran variabilidad en la respuesta.

De la misma manera, aunque la producción de IL-17 fue ligeramente menor en el grupo tratado con p17 tras la estimulación con CII (figura 15c) dicha diferencia no alcanzó la significación estadística. Asimismo, tampoco se observaron diferencias en el grupo tratado con p17 en la producción de IFN- $\gamma$ , a diferencia de lo observado en el grupo control, donde la estimulación con CII indujo un aumento significativo en los niveles de IFN- $\gamma$  comparado con el nivel basal (Basal  $39,38 \pm 10,71$  pg/ml; CII  $309 \pm 102,2$  pg/ml;  $p=0,03$ ) (figura 15b). Al igual que ocurrió en la producción de IL-17 entre ambos grupos, la producción de IFN- $\gamma$  en presencia del CII no se redujo significativamente tras el tratamiento con p17 (figura 15d).

Por otro lado, se observó que independientemente del tratamiento recibido existía una respuesta celular proliferativa a la estimulación tanto con a-CD3 como con CII (figura 16a), siendo en todos los casos dicha diferencia estadísticamente significativa (PBS: a-CD3  $0,35 \pm 0,05$  pg/ml;  $p=0,002$  y CII  $0,26 \pm 0,05$  pg/ml;  $p=0,03$  frente a basal  $0,12 \pm 0,02$  pg/ml y p17: a-CD3  $0,25 \pm 0,04$  pg/ml;  $p=0,002$  y CII  $0,20 \pm 0,04$  pg/ml;  $p=0,03$  frente a basal  $0,07 \pm 0,02$  pg/ml). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento en la proliferación celular tras la estimulación con CII (figura 16b). Es decir, el tratamiento con un agente bloqueante de TGF- $\beta$ , como es p17, no modificó la respuesta al CII durante la primera fase de desarrollo de la artritis (tras 2 semanas de la inmunización).

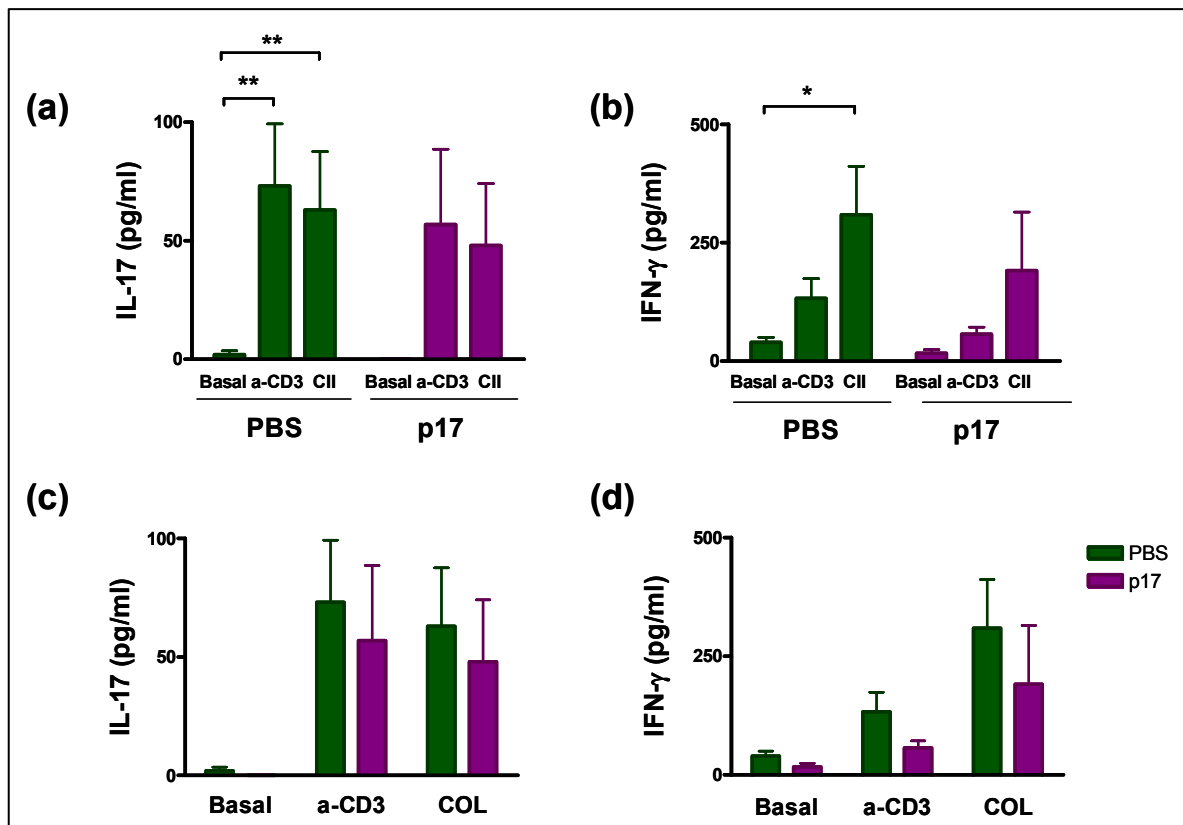


Figura 15. Respuesta de células T al CII en ratones DBA/10laHsd a las 2 semanas desde la inmunización. Células de ganglio linfático inguinal de ratones inmunizados con CII fueron cultivadas durante 48h en presencia de a-CD3 [100ng/ml] y CII [50μg/ml]. La producción de IL-17 (a y c) e IFN-γ (b y d) fue cuantificada por ELISA en el sobrenadante de los cultivos. N=12 individuos por grupo. Datos de 2 experimentos realizados. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

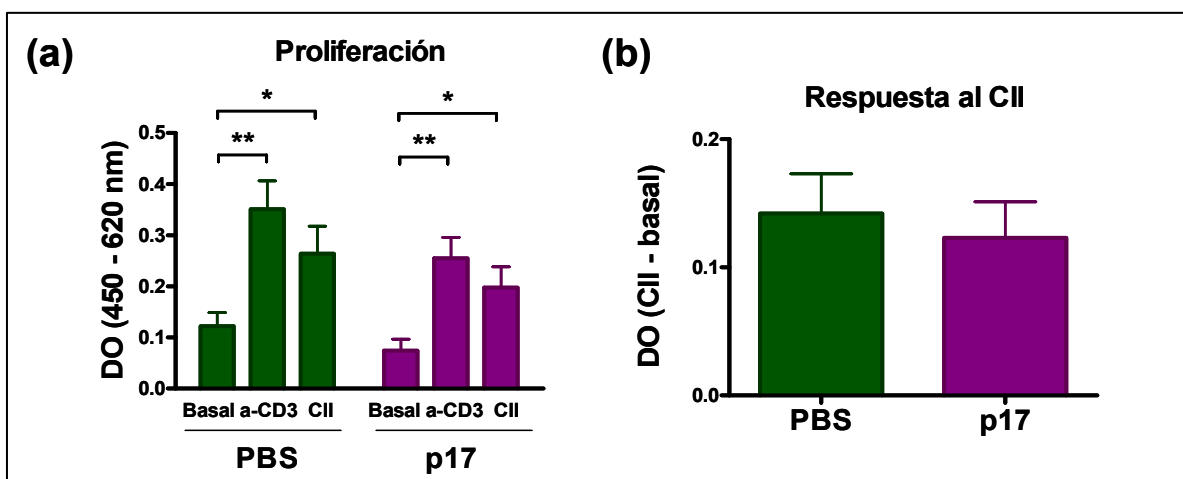


Figura 16. Respuesta proliferativa a la estimulación con CII en ratones DBA/10laHsd a las 2 semanas desde la inmunización (a y b). Células de ganglio linfático inguinal fueron cultivadas durante 72h en presencia de CII [50μg/ml] y a-CD3 [100ng/ml] como control de estimulación. La proliferación celular fue cuantificada con el reactivo WST-1. N=12 individuos por grupo. Datos de 2 experimentos realizados. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

#### 4.3. Cuantificación de los niveles séricos de IL-6 y Ac anti-CII en ratones inmunizados con CII

En primer lugar, se analizó la producción de IL-6 como marcador de inflamación activa (Hirano y col., 1988) en el suero de los ratones inmunizados con CII tratados y no tratados con p17. Los resultados no mostraron diferencias significativas (figura 17a) entre ambos grupos de tratamiento (PBS  $35,54 \pm 8,01$  pg/ml; p17  $25,23 \pm 6,72$  pg/ml), aunque los niveles fueron ligeramente inferiores tras el bloqueo de TGF- $\beta$ .

Los niveles de Ac circulantes anti-CII, IgG1 e IgG2a se cuantificaron por ELISA. Los datos no revelaron diferencias entre ambos grupos de tratamiento, sugiriendo que los niveles de IgG1 e IgG2a no se ven modificados tras el bloqueo de TGF- $\beta$  durante la primera fase de desarrollo de la enfermedad (figura 17b y c). Aunque tras 2 semanas de la inmunización, los niveles de IgG2a fueron muy superiores a los de IgG1 en ambos grupos de tratamiento, (PBS IgG2a 876,1 UR/ml; IgG1 182,5 UR/ml) y (p17 IgG2a 630,8 UR/ml; IgG1 253,3 UR/ml) el ratio entre IgG1/IgG2a, tampoco mostró diferencias significativas (figura 17d).

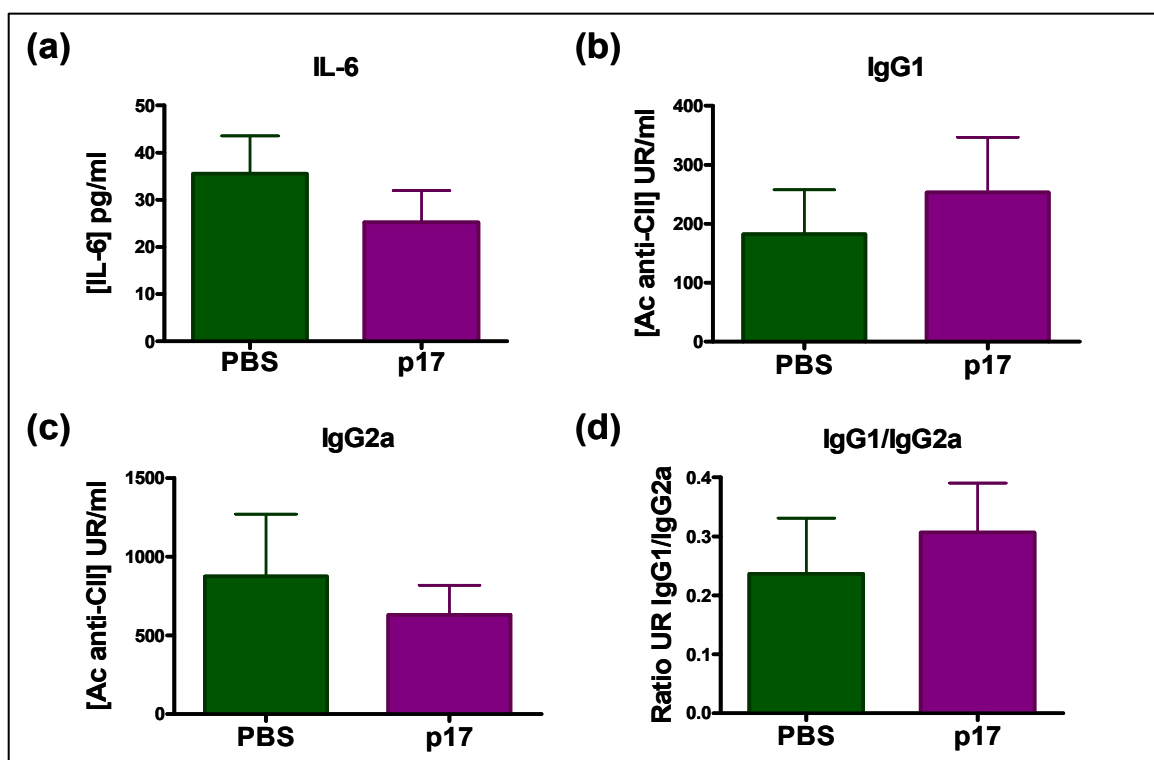


Figura 17. (a) Niveles de IL-6 circulante a las 2 semanas tras la inmunización con CII en ratones DBA/10IaHsd. (b-d) Comparación de isotipos IgG anti-CII en suero de ratones a las 2 semanas desde la inmunización con CII. Los datos se muestran en unidades relativas (UR) por ml. N=12 individuos por grupo. Datos de 2 experimentos realizados.

## **5. Bloqueo de TGF- $\beta$ durante la fase de inducción de la artritis en ratones con CIA**

Con el objeto de analizar el efecto de bloquear selectivamente TGF- $\beta$  sobre el desarrollo clínico y la gravedad de la artritis durante la fase de inducción de la enfermedad en el modelo animal de CIA, los ratones fueron tratados durante 21 días con p17 o PBS desde la fecha de la inmunización. Los ratones fueron sacrificados a las 6 semanas desde el inicio del tratamiento para evaluar histológica y funcionalmente el papel de TGF- $\beta$  durante esta fase de desarrollo de la artritis.

Se realizaron 3 experimentos independientes en las mismas condiciones y entre 7 y 10 ratones por grupo de tratamiento fueron incluidos en cada experimento. Los datos mostrados corresponden en todos los casos a un experimento representativo de los 3 realizados, salvo los datos correspondientes a la expresión génica en articulación donde se muestran datos de 2 experimentos agrupados. En este caso, se utilizaron la mitad de las muestras de cada experimento para histología y la otra mitad para el análisis por PCR cuantitativa a tiempo real.

### **5.1. Efecto antiinflamatorio de p17 sobre el desarrollo clínico y la gravedad de la artritis**

El análisis de CIA mostró que tanto el grupo de ratones control como los tratados con p17 desarrollaron artritis, con una incidencia del 100% al final del experimento (día 42 tras la inmunización). Sin embargo, el desarrollo de la enfermedad siguió una cinética distinta en ambos grupos: mientras que el grupo control alcanzó un 50% de incidencia el día 20 tras la inmunización, en el grupo tratado con p17 se retrasó hasta el día 25. Igualmente, mientras el grupo de PBS ya presentaba una incidencia del 100% a día 29, el grupo tratado con p17 no la alcanzó hasta el día 41 desde la fecha de la inmunización (figura 18a). Por lo tanto, el bloqueo de TGF- $\beta$  con p17 provocó un retraso en la aparición de la artritis.

Ratones inmunizados con CII en CFA fueron examinados diariamente durante 42 días, analizándose el score clínico y el número de extremidades afectadas (figura 18b y c). El tratamiento con p17 disminuyó la gravedad de la artritis aunque dicha diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0,12$ ). El número de extremidades afectadas

también fue menor en el grupo tratado con p17 sin alcanzar la significación estadística. Estos resultados fueron comparables en los 3 experimentos realizados.

Posteriormente, se calculó para cada individuo el valor del área bajo la curva del score clínico a lo largo del proceso inflamatorio. El área bajo la curva se calculó para cada uno de los individuos y a continuación, se calculó la media por grupos de tratamiento. Por último se compararon ambos grupos mediante un test paramétrico para muestras independientes. El área bajo la curva del score clínico para los grupos tratados con PBS o p17, fue de  $62,68 \pm 15,00$  y  $32,41 \pm 8,28$ , respectivamente. Sin embargo, los valores no alcanzaron la significación estadística ( $p=0,09$ ) (figura 18d).

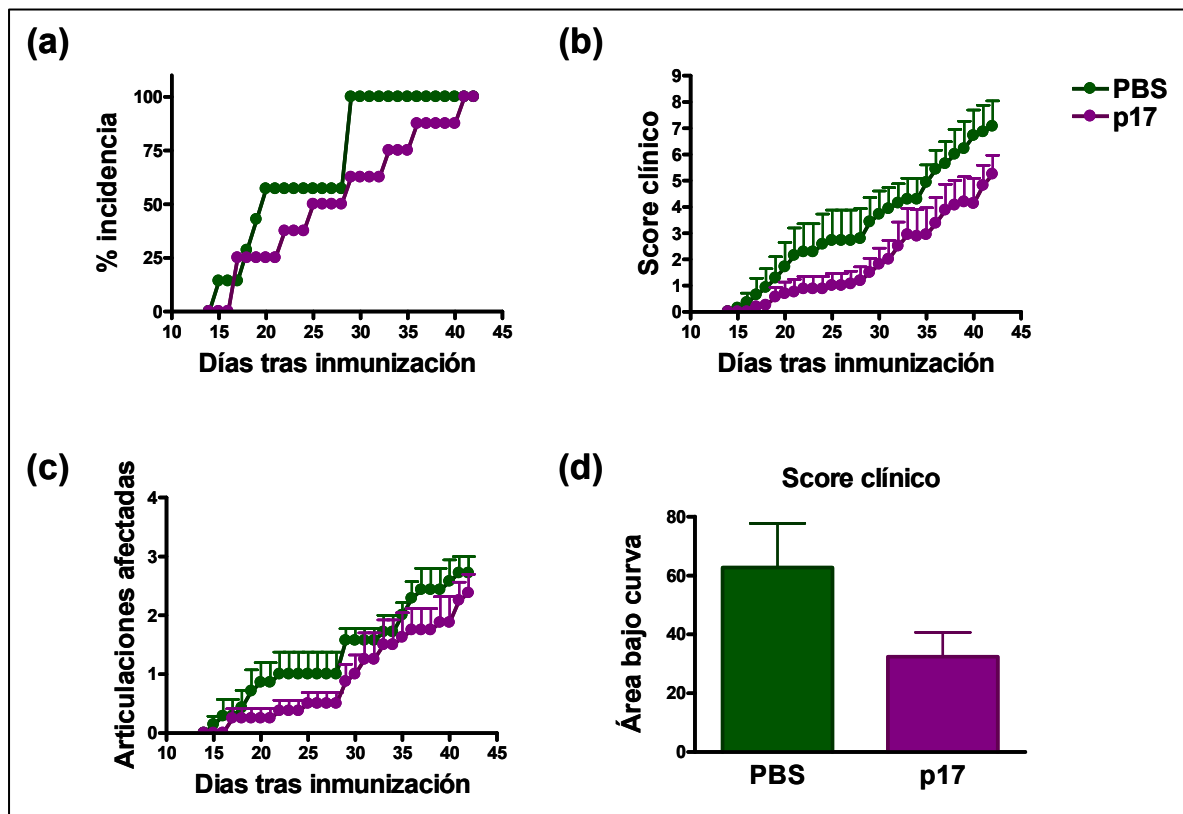


Figura 18. Progresión de la artritis en ratones tratados con p17. Incidencia (a) y gravedad (b y c) de la enfermedad tras 42 días. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM del score clínico por grupos de tratamiento a lo largo del periodo estudiado. (d) Área bajo la curva del score clínico tras el tratamiento con p17. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM del área bajo la curva por grupos de tratamiento. Los datos mostrados corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados.

## 5.2. Bloqueo de TGF- $\beta$ sobre el grado de inflamación y destrucción ósea y cartilaginosa en ratones con CIA.

A continuación, se analizaron histológicamente los cambios producidos en las articulaciones de los ratones en ambos grupos de tratamiento durante la fase de inducción. Las articulaciones se fijaron con formol y se incluyeron en parafina para analizar el grado de destrucción ósea (hematoxilina-eosina) y cartilaginosa (safranina). Las biopsias de los ratones fueron analizadas de manera independiente por dos observadores, y correlacionaron significativa y positivamente (coeficiente de correlación interobservador del test de Spearman 0,86;  $p < 0,0001$ ).

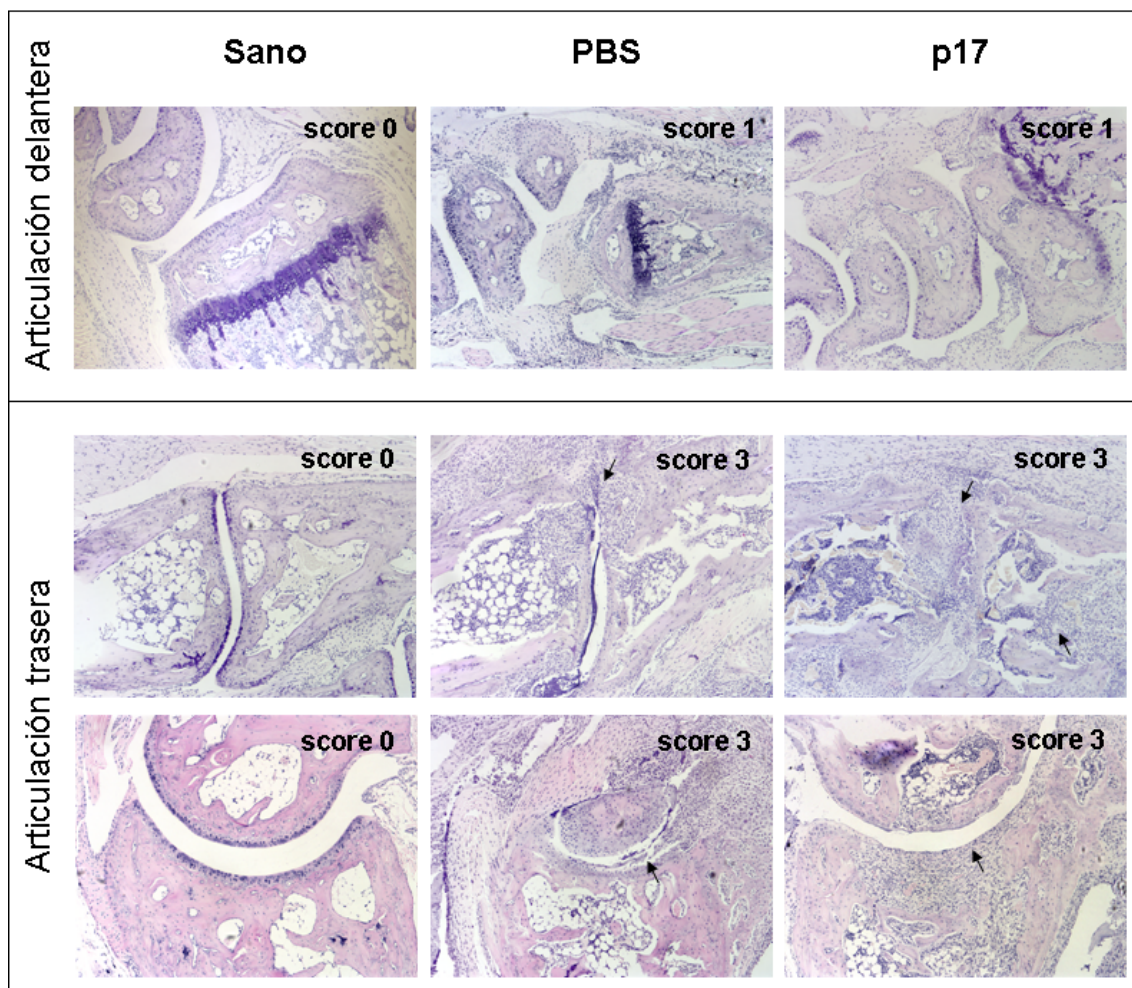


Figura 19. Tinción con hematoxilina-eosina representativa de extremidades delanteras y traseras de ratones DBA/101aHsd sanos (izquierda) o ratones con CIA tratados con PBS (central) o p17 (derecha) durante la fase de inducción de la artritis. Análisis realizado a las 6 semanas desde la fecha de inmunización. Los datos que se muestran corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados. (100X). Las flechas señalan el elevado infiltrado inflamatorio y la destrucción ósea articular.

En ambos grupos de tratamiento, se observó una destrucción severa de las articulaciones con erosiones óseas y acumulación masiva de células inflamatorias durante la fase de inducción de la artritis (figuras 19 y 21a). Asimismo, la pérdida de cartílago articular, evaluada de 0 a 4 hasta un máximo de 16 por ratón en función de la pérdida de cartílago articular (ver materiales y métodos apartado 2.5.2), fue similar y muy severa en ambos grupos de tratamiento, sin observarse diferencias significativas (figuras 20 y 21b).

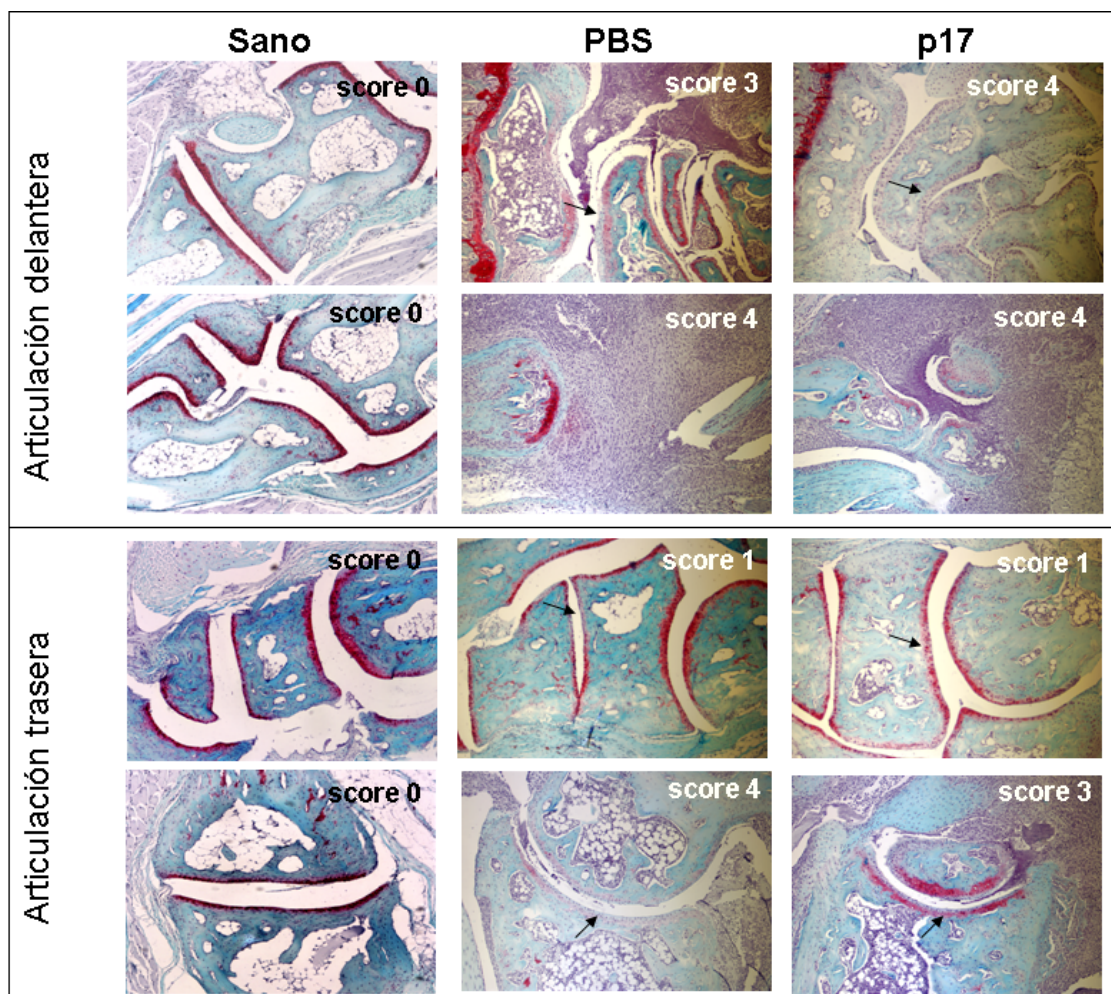


Figura 20. Tinción con safranina O representativa de extremidades delanteras y traseras de ratones DBA/10IaHsd sanos (izquierda) o ratones con CIA tratados con PBS (central) o p17 (derecha) durante la fase de inducción de la artritis a las 6 semanas desde la fecha de inmunización. Datos de 1 experimento representativo de 3 realizados. (100X). Las flechas señalan zonas de pérdida/ausencia de cartílago articular en ambos grupos de tratamiento.

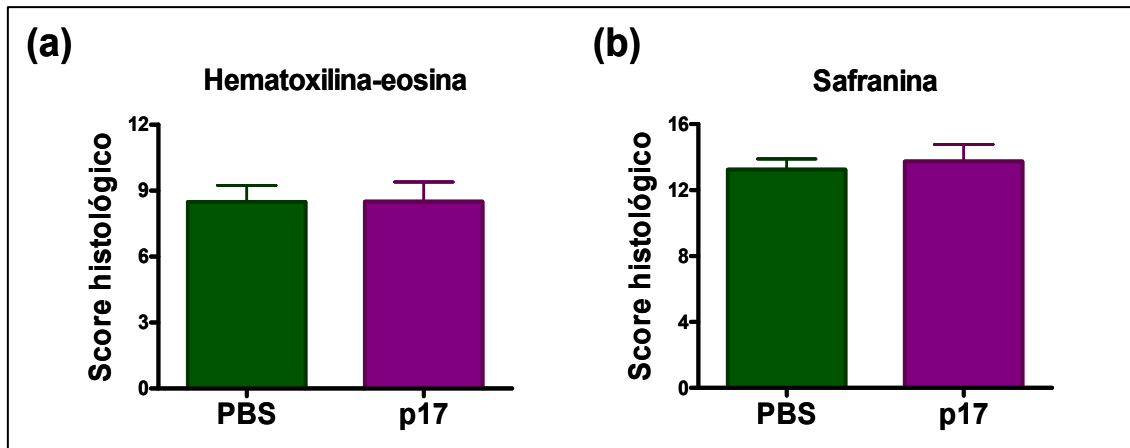


Figura 21. (a) Inflamación y destrucción ósea en ratones con CIA tratados con PBS o p17 durante la fase de inducción de la enfermedad. Los datos representan la media de score histológico (0-12) por grupos de tratamiento. (b) Pérdida de cartilago articular en los mismos individuos, calculada como la media de los scores clínicos (0-16).

### 5.3. Diferenciación y funcionalidad en las poblaciones de linfocitos T tratados con p17

Se estudiaron los cambios inducidos en las células T en ratones con CIA tratados y no tratados con p17. En primer lugar, se analizó la expresión de las diferentes subpoblaciones de células T en células de ganglio inguinal. El análisis por citometría de flujo no mostró diferencias significativas en el porcentaje de células T CD4+ productoras de citoquinas (IL-4, IL-17 e IFN- $\gamma$ ) tras el bloqueo de TGF- $\beta$  (figura 22a). En el grupo tratado con p17, el porcentaje de células CD4+IL-17+ fue ligeramente inferior (PBS  $0,77 \pm 0,08$ ; p17  $0,57 \pm 0,06$ ) aunque sin alcanzar la significación estadística ( $p=0,12$ ).

Asimismo, el tratamiento con p17 tampoco redujo de forma significativa los niveles de células Treg (CD4+CD25+Foxp3+), aunque los niveles fueron ligeramente inferiores ( $5,73 \pm 0,34$  en PBS y  $4,78 \pm 0,35$  en p17;  $p=0,18$ ) (figura 22b). Del mismo modo, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de IL-17 e IFN- $\gamma$  en las células T CD8+ ni en la subpoblación de células T $\gamma\delta$ TCR+ (figura 22c y d).

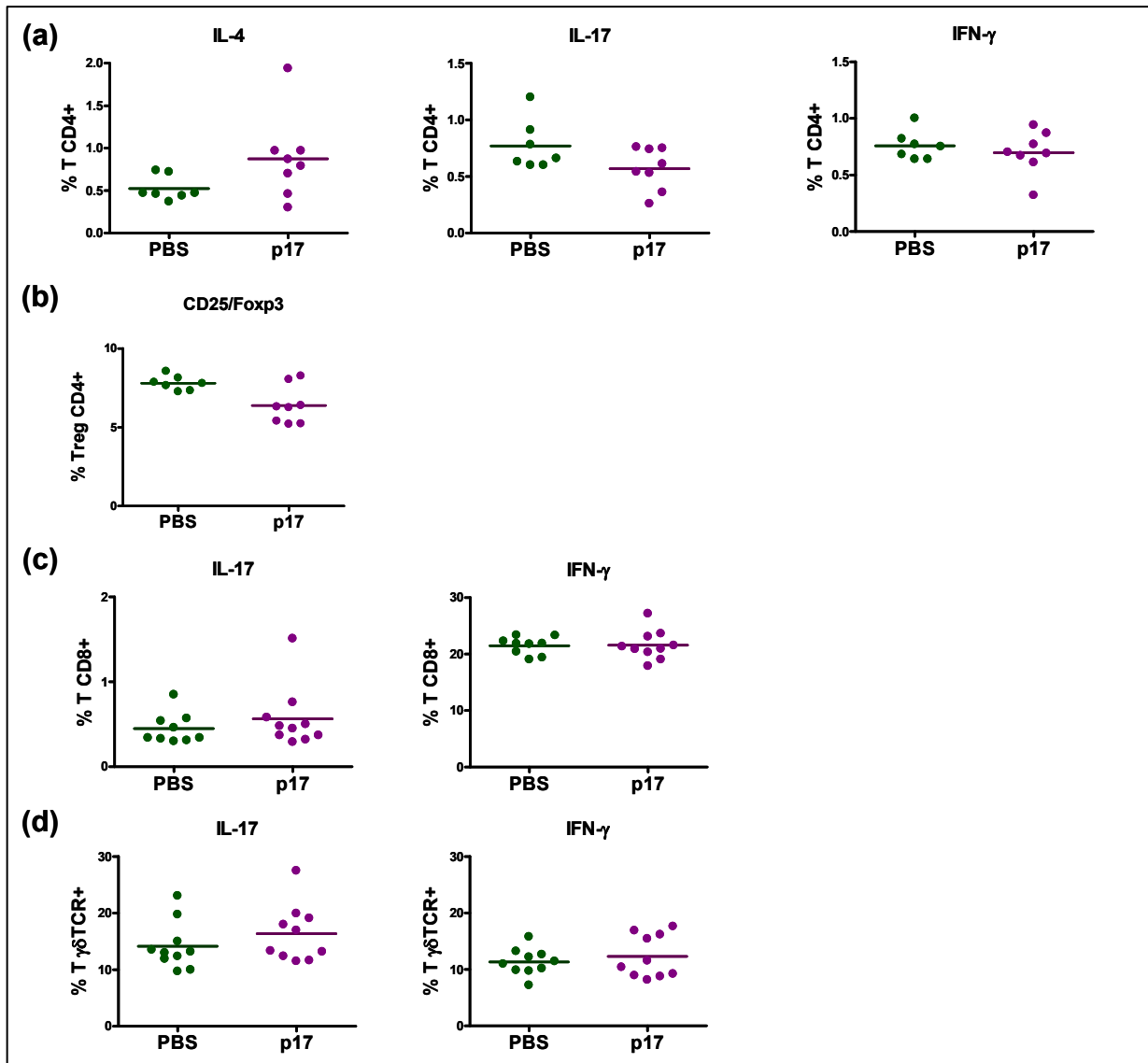


Figura 22. Suspensiones celulares de ganglio inguinal de ratones tratados durante la fase de inducción analizadas por citometría de flujo. (a) Células CD4+ productoras de las citoquinas IL-4, IL-17 e IFN- $\gamma$ . (b) Porcentaje de células Treg CD4+ en ganglio inguinal de ratones con CIA. (c, d) Células T CD8+ y T $\gamma$  $\delta$ TCR productoras de IL-17 e IFN- $\gamma$  de ganglio inguinal de ratones con CIA. Se muestran los datos correspondientes a 1 experimento representativo de 3 realizados.

A continuación, se comparó la respuesta de las células T en células de ganglio linfático inguinal en cultivo a las 72 tras la estimulación con CII [50 $\mu$ g/ml], utilizando como control de la proliferación celular el tratamiento con  $\alpha$ -CD3 [100ng/ml] en las mismas condiciones.

Los resultados mostraron un aumento significativo en ambos grupos tras la estimulación con a-CD3 comparado con los niveles basales (PBS basal  $0,05 \pm 0,02$ ; a-CD3  $0,37 \pm 0,06$ ;  $p=0,002$  y p17 basal  $0,06 \pm 0,02$ ; a-CD3  $0,33 \pm 0,07$ ;  $p=0,004$ ) (figura 23a). Por el contrario, la estimulación con CII no indujo una respuesta proliferativa de forma significativa con respecto a la situación basal en ninguno de los dos grupos de tratamiento (figura 23a). No hubo tampoco diferencias significativas en la respuesta a CII entre ambos grupos (figura 23b) de tratamiento.

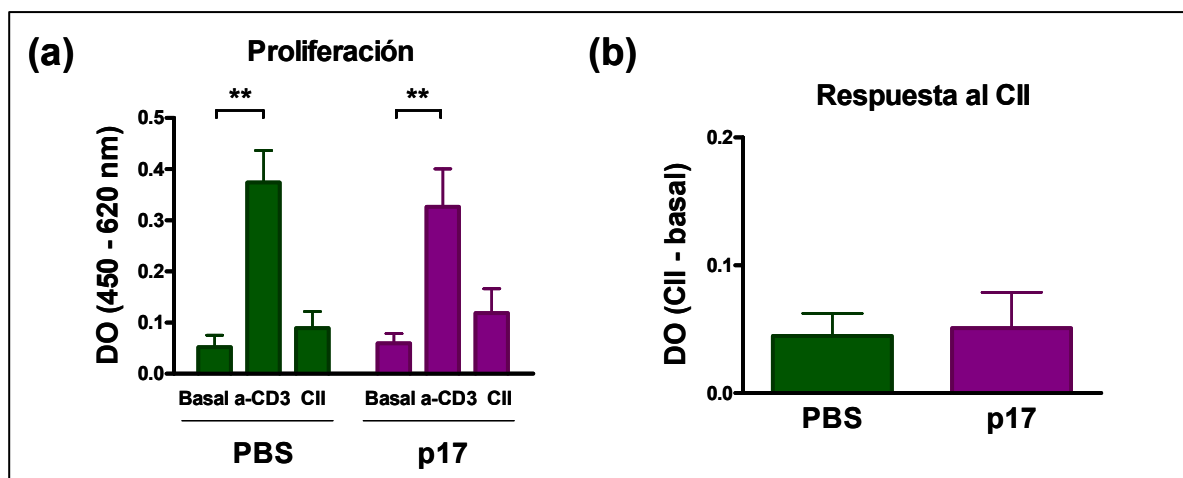


Figura 23. (a y b) Respuesta proliferativa a la estimulación con CII en ratones DBA/101aHsd con CIA a las 6 semanas desde la inmunización. Los datos mostrados corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados.  $**p<0,01$ .

La producción de citoquinas (IL-17 e IFN- $\gamma$ ) en ratones con CIA tratados y no tratados con p17 (figura 24), se cuantificó por ELISA en células de ganglio inguinal tras la estimulación durante 48 horas con a-CD3 [100ng/ml] y CII [50 $\mu$ g/ml]. Los niveles de IL-17 en el grupo control, aumentaron significativamente tras la estimulación con a-CD3 comparado con el nivel basal ( $69,62 \pm 20,04$  pg/ml *versus*  $0,87 \pm 0,36$  pg/ml, respectivamente,  $p=0,0006$ ) (figura 24a). En el grupo tratado con p17 se observó la misma tendencia, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. Tampoco se observaron diferencias significativas en la producción de IL-17 tras la estimulación con CII entre ambos grupos de tratamiento, aunque se redujo tras el bloqueo de TGF- $\beta$  (PBS  $39,53 \pm 13,79$  pg/ml y p17  $12,16 \pm 6,66$  pg/ml;  $p=0,09$ ) (figura

24c). El análisis de producción de IFN- $\gamma$ , mostró diferencias significativas en ambos grupos tras la estimulación con a-CD3 (PBS basal  $35,94 \pm 14,54$  pg/ml; a-CD3  $378,8 \pm 147,2$  pg/ml;  $p=0,001$  y p17 basal  $30,46 \pm 18,67$  pg/ml; a-CD3  $253,7 \pm 84,43$  pg/ml;  $p=0,01$ ), pero no con CII (figura 24b). Tampoco se observaron diferencias significativas en la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación con CII entre ambos grupos de tratamiento (figura 24d).

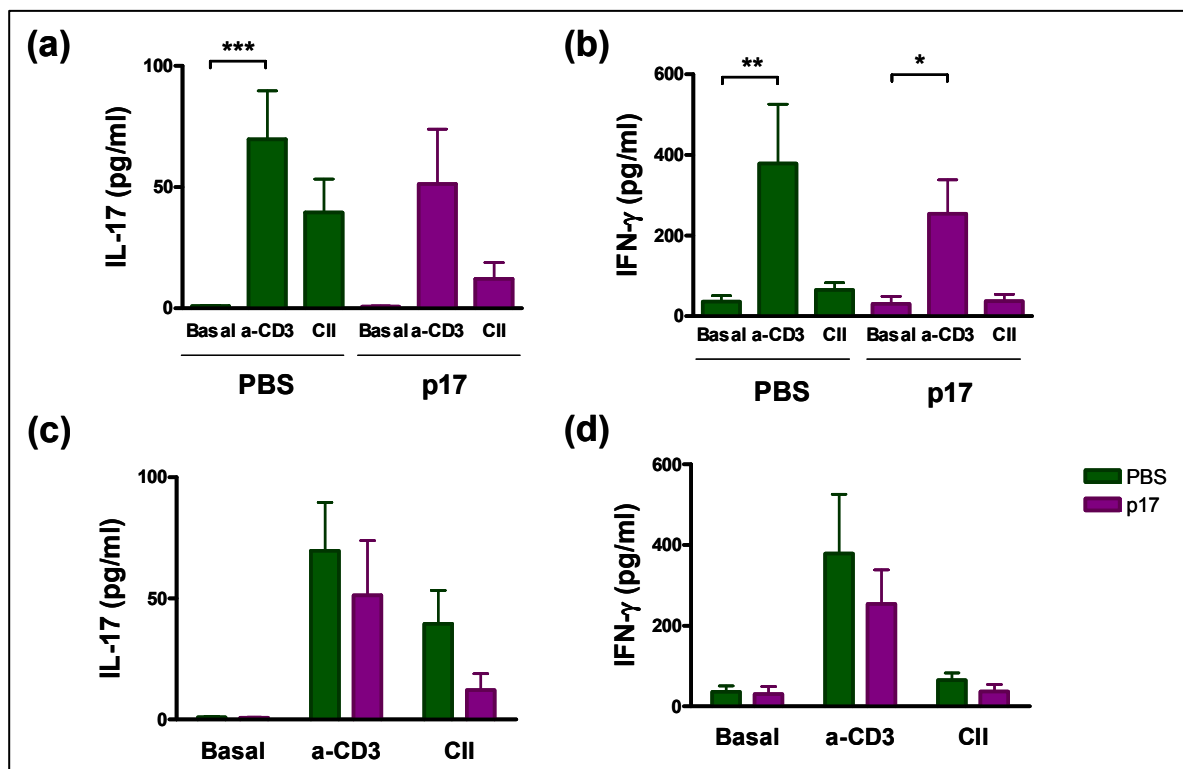


Figura 24. Respuesta de células T a la estimulación con CII en ratones DBA/10laHsd con CIA a las 6 semanas desde la inmunización. Producción de citoquinas (IL-17 [a y c] e IFN- $\gamma$  [b y d]). \* $p<0,05$ ; \*\*\* $p<0,001$ . Los datos mostrados corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados.

#### 5.4. Niveles séricos de IL-6 y Ac anti-CII tras el bloqueo de TGF- $\beta$ durante la fase de inducción de la artritis en ratones con CIA

Puesto que IL-6 es un mediador esencial de la inflamación crónica y de la destrucción tisular en los modelos murinos de artritis (Alonzi y col., 1998; Kobayashi y col., 2002) se estudió si el bloqueo de TGF- $\beta$  previo al desarrollo de la enfermedad en nuestro modelo de CIA, inducía alteraciones en la cantidad de IL-6 circulante.

La sangre a las 2 semanas fue obtenida de la cola, mientras que la analizada a las 6 semanas se recogió en el momento del sacrificio. Los niveles de IL-6 en el suero de los ratones a las 2 y 6 semanas desde la inmunización no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos (figura 25a). Los niveles de IL-6 a las 2 semanas fueron menores a los observados una vez desarrollada la artritis en ambos grupos, siendo significativamente elevados en ratones tratados con p17 (IL-6 2 semanas  $25,23 \pm 6,71$  pg/ml y 6 semanas  $69,82 \pm 16,76$  pg/ml;  $p=0,04$ ).

De igual modo, se investigó si los niveles de Ac anti-CII en el suero de los ratones inmunizados se modificaba tras el tratamiento y el desarrollo de la artritis. Para ello, comparamos el título de Ac en las fases previas al desarrollo de los signos de inflamación (2 semanas tras la inmunización) y una vez establecida la enfermedad (6 semanas) en los mismos ratones. El suero de los ratones recogido a las 2 y a las 6 semanas (figura 25b y c) no reveló diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento en la cantidad de Ac anti-CII IgG1 e IgG2a. Estos resultados confirmaron los datos obtenidos a las 2 semanas tras la inmunización, donde se observó una expresión de IgG2a muy superior a la de IgG1 (ver figura 17c). Igualmente, en estos ratones el ratio IgG1/IgG2a no se vio modificado tras el tratamiento con p17 a las 2 y 6 semanas tras la inmunización.

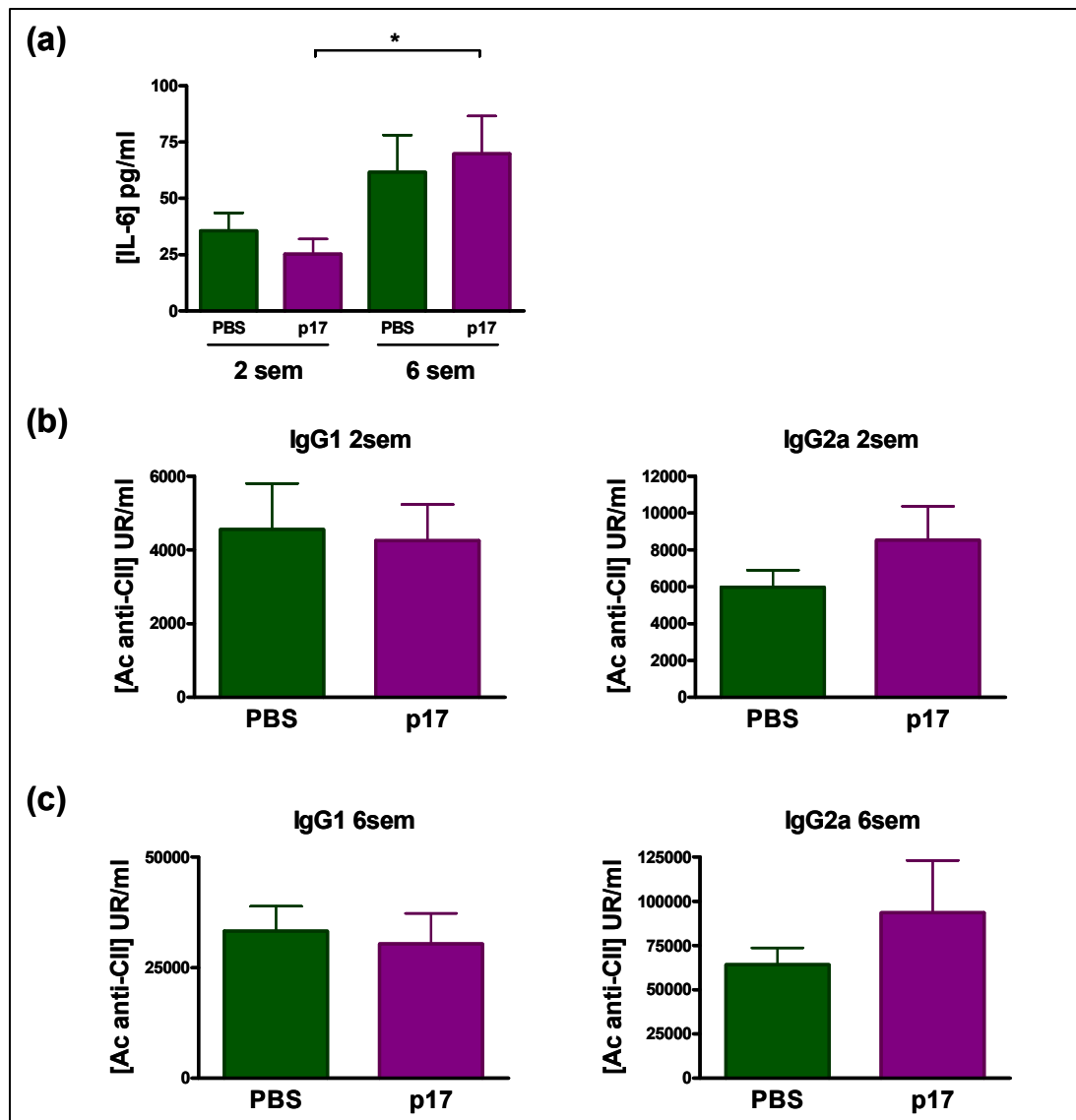


Figura 25. Niveles de IL-6 sérica cuantificados mediante ELISA. (a) IL-6 (pg/ml) circulante a las 2 y 6 semanas tras la inmunización en ratones con CIA. (b-c) Comparación de isotipos IgG anti-CII en suero a las 2 (b) y 6 semanas (c) desde la inmunización en ratones con CIA tratados durante la fase de inducción. Los datos corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados y se muestran en unidades relativas (UR) por ml. \* $p < 0,05$ .

### 5.5. Expresión de citoquinas proinflamatorias y factores de transcripción en bazo y extremidades de ratones con CIA

Para evaluar la capacidad inhibitoria de p17 durante la fase de inducción de la artritis, estudiamos la expresión de ARNm en bazo y articulación de IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$  y Foxp3, así como la expresión de IL-23 y Ror $\gamma$ t en articulación. El análisis del ARNm por PCR cuantitativa en el bazo de los ratones tratados y no tratados con p17, no mostró diferencias significativas en la expresión de ninguno de los genes (figura 26).

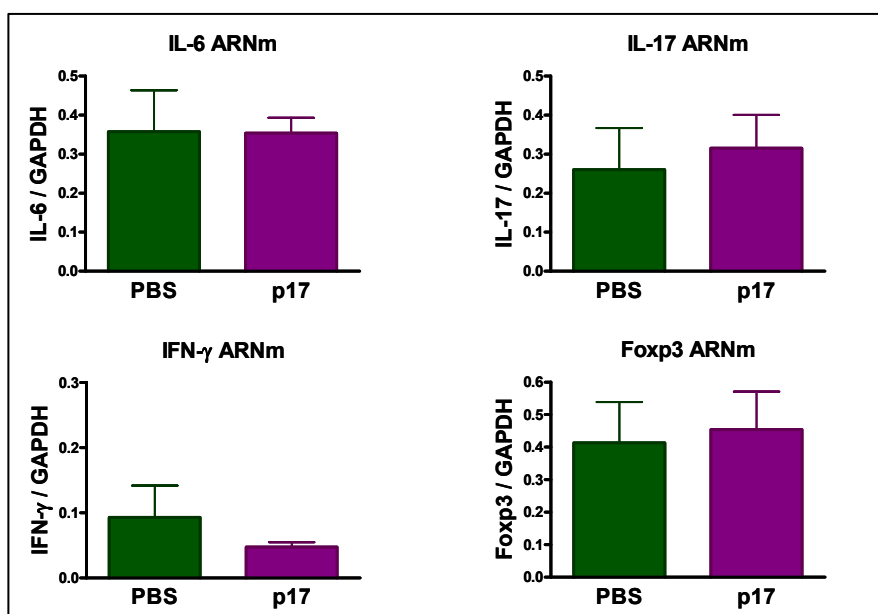


Figura 26. Expresión de citoquinas y células Foxp3 en bazo de ratones con CIA durante la fase de inducción de la artritis tras el bloqueo de TGF- $\beta$ . Análisis realizado por PCR cuantitativa. Los datos se muestran como el ratio entre los distintos genes respecto a la GAPDH. Los datos mostrados corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados.

Posteriormente, examinamos los cambios en la expresión de dichos genes en las extremidades inflamadas de los ratones tratados durante el proceso de inducción de la artritis. El bloqueo de TGF- $\beta$  sobre la fase de inducción de la artritis no reveló cambios en la expresión de IL-6 (figura 27a). Lo mismo ocurrió con los niveles de expresión de IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-23, donde se observó una menor expresión de ARNm en los ratones tratados con p17 (figura 27b, d y e respectivamente), aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. Los niveles de expresión de Foxp3 en

articulación tampoco revelaron cambios significativos entre ambos grupos de tratamiento, aunque fueron superiores tras el bloqueo de TGF- $\beta$  (figura 27c). Por último, la expresión de Ror $\gamma$ t fue comparable en ambos grupos (figura 27f).

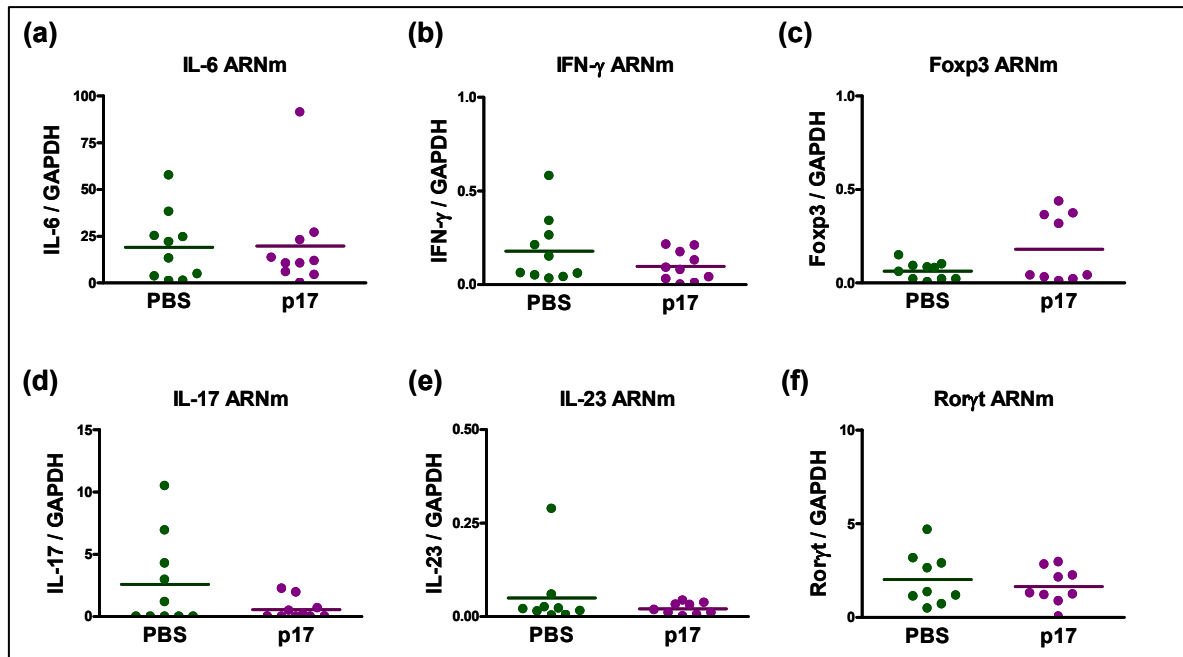


Figura 27. Expresión de citoquinas (a, b, d y e) y factores de transcripción (c y f) en articulación durante la fase de inducción de la artritis tras el bloqueo de TGF- $\beta$ . Análisis realizado por PCR cuantitativa. Los datos se muestran como el ratio entre los distintos genes respecto a la GAPDH. Las gráficas mostradas corresponden a datos de 2 experimentos agrupados.

## **6. Bloqueo de TGF- $\beta$ en el modelo de CIA en ratones con la enfermedad establecida**

En la fase de enfermedad establecida, los ratones fueron tratados diariamente con p17 o PBS desde la fecha de inicio de la inflamación y sacrificados a los 10 días de la misma para confirmar histológica y funcionalmente la evolución de la enfermedad tras el tratamiento con p17. Se realizaron 3 experimentos diferentes en las mismas condiciones y se incluyeron entre 9 y 12 ratones por grupo.

### **6.1. Efecto de p17 sobre el desarrollo clínico y la gravedad de la artritis**

Para evaluar el efecto de p17 sobre el progreso clínico de la artritis y su gravedad durante la fase de enfermedad ya establecida, se analizó el incremento de los scores respecto al día de inicio de tratamiento.

El tratamiento con p17 en ratones artríticos redujo, aunque no de forma significativa, la gravedad del proceso inflamatorio ( $p=0,27$ ) y el número de articulaciones afectadas (figura 28a y c).

Mediante un test paramétrico para muestras independientes, se analizó el valor del área bajo la curva por grupos de tratamiento. El área bajo la curva del incremento de los scores no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,22$ ), aunque fue menor en el grupo tratado con p17 (PBS  $29,04 \pm 5,28$ ; p17  $20,72 \pm 4,18$ ) (figura 28b).

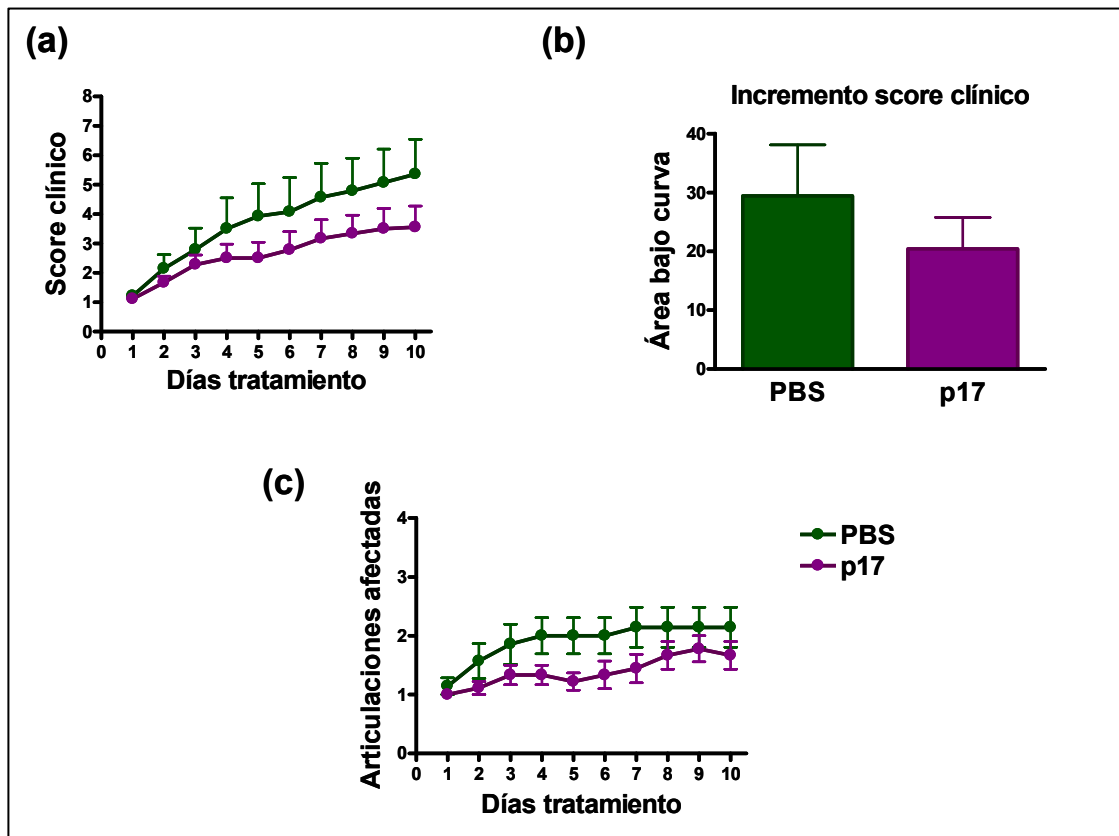


Figura 28. Evolución de ratones artríticos tratados con p17. Ratones inmunizados con CII en CFA fueron tratados durante 10 días desde el inicio de la enfermedad. (a) El score clínico fue menor en los ratones tratados con p17 a lo largo del periodo estudiado. (b) Área bajo la curva del incremento del score clínico tras el bloqueo de TGF- $\beta$ . (c) Ratones con CIA tratados con p17 presentaron menor número de articulaciones afectadas a lo largo del proceso inflamatorio. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SEM del score clínico por grupos de tratamiento a lo largo del periodo estudiado. Los datos mostrados corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados.

## 6.2. Inflamación y destrucción ósea en ratones artríticos tras el tratamiento con p17

El daño histológico en ratones con CIA tratados con p17 y PBS se analizó en las articulaciones fijadas, seccionadas y teñidas con hematoxilina-eosina a los 10 días de evolución de enfermedad. Los datos histológicos de inflamación y destrucción articular en extremidades delanteras y traseras de ratones con CIA no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos de tratamiento.

Tanto el grupo control como el grupo tratado con p17 presentaron un elevado número de células inflamatorias con destrucción masiva de las articulaciones (figura 29), alcanzándose en ambos grupos el score máximo en algunas muestras.

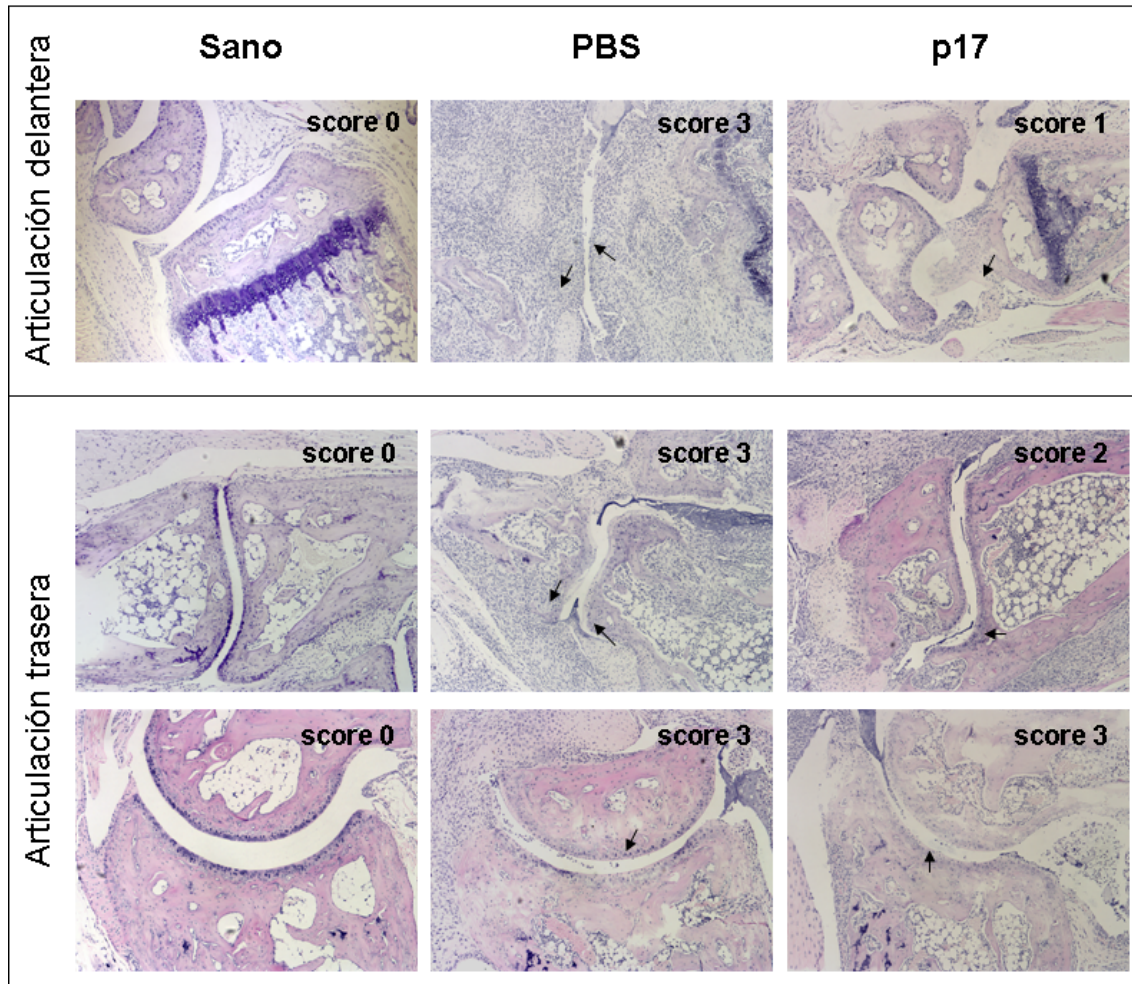


Figura 29. Tinción con hematoxilina-eosina representativa de extremidades delanteras y traseras de ratones DBA/10laHsd sanos (izquierda) o ratones con CIA tratados con PBS (centro) o p17 (derecha). Análisis realizado a los 10 días desde el inicio del tratamiento. Las flechas destacan la destrucción severa de las articulaciones con erosiones óseas y acumulación masiva de células inflamatorias observada en ambos grupos. (100X). Las flechas señalan zonas con elevado infiltrado inflamatorio y destrucción ósea articular.

Con el objetivo de evaluar la pérdida de cartílago, las articulaciones se tiñeron con Safranina O y se analizaron para determinar el grado de destrucción de cartílago articular. El análisis se realizó de manera independiente por dos observadores, y correlacionó significativa y positivamente (coeficiente de correlación del test de

Spearman 0,95;  $p < 0,0001$ ). Los datos obtenidos, no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos, observándose pérdida total en la mayoría de las articulaciones de dichos ratones, independientemente del tratamiento recibido (figura 30).

Tras analizar histológicamente todas las articulaciones de los ratones, se estableció una media por grupos de tratamiento tanto del grado de destrucción ósea como cartilaginosa. Los resultados obtenidos fueron comparables entre ambos grupos (figuras 31a y b), por lo que pudimos afirmar que el bloqueo de TGF- $\beta$  en ratones artríticos no fue suficiente para controlar de forma efectiva los signos de inflamación.

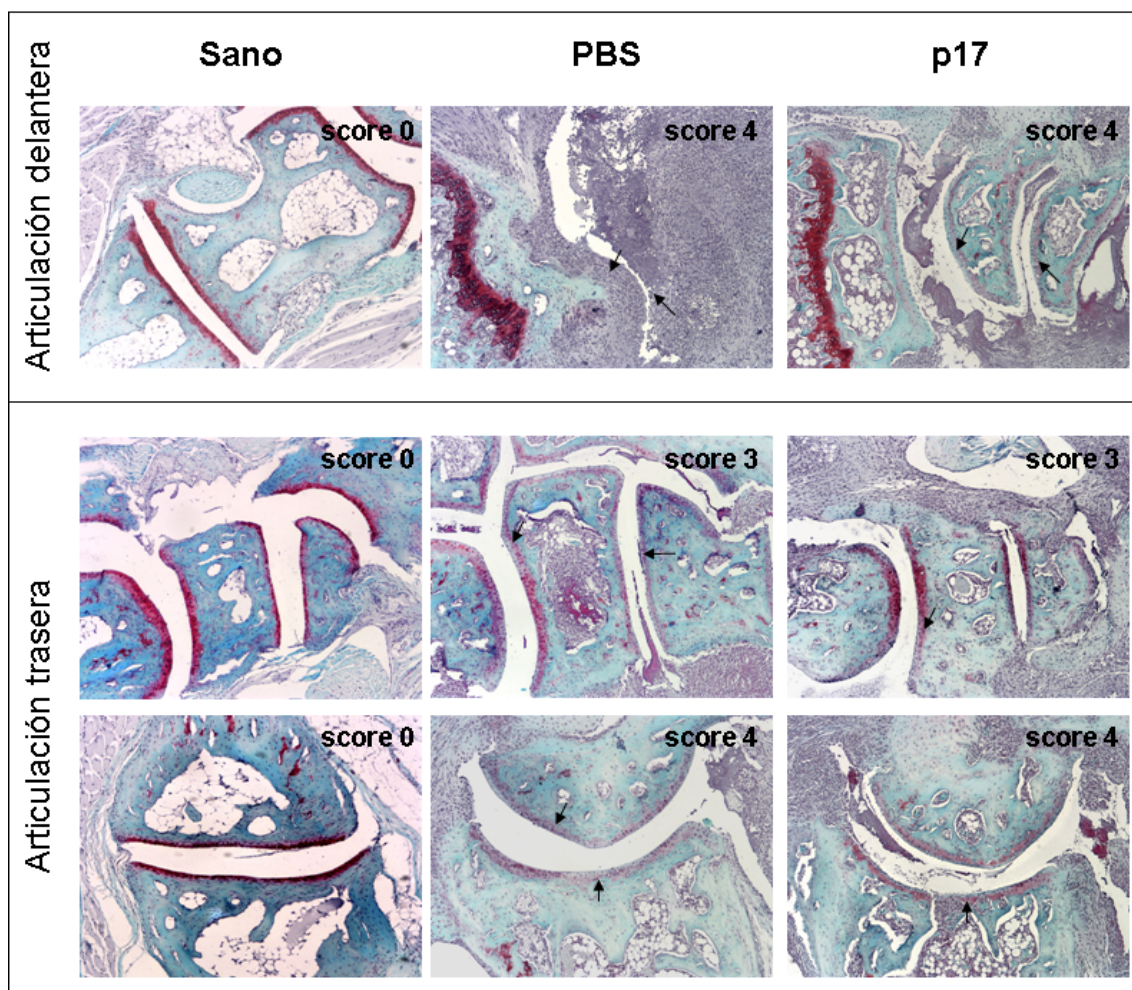


Figura 30. Tinción con safranina O representativa de extremidades delanteras y traseras de ratones DBA/10IaHsd sanos (izquierda) o ratones con CIA tratados con PBS (central) o p17 (derecha) durante la fase de enfermedad establecida. Análisis realizado a los 10 días desde el inicio del tratamiento. Pérdida masiva del cartílago articular fue observada tanto en el grupo control como en el grupo tratado con p17 en ratones con CIA. (100X). Las flechas señalan las zonas de pérdida/ausencia de cartílago articular en ambos grupos de tratamiento.

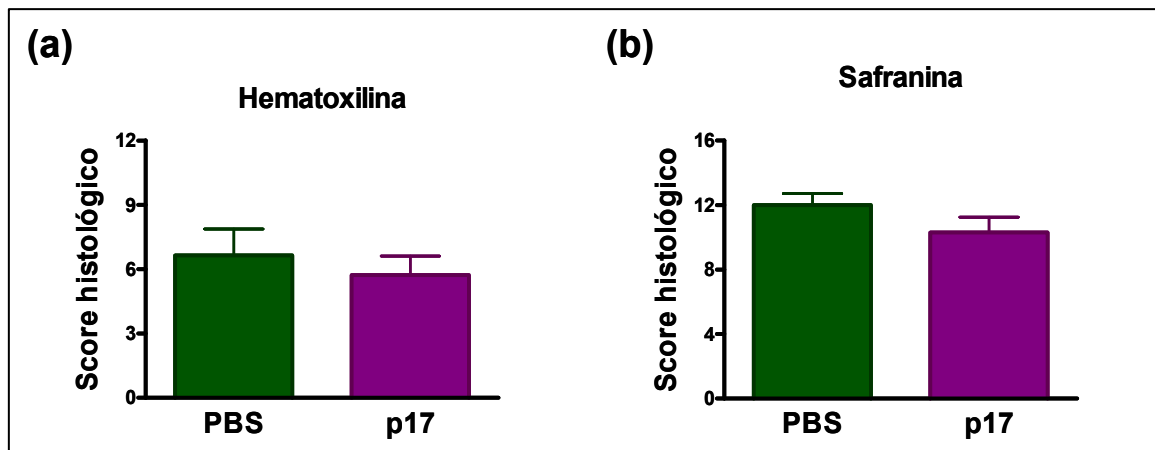


Figura 31. (a) Inflamación y destrucción ósea en ratones con CIA tratados con PBS o p17 tras la aparición de los signos de inflamación. Los datos representan la media de score clínico  $\pm$  SEM (0-12) por grupos de tratamiento. (b) Pérdida de cartilago articular calculada como la media de los scores clínicos (hasta un máximo de 16 por ratón).

### 6.3. Diferenciación y funcionalidad de los LT en ratones artríticos tratados con p17

Tras analizar clínicamente el efecto de bloquear de forma selectiva TGF- $\beta$  durante la fase de desarrollo de la artritis en ratones con CIA, se estudió el efecto sobre la expresión de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T.

Para ello, se aislaron células de ganglio inguinal, se tiñeron para los distintos marcadores de subpoblaciones T y se analizaron mediante citometría de flujo. La expresión de citoquinas en las células T CD4<sup>+</sup> (figura 32a), en las células T CD8<sup>+</sup> y T $\gamma\delta$ TCR<sup>+</sup> (figuras 32b y c respectivamente) en ratones artríticos tratados con p17 fue comparable a los de los animales tratados con PBS, no observándose diferencias significativas entre ambos grupos. Asimismo, el porcentaje de células Treg en las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> tampoco se vio modificado tras el bloqueo con p17 (figura 32d).

La proliferación de las células T se analizó a las 72 horas en cultivo con CII, utilizando  $\alpha$ -CD3 en las mismas condiciones como control de la proliferación. Los resultados (figura 33a) mostraron un aumento significativo en ambos grupos tras la estimulación con  $\alpha$ -CD3 (PBS  $0,32 \pm 0,05$ ;  $p < 0,0001$  y p17  $0,41 \pm 0,05$ ;  $p < 0,0001$ ) y con CII (PBS  $0,15 \pm 0,03$ ;  $p = 0,03$  y p17  $0,11 \pm 0,03$ ;  $p = 0,01$ ) comparado con los niveles basales (PBS  $0,07 \pm 0,02$  y p17  $0,04 \pm 0,01$ ) (figura 32a). Sin embargo, no se

encontraron diferencias en respuesta al CII estadísticamente significativas entre ambos grupos de tratamiento (figura 33b).

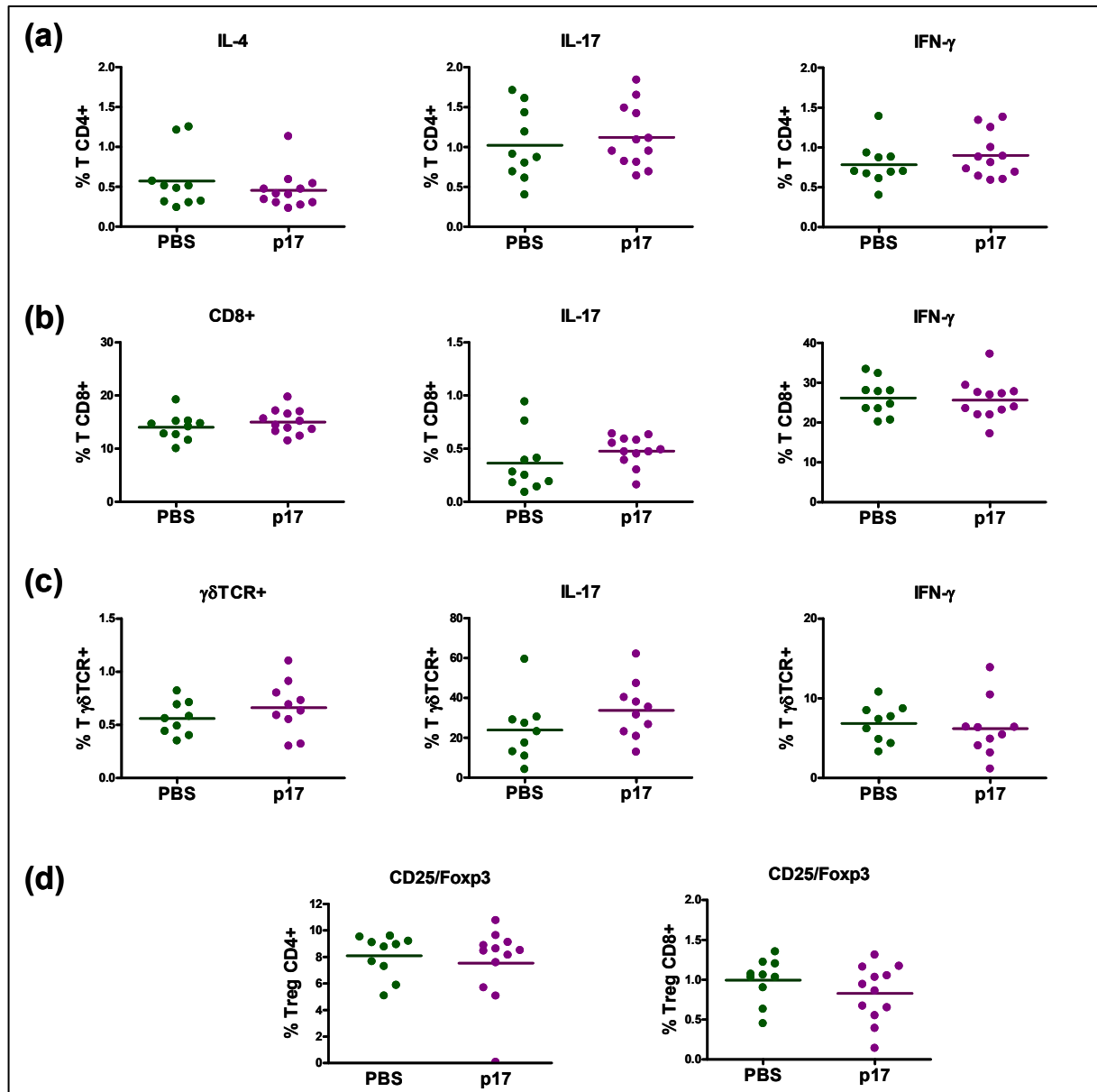


Figura 32. Análisis por citometría de flujo de suspensiones celulares de ganglios linfáticos inguinales de ratones artríticos, tratados durante 10 días tras los primeros signos de inflamación. (a) Células CD4+ productoras de IL-4, IL-17 e IFN- $\gamma$ . (b y c) Porcentaje de células T CD8+ (b) y T $\gamma\delta$ TCR (c) productoras de IL-17 e IFN- $\gamma$ . (d) Porcentaje de células CD4+ y CD8+ productoras de Foxp3 en ganglio inguinal de ratones con CIA tras 10 días desde la inmunización. Se muestran los datos correspondientes a 1 experimento representativo de 3 realizados.

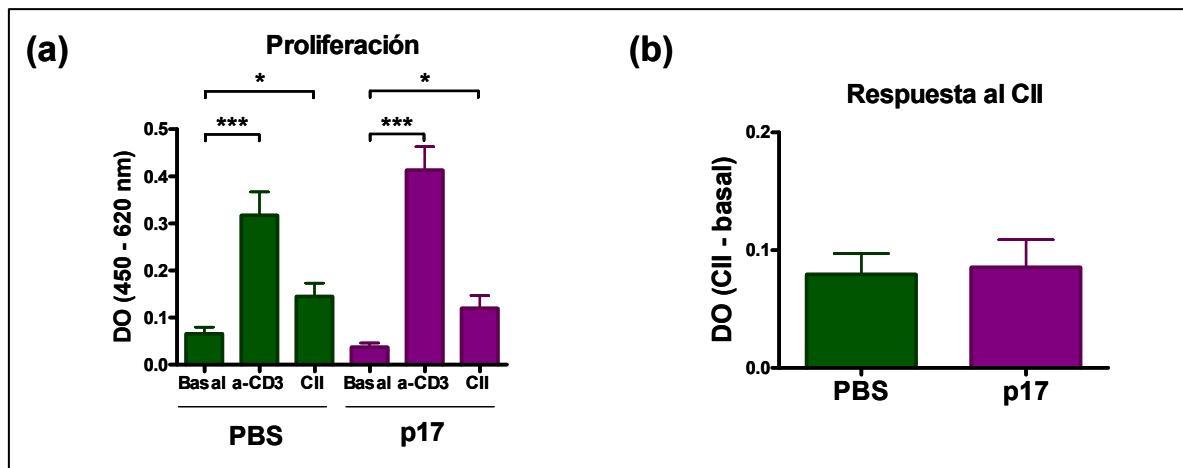


Figura 33. (a y b) Respuesta proliferativa a la estimulación con CII en ratones DBA/10laHsd a los 10 días desde la fecha de inmunización. Células de ganglio linfático inguinal de ratones con artritis tratados con p17 o vehículo fueron cultivadas durante 72h en presencia de a-CD3 [100ng/ml] como control de estimulación y CII [50µg/ml]. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Los datos mostrados corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados. La proliferación celular fue cuantificada con el reactivo WST-1.

El análisis de producción de citoquinas en ganglio inguinal de ratones con CIA tratados y no tratados con p17 (figura 34), se cuantificó tras 48 horas de estimulación con CII o con a-CD3. En el grupo control, la producción de IL-17 aumentó significativamente tras la estimulación con CII (basal  $0,91 \pm 0,59$  pg/ml; CII  $227,8 \pm 123,1$  pg/ml;  $p=0,02$ ). Lo mismo ocurrió en el grupo tratado con p17 (basal  $7,81 \pm 3,75$  pg/ml; CII  $173,0 \pm 79,38$  pg/ml;  $p=0,002$ ). (Figura 34a). En este grupo, también se observaron diferencias tras la estimulación con a-CD3 (basal  $7,81 \pm 3,75$  pg/ml; a-CD3  $382,2 \pm 188,1$  pg/ml;  $p < 0,0001$ ). Sin embargo, aunque la producción de IL-17 en respuesta a CII fue menor en el grupo tratado con p17, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (figura 34c).

La producción de IFN- $\gamma$  en los sobrenadantes de cultivo aumentó significativamente en ambos grupos tras la estimulación con a-CD3 (PBS  $762,5 \pm 293,4$  pg/ml;  $p=0,0007$  y p17  $1278 \pm 577,2$  pg/ml;  $p=0,0001$ ) como con CII (PBS  $616,2 \pm 320,0$  pg/ml;  $p=0,009$  y p17  $285,7 \pm 153,5$  pg/ml;  $p=0,02$ ) respecto a los niveles basales (PBS  $70,16 \pm 21,35$  pg/ml y p17  $21,57 \pm 8,94$  pg/ml) (figura 34b). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al comparar la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a CII entre ambos grupos de tratamiento (figura 34d).

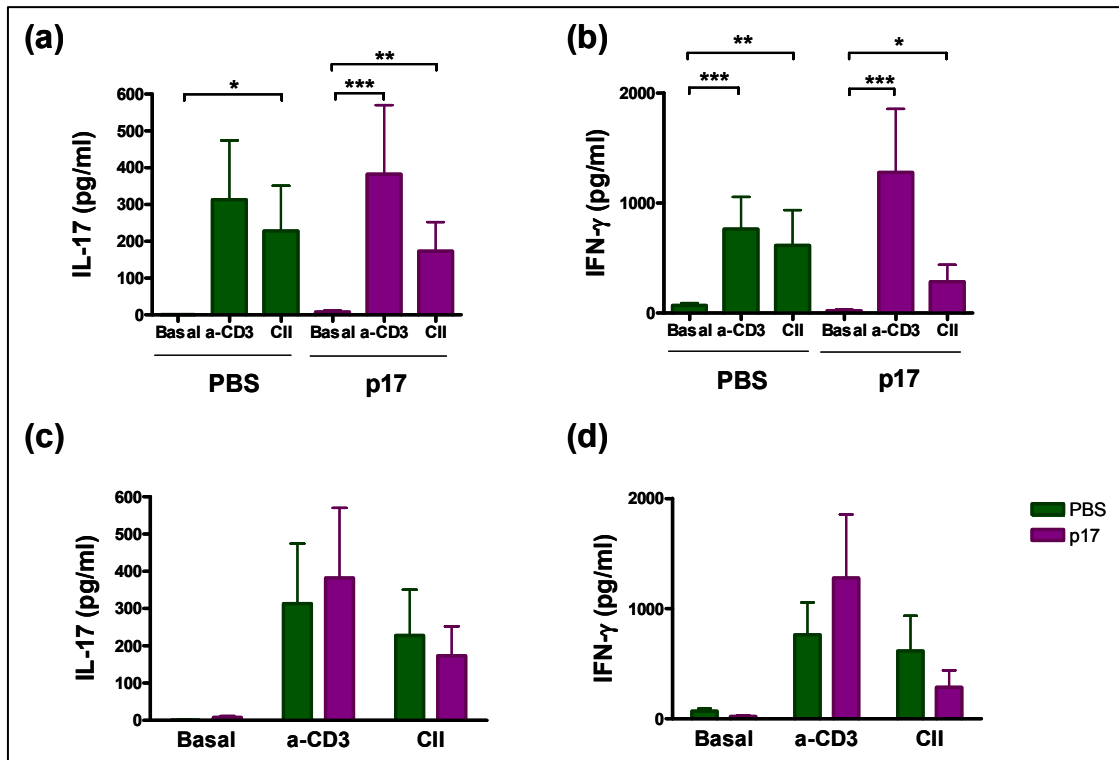


Figura 34. Respuesta de células T a la estimulación con CII en ratones DBA/10laHsd artríticos tratados con p17. La producción de IL-17 (a y c) e IFN- $\gamma$  (b y d) fue cuantificada por ELISA en los sobrenadantes de cultivo de células de ganglio linfático inguinal, estimuladas durante 48h en presencia de a-CD3 [100ng/ml] y CII [50 $\mu$ g/ml]. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; Los datos mostrados corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados.

#### 6.4. Niveles de IL-6 y anticuerpos anti-CII en ratones artríticos tratados con p17

A continuación, se analizaron los niveles de IL-6 en el suero de los ratones en el momento del sacrificio.

Los resultados obtenidos no revelaron diferencias tras el tratamiento con p17 durante 10 días en ratones con artritis (figura 35a). Asimismo, se analizaron los niveles de Ac anti-CII IgG1 e IgG2a en los mismos ratones, sin observarse diferencias entre ambos grupos de tratamiento (figura 35b).

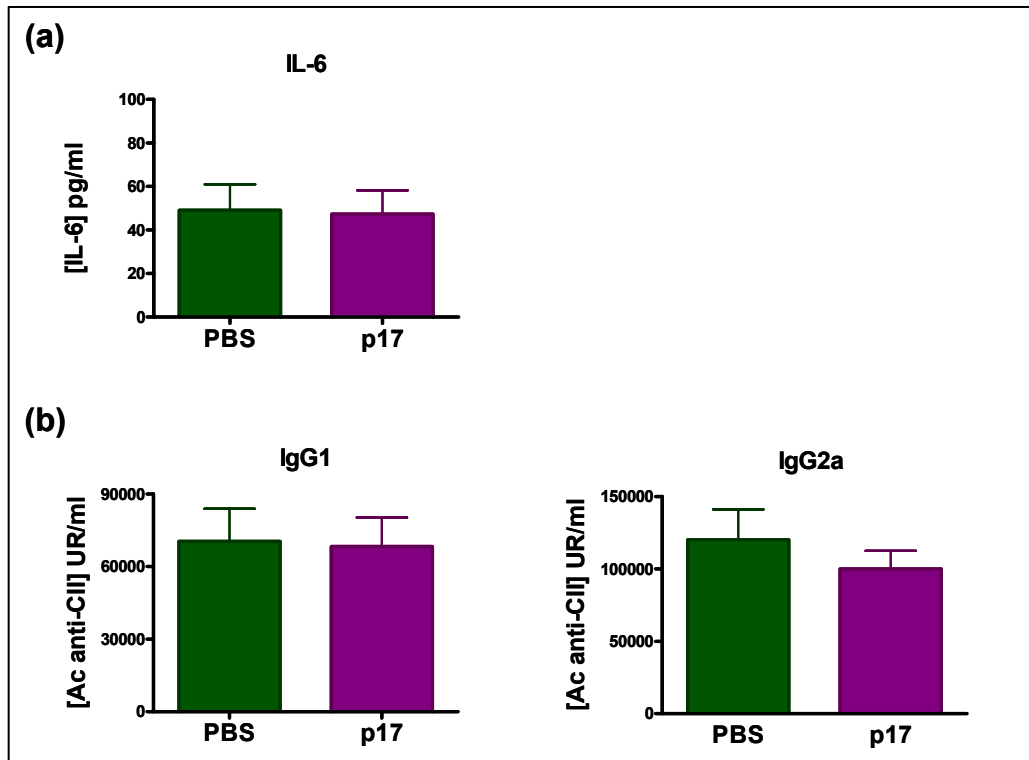


Figura 35. (a) IL-6 (pg/ml) circulante a los 10 días tras la inmunización en ratones con CIA. (b) Cuantificación de isotipos IgG anti-CII (UR/ml) en suero a los 10 días desde la inmunización en ratones con artritis tratados con p17 o PBS. Los datos corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados.

### 6.5. Expresión de citoquinas proinflamatorias y Treg en bazo y extremidades de ratones con CIA tras el bloqueo de TGF- $\beta$

Por último, se analizó la expresión de ARNm de IL-6, IL-17, IL-23, Ror $\gamma$ t, IFN- $\gamma$  y Foxp3 en bazo y extremidades de ratones con artritis tratados con p17 para ver la expresión local de los diferentes parámetros de inflamación. El análisis del ARNm por PCR cuantitativa en el bazo de los ratones tratados y no tratados con p17, no mostró diferencias significativas en la expresión de ninguno de los genes analizados (figuras 36a, b y d) salvo en la expresión de IFN- $\gamma$  (figura 36c), donde se observó un aumento significativo tras el tratamiento con p17 (PBS  $0,09 \pm 0,01$  y p17  $0,29 \pm 0,06$ ;  $p=0,04$ ).

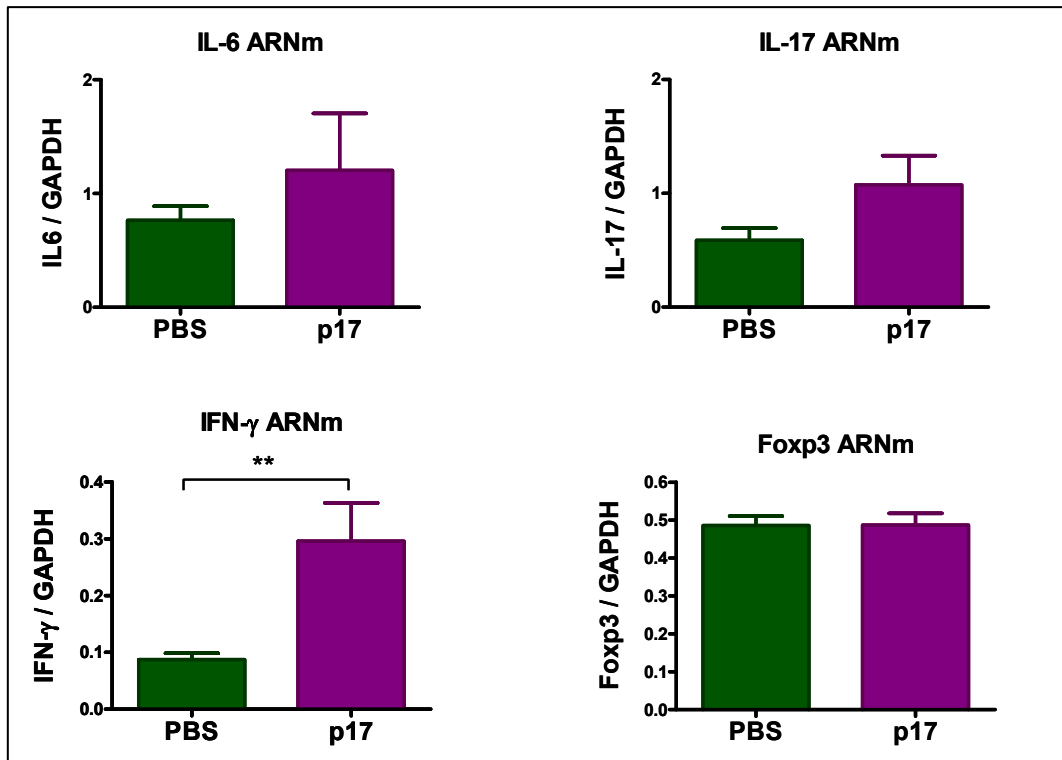


Figura 36. Expresión de citoquinas y células Foxp3 en bazo de ratones artríticos tras el bloqueo de TGF- $\beta$ . Análisis realizado por PCR cuantitativa. Los datos se muestran como el ratio entre los distintos genes respecto a la GAPDH. Los datos mostrados corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados. \*  $p < 0,05$ .

Del mismo modo, se analizaron los cambios en la expresión de dichos genes en las articulaciones inflamadas de los ratones tratados con PBS o p17 durante la fase de enfermedad establecida. El bloqueo de TGF- $\beta$  no reveló cambios en la expresión de IL-6, IFN- $\gamma$ , Foxp3 y Ror $\gamma$ t (figura 37a, b, c y f respectivamente). Los niveles de expresión de IL-17, aunque no alcanzaron la significación estadística, fueron mayores tras en bloqueo de TGF- $\beta$  (figura 37d). Igualmente, los niveles de expresión de IL-23 se vieron aumentados tras el tratamiento con p17, siendo dichas diferencias estadísticamente significativas (PBS  $0,02 \pm 0,01$  y p17  $0,09 \pm 0,01$ ;  $p = 0,003$ ) (figura 37e).

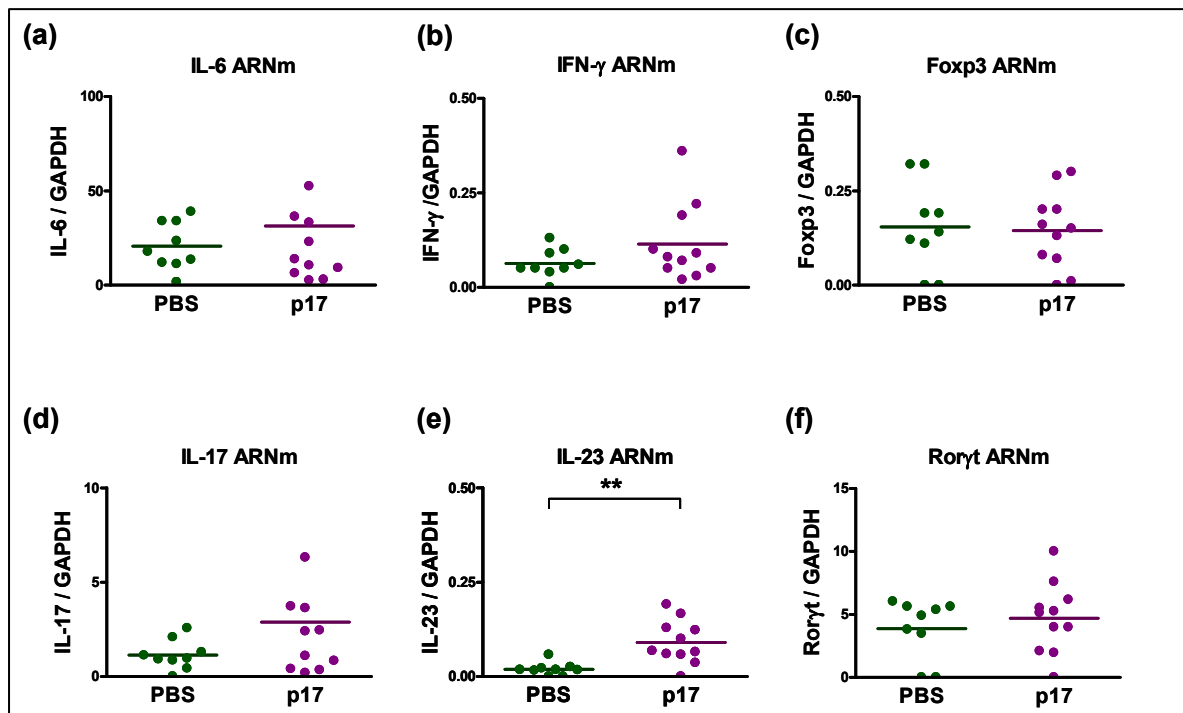


Figura 37. Expresión de citoquinas (a, b, d y e) y factores de transcripción (c y f) en articulaciones inflamadas de ratones con CIA a los 10 días de enfermedad tras el bloqueo de TGF- $\beta$ . Análisis realizado por PCR cuantitativa. Los datos se muestran como el ratio entre los distintos genes respecto a la GAPDH. Los datos mostrados corresponden a 2 experimentos. \*\*  $p < 0,01$ .



## **DISCUSIÓN**

---



## 1. Señalización de TGF- $\beta$ en FS y tejido sinovial de pacientes con AR

Nuestros resultados indican que la vía de señalización de TGF- $\beta$  está activada en la sinovial reumatoide sugiriendo una posible implicación patogénica de esta citoquina en el desarrollo de la enfermedad. Los resultados presentados con anterioridad en la literatura son dispares en cuanto al papel de TGF- $\beta$  en la AR, como factor inmunoregulador inductor o inhibidor de la respuesta inflamatoria según las condiciones del entorno.

Las células mononucleares procedentes de tejido sinovial reumatoide en cultivo producen TGF- $\beta$ 1 y se ha demostrado su presencia en el tejido y fluido sinovial (Brennan y col., 1990). Estudios de microarrays sugieren un incremento de la vía de señalización de TGF- $\beta$  en FS de pacientes con AR comparado con pacientes con OA, en concreto, aumento de TGF- $\beta$ 1 y su receptor (TGF- $\beta$ RI), acompañado de un aumento de MMP. Este incremento de TGF- $\beta$ 1 se ha asociado directamente con marcadores clínicos de actividad y gravedad de la enfermedad (Pohlers y col., 2007), indicando una correlación directa entre TGF- $\beta$ 1 y la inflamación. Por otra parte, se han descrito alteraciones en la vía de señalización de TGF- $\beta$  dependiente de las proteínas Smad con implicación patogénica en enfermedades crónicas fibrosantes e inflamatorias (Monteleone y col., 2001; Varga y Pasche, 2009). En este sentido, nuestros datos muestran un incremento en la fosforilación de Smad-2/3, la vía clásica de activación de TGF- $\beta$ , en las células del *lining* y los vasos sanguíneos de la sinovial reumatoide y artrósica comparado con la sinovial sana. Aunque se detectó expresión del inhibidor Smad-7 en las células del *lining* y vasos en todas las muestras, las células linfoides de los agregados inflamatorios en la sinovial reumatoide no expresaron Smad-7. Esta ausencia de Smad-7 justificaría el incremento en la fosforilación de Smad-2/3. Numerosos trabajos señalan a los fibroblastos como los principales componentes celulares de la sinovial reumatoide responsables del desarrollo de la inflamación y la destrucción articular (Muller-Ladner y col., 1996; Huber y col., 2006; del Rey y col., 2009; Lefevre y col., 2009). Con respecto a la señalización de TGF- $\beta$  en los FS, se ha descrito un incremento en la expresión de TGF- $\beta$ R2 en FS de pacientes con AR comparado con pacientes con OA (Bira y col., 2005), mientras que otros autores apuntan que Smad-2 se ve reducida significativamente en el cartílago durante la progresión de la OA en varios modelos animales (Blaney Davidson y col., 2006). En la

misma línea, nuestros resultados revelaron un incremento en la fosforilación de Smad-2 inducida por TGF- $\beta$  en FS cultivados de pacientes con AR con respecto a los sanos y artrósicos.

## **2. TGF- $\beta$ en el desarrollo clínico y la gravedad de la artritis en el modelo murino de CIA**

El modelo de CIA es un modelo dependiente de células T (Monach y col., 2004; Sakaguchi y Sakaguchi, 2005) con características similares a lo que ocurre en humanos, principalmente sinovitis, destrucción de hueso y cartílago y formación del *pannus* con abundante infiltrado inflamatorio. Nosotros observamos que ratones con CIA desarrollan una artritis muy grave con afectación de múltiples articulaciones y una marcada destrucción de hueso y cartílago. El bloqueo selectivo de TGF- $\beta$  con p17 retrasa la aparición y reduce la gravedad de la artritis en nuestro modelo, aunque los efectos son solo moderados. Sin embargo, este efecto moderado no puede atribuirse a un bloqueo insuficiente de TGF- $\beta$ . La capacidad de p17 de bloquear la actividad de TGF- $\beta$  *in vitro* fue probada en células linfoides procedentes de bazo de ratón, donde p17 redujo en un 70% la fosforilación de proteínas Smad inducida por TGF- $\beta$ . Asimismo, la dosis utilizada *in vivo* fue similar a la utilizada por otros autores en un modelo de fibrosis inducida en ratas (Dotor y col., 2007) y en un modelo murino de tumorigénesis (Gil-Guerrero y col., 2008).

Desde el punto de vista clínico, el efecto neto de bloquear TGF- $\beta$  en nuestro modelo de CIA es beneficioso, descartando un papel protector de TGF- $\beta$  frente a la respuesta inflamatoria. Estos efectos clínicos son consistentes con los observados en otros modelos de artritis. En el modelo murino de CAIA, el tratamiento intraperitoneal con un Ac anti-TGF- $\beta$ RI previene los signos de la artritis y el desarrollo de la angiogénesis sinovial (Sakuma y col., 2007). De forma similar, se ha demostrado que la inyección intraarticular de TGF- $\beta$  en ratas induce hiperplasia sinovial y reclutamiento de células inflamatorias, principalmente LT (Allen y col., 1990; Fava y col., 1991), mientras que la inyección de un Ac anti-TGF- $\beta$  inhibe la inflamación sinovial en el modelo de artritis inducida por SCW (Wahl y col., 1993).

Algunos autores sin embargo, han mostrado que la inyección local e intraperitoneal de Ac anti-TGF- $\beta$  en el modelo de CIA aumenta la gravedad de la artritis (Thorbecke y

col., 1992; Sancho y col., 2003). No obstante, el protocolo utilizado para el tratamiento de los ratones es diferente al nuestro al utilizar dosis en días no sucesivos, o tratar a partir de las tres semanas desde la inmunización, una vez se ha desencadenado la respuesta inmune que conduce al desarrollo de la artritis.

En nuestro estudio, los efectos del bloqueo de TGF- $\beta$  fueron más claros en la inflamación que en el daño tisular, donde la destrucción de hueso y cartílago fue similar en ratones tratados con p17. Sin embargo, la falta de significación estadística en nuestro caso sugiere que aparte de TGF- $\beta$ , otros componentes del sistema inmune están implicados en el desarrollo de la artritis en el modelo de CIA.

### **3. TGF- $\beta$ en la inducción de CIA: diferenciación de las subpoblaciones de células T y consecuencias funcionales**

El papel de las células Th17 en respuesta al CII en fases tempranas del desarrollo de la artritis se ha demostrado en el modelo de CIA (Nakae y col., 2003), donde el bloqueo de la IL-17 reduce la producción de citoquinas proinflamatorias y la gravedad del proceso inflamatorio (Lubberts y col., 2004). Nuestros resultados muestran por primera vez los efectos de bloquear TGF- $\beta$  en la respuesta de las células T en un modelo de artritis crónica. En la EAE, una enfermedad mediada por células T, la sobreexpresión de TGF- $\beta$  en las células T induce una enfermedad más grave y aumenta el número de células Th17, mientras que el bloqueo de TGF- $\beta$  inhibe la diferenciación de las células Th17 y previene el desarrollo de la enfermedad (Veldhoen y col., 2006). El tratamiento con p17 durante la fase de inducción de CIA reduce ligeramente la subpoblación de células Th17 y la producción de IL-17 en células de los ganglios linfáticos en respuesta al CII. Esta reducción se ve acompañada por un descenso moderado en los niveles de ARNm de IL-17, IFN- $\gamma$  e IL-23 en las articulaciones inflamadas. Acorde con nuestros resultados, ratones deficientes en TGF- $\beta$ 1 presentan niveles reducidos de células Th17, aunque la IL-17 no está absolutamente ausente (Mangan y col., 2006). Estos resultados sugieren que TGF- $\beta$  podría no ser absolutamente necesario para la diferenciación de las células Th17 murinas durante el desarrollo de CIA, como ha sido demostrado en otros modelos. En este sentido, se ha descrito que IL-6 junto con IL-23 e IL-1 $\beta$  son capaces de inducir la expresión de *IL17a/IL-17f* y *Rorc* independientemente de TGF- $\beta$ 1

(Ghoreschi y col., 2010). Estas células Th17 diferenciadas en presencia de IL-23 son más patogénicas que aquellas derivadas en presencia de TGF- $\beta$  y pueden dar lugar a células productoras de IFN- $\gamma$  e IL-17. Otros autores han expuesto que TGF- $\beta$  no actúa directamente promoviendo la diferenciación de las células Th17 murinas, sino que actúa indirectamente para regular IL-17 por supresión de los factores que contribuyen a la diferenciación de las células Th1 y Th2 (Das y col., 2009). De forma similar, la diferenciación de las células Th17 humanas puede acontecer en ausencia de TGF- $\beta$ , siendo entonces un proceso dependiente de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23 (Acosta-Rodriguez y col., 2007). Consistente con estas observaciones, nuestros datos indican que TGF- $\beta$  tiene un efecto pequeño en la diferenciación de las células Th17 en el modelo de CIA y sugieren que otras citoquinas como IL-23, podrían estar implicadas en este proceso. Datos comparables fueron obtenidos en análisis más tempranos avalando esta hipótesis: el bloqueo de TGF- $\beta$  durante 2 semanas en ratones inmunizados no mostró diferencias significativas en los niveles de células Th17 y en la producción de IL-17 en células de ganglios linfáticos en respuesta a CII.

Trabajos recientes sugieren que las células T $\gamma\delta$  son las principales productoras de IL-17 y tienen una implicación patogénica en ratones con CIA (Roark y col., 2007; Ito y col., 2009). De hecho, el número absoluto de células T $\gamma\delta$  IL-17<sup>+</sup> es mayor al de células Th17 en la articulación durante el pico máximo del desarrollo de la artritis. Nuestros resultados muestran niveles moderadamente reducidos de IL-17 en la articulación sin observarse ningún efecto en la producción de IL-17 en las células T $\gamma\delta$  de los ganglios linfáticos tras el bloqueo de TGF- $\beta$ . Estos resultados son acordes con otros trabajos previos que defienden que este tipo celular no es necesario para la inducción de la artritis en el modelo de CIA (Corthay y col., 1999), ya que no responden al CII, aunque sí proliferan en respuesta a IL-23.

Las células TCD8<sup>+</sup> efectoras de la sinovial reumatoide inducen la síntesis de IFN- $\gamma$  e IL-17 y se ha demostrado su papel en la sinovitis crónica en el modelo de ratón K/BxN (Raposo y col., 2010). TGF- $\beta$  actúa en las células CD8<sup>+</sup> induciendo la producción de Foxp3 e IL-17, dando lugar a las TregCD8<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>, respectivamente (Huber y col., 2009; Mantel y Schmidt-Weber, 2011). No obstante, su papel en el desencadenamiento de la artritis inducida por CII muestra resultados dispares (Tada y col., 1996; Ehinger y col., 2001), indicando que estas células podrían no estar implicadas en el inicio de la enfermedad. Nuestros resultados muestran que

TGF- $\beta$  no contribuye al desarrollo de las subpoblaciones de linfocitos CD8 en el modelo de CIA.

La señalización a través de TGF- $\beta$  protege a las células Treg de la apoptosis (Ouyang y col., 2010) y es absolutamente necesaria para inducir la expresión de Foxp3, ya que se ha demostrado que células TCD4+ deficientes en TGF- $\beta$  no pueden generar células Treg *in vivo* e *in vitro* (Kulkarni y col., 1993; Christ y col., 1994; Liu y col., 2008). Las células Treg producen elevadas cantidades de TGF- $\beta$  que regula la supresión de las células T (Nakamura y col., 2001). En fases tardías de la progresión del cáncer, TGF- $\beta$  promueve la tumorigénesis mediante supresión del sistema inmune (Moustakas y col., 2002). Resultados previos utilizando p17 han demostrado la capacidad de bloquear la actividad inmunosupresora de las células iTreg humanas y murinas, importante para romper la tolerancia frente a patógenos o antígenos tumorales (Gil-Guerrero y col., 2008). La capacidad de p17 de reducir la producción de las células Treg depende de su efecto inhibitorio sobre TGF- $\beta$ 1, y en menor medida TGF- $\beta$ 2, como ha sido demostrado en modelos de cáncer (Gil-Guerrero y col., 2008). Sin embargo, recientemente se ha descrito que en ausencia de TGF- $\beta$ 1 funcional, el desarrollo de las células Treg en el cáncer podría ser producido por un mecanismo compensatorio dependiente de la expresión de TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3 en el timo y la periferia (Marie y col., 2005; Hinz y col., 2007). Nuestros resultados sólo muestran una reducción moderada de los niveles de células Treg en los ganglios linfáticos tras el bloqueo de TGF- $\beta$  durante la fase de inducción, sugiriendo que dichos mecanismos compensatorios dependientes de TGF- $\beta$ 2 y, sobre todo, TGF- $\beta$ 3, pueden ser funcionales en la diferenciación de las Treg durante CIA. Sin embargo, los mecanismos implicados en el desarrollo de las células Treg en el cáncer y en la artritis de origen inmune podrían ser diferentes.

En el modelo de CIA se ha demostrado un papel protector de las células Treg (Morgan y col., 2003), principalmente si se transfieren en el momento de la inmunización. Estos ratones presentan una artritis menos grave y muestran una acumulación de células Treg en la sinovial (Ohata y col., 2007). El bloqueo de TGF- $\beta$  durante la fase de inducción en ratones con CIA incrementa ligeramente los niveles de Foxp3 en las articulaciones inflamadas, lo que refleja un aumento en la presencia de células Treg. Sin embargo, los niveles de Treg en los ganglios linfáticos se reducen tras el bloqueo de TGF- $\beta$ . En conjunto, esto sugiere que el tratamiento con p17 favorece la migración de las células Treg desde los ganglios linfáticos a las articulaciones

inflamadas. Al mismo tiempo esto se asocia con un retraso en la aparición de los signos de inflamación y con una artritis menos grave.

El desarrollo de la artritis en el modelo de CIA está asociado con una respuesta de los LT, LB y células T específicas de CII y con la producción de Ac-anti-CII. En este modelo, predominan los autoanticuerpos de la subclase IgG2, con elevados niveles tanto de IgG2a como de IgG2b sobre todo en el momento de máxima inflamación (Asquith y col., 2009). Consistentes con estos datos, nuestros resultados muestran un ratio IgG2a/IgG1 aumentado en el suero de los ratones con artritis, aunque el bloqueo de TGF- $\beta$  durante la inducción no modifica los niveles de Ac anti-CII de ambos subtipos. El incremento de los Ac anti-CII IgG2a es aún más significativo en el pico máximo de la inflamación (a las 6 semanas desde la inmunización), comparado con los niveles durante la fase previa al desarrollo de la inflamación (2 semanas desde la inmunización). Sin embargo, el bloqueo de TGF- $\beta$  no modifica los niveles de ambos isotipos, IgG1 e IgG2a, en los dos periodos estudiados.

La implicación de la IL-6 en los modelos murinos de artritis se ha establecido por su papel como mediador de la inflamación crónica y la destrucción tisular (Alonzi y col., 1998; Kobayashi y col., 2002). Asimismo, esta citoquina se considera un marcador precoz de la respuesta inflamatoria y su aumento en suero fluctúa en sentido concordante con la actividad de la enfermedad (Knudsen y col., 2008). En los pacientes con AR, los niveles de IL-6 se han relacionado con el grado de actividad y de daño radiológico (Houssiau y col., 1988; Madhok y col., 1993). Sin embargo, el bloqueo de TGF- $\beta$  en el modelo de CIA no fue suficiente para vislumbrar un descenso de IL-6 en los niveles de suero circulante.

#### **4. Papel de TGF- $\beta$ en ratones con la enfermedad establecida**

Nuestros resultados muestran globalmente que el bloqueo de TGF- $\beta$  en ratones con artritis establecida reduce ligeramente los signos de inflamación sin observarse un efecto clínico estadísticamente significativo.

Nuestra hipótesis inicial planteaba que el bloqueo de TGF- $\beta$  en ratones con la enfermedad establecida, bloquearía la supresión de las células T mediada por las células

Treg, incrementando los signos de inflamación. Las células Treg producen elevadas cantidades de TGF- $\beta$ , que actúa sobre las células T efectoras para promover la supresión inmune (Nakamura y col., 2001). Algunos autores apuntan que el tratamiento con un Ac anti-TGF- $\beta$  intraperitoneal en ratones con CIA, aumenta la gravedad clínica de la artritis (Thorbecke y col., 1992). Sin embargo, nuestros datos muestran un efecto contrario tras el bloqueo de TGF- $\beta$ . En nuestro caso, y a diferencia de estos autores, el tratamiento con p17 es administrado en los ratones una vez se han establecido los signos de la inflamación. En este momento, el bloqueo de TGF- $\beta$  actuaría sobre las células T ya diferenciadas, lo que podría explicar la falta de un efecto significativo en las subpoblaciones de células T en los ganglios linfáticos.

Como se ha mencionado anteriormente, los últimos datos publicados apoyan la idea de que las células Th17 pueden diferenciarse en ausencia de TGF- $\beta$  (Ghoreschi y col., 2010). Estos autores sugieren que las células diferenciadas en presencia de IL-23 tienen un mayor potencial patogénico y producen IL-17 e IFN- $\gamma$ . Acorde con estos datos publicados, existe la posibilidad de que cuando TGF- $\beta$  es bloqueado en el modelo de CIA, la diferenciación de las células Th17 sea soportada por un mecanismo alternativo dependiente de IL-23, justificando los elevados niveles de IL-17, IFN- $\gamma$  e IL-23 observados en las articulaciones inflamadas. Por otra parte, muy recientemente se ha publicado que las células Th17 desarrolladas por un mecanismo dependiente de IL-23, IL-6 y TGF- $\beta$ 1 son patogénicas y producen elevadas cantidades de TGF- $\beta$ 3 (Lee y col., 2012). Además, TGF- $\beta$ 3 induce células Th17 con un papel patogénico en modelos de EAE y colitis, similar a la capacidad patogénica de las Th17 diferenciadas en presencia de IL-6 y TGF- $\beta$ 1. Sin embargo, las células Th17 dependientes de TGF- $\beta$ 3, producen cantidades más elevadas de IL-23. Teniendo en cuenta que la capacidad inhibitoria de p17 sobre TGF- $\beta$ 3 es muy pequeña comparada con los otros dos isotipos de TGF- $\beta$  (Gil-Guerrero y col., 2008), es posible que los elevados niveles de IL-23 y de IL-17 detectados en la articulación de ratones tratados con p17, sean producidos por células Th17 diferenciadas en presencia de TGF- $\beta$ 3. De esta forma, la presencia de mecanismos de generación de células Th17 independientes de TGF- $\beta$ 1 explicaría que el tratamiento con p17 resultara tan sólo en un ligero descenso en la gravedad de la artritis, tal como se observa.



**CONCLUSIONES**

---



1. Las células mononucleares de los infiltrados inflamatorios del tejido sinovial reumatoide humano presentan una fosforilación de proteínas Smad (Smad-2/3) incrementada, con ausencia de proteína Smad-7 inhibidora. Los fibroblastos sinoviales reumatoides *in vitro* presentan una mayor fosforilación de Smad-2 en respuesta a la estimulación con TGF- $\beta$ . Estos datos apuntan a una señalización de TGF- $\beta$  activa en la sinovial reumatoide.
2. El bloqueo de TGF- $\beta$  durante la inducción de la artritis en el modelo murino de CIA retrasa los signos de inflamación y reduce de forma moderada la gravedad del proceso inflamatorio. Los efectos del bloqueo de TGF- $\beta$  en el modelo de CIA son más eficaces durante esta fase, donde los niveles de células Th17 y Treg se reducen moderadamente.
3. El bloqueo de TGF- $\beta$  en ratones con la artritis establecida reduce de forma moderada la gravedad de la artritis. Sin embargo, en esta fase no se observa ningún efecto sobre las células T diferenciadas.
4. El grado de destrucción cartilaginosa y ósea no se ve afectado tras el bloqueo de TGF- $\beta$  tanto durante la inducción de la artritis como una vez establecida la enfermedad.
5. El bloqueo de TGF- $\beta$  en el modelo de CIA no es suficiente para observar un marcado efecto beneficioso sobre el desarrollo de la artritis. Esto podría deberse a la implicación de otros mediadores solubles diferentes de TGF- $\beta$ , como IL-23, en la diferenciación de las células Th17, sin poder excluir además la participación de otros componentes celulares en este modelo murino.
6. Aunque nuestros resultados no demuestran un efecto terapéutico del bloqueo de TGF- $\beta$ , estos datos descartan un papel de TGF- $\beta$  como agente antiinflamatorio en el modelo murino de CIA.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---



- (2007). "Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls." *Nature* **447**(7145): 661-678.
- Abbas, A. K., K. M. Murphy and A. Sher (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." *Nature* **383**(6603): 787-793.
- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." *Nat Immunol* **8**(9): 942-949.
- Ahmadzadeh, M. and S. A. Rosenberg (2005). "TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells." *J Immunol* **174**(9): 5215-5223.
- Alonzi, T., E. Fattori, D. Lazzaro, P. Costa, L. Probert, G. Kollias, F. De Benedetti, V. Poli and G. Ciliberto (1998). "Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis." *J Exp Med* **187**(4): 461-468.
- Alvarez-Quiroga, C., C. Abud-Mendoza, L. Doniz-Padilla, A. Juarez-Reyes, A. Monsivais-Urenda, L. Baranda and R. Gonzalez-Amaro (2011). "CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of Treg cells in patients with rheumatoid arthritis." *J Clin Immunol* **31**(4): 588-595.
- Allen, J. B., C. L. Manthey, A. R. Hand, K. Ohura, L. Ellingsworth and S. M. Wahl (1990). "Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta." *J Exp Med* **171**(1): 231-247.
- Andersson, A. K., P. F. Sumariwalla, F. E. McCann, P. Amjadi, C. Chang, K. McNamee, D. Tornehave, C. Haase, H. Agerso, V. W. Stennicke, D. Ahern, B. Urso, J. Trowsdale, M. Feldmann and F. M. Brennan (2011). "Blockade of NKG2D ameliorates disease in mice with collagen-induced arthritis: a potential pathogenic role in chronic inflammatory arthritis." *Arthritis Rheum* **63**(9): 2617-2629.
- Annes, J. P., Y. Chen, J. S. Munger and D. B. Rifkin (2004). "Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1." *J Cell Biol* **165**(5): 723-734.
- Annunziato, F., L. Cosmi, V. Santarlasci, L. Maggi, F. Liotta, B. Mazzinghi, E. Parente, L. Fili, S. Ferri, F. Frosali, F. Giudici, P. Romagnani, P. Parronchi, F. Tonelli, E. Maggi and S. Romagnani (2007). "Phenotypic and functional features of human Th17 cells." *J Exp Med* **204**(8): 1849-1861.
- Anthony, D. D. and T. M. Haqqi (1999). "Collagen-induced arthritis in mice: an animal model to study the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* **17**(2): 240-244.
- Arias, M., S. Sauer-Lehnen, J. Treptau, N. Janoschek, I. Theuerkauf, R. Buettner, A. M. Gressner and R. Weiskirchen (2003). "Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats." *BMC Gastroenterol* **3**: 29.
- Ashcroft, G. S., X. Yang, A. B. Glick, M. Weinstein, J. L. Letterio, D. E. Mizel, M. Anzano, T. Greenwell-Wild, S. M. Wahl, C. Deng and A. B. Roberts (1999). "Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response." *Nat Cell Biol* **1**(5): 260-266.
- Asquith, D. L., A. M. Miller, I. B. McInnes and F. Y. Liew (2009). "Animal models of rheumatoid arthritis." *Eur J Immunol* **39**(8): 2040-2044.
- Awasthi, A., Y. Carrier, J. P. Peron, E. Bettelli, M. Kamanaka, R. A. Flavell, V. K. Kuchroo, M. Oukka and H. L. Weiner (2007). "A dominant function for

- interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells." *Nat Immunol* **8**(12): 1380-1389.
- Baier, A., I. Meineckel, S. Gay and T. Pap (2003). "Apoptosis in rheumatoid arthritis." *Curr Opin Rheumatol* **15**(3): 274-279.
- Balsa, A., N. J. Minaur, D. Pascual-Salcedo, C. McCabe, A. Balas, B. Fiddament, J. L. Vicario, N. L. Cox, E. Martin-Mola and N. D. Hall (2000). "Class II MHC antigens in early rheumatoid arthritis in Bath (UK) and Madrid (Spain)." *Rheumatology (Oxford)* **39**(8): 844-849.
- Bang, S. Y., K. H. Lee, S. K. Cho, H. S. Lee, K. W. Lee and S. C. Bae (2010). "Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status." *Arthritis Rheum* **62**(2): 369-377.
- Bartok, B. and G. S. Firestein (2010). "Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis." *Immunol Rev* **233**(1): 233-255.
- Bayry, J., S. Siberil, F. Triebel, D. F. Tough and S. V. Kaveri (2007). "Rescuing CD4+CD25+ regulatory T-cell functions in rheumatoid arthritis by cytokine-targeted monoclonal antibody therapy." *Drug Discov Today* **12**(13-14): 548-552.
- Begovich, A. B., V. E. Carlton, L. A. Honigberg, S. J. Schrodi, A. P. Chokkalingam, H. C. Alexander, K. G. Ardlie, Q. Huang, A. M. Smith, J. M. Spoerke, M. T. Conn, M. Chang, S. Y. Chang, R. K. Saiki, J. J. Catanese, D. U. Leong, V. E. Garcia, L. B. McAllister, D. A. Jeffery, A. T. Lee, F. Batliwalla, E. Remmers, L. A. Criswell, M. F. Seldin, D. L. Kastner, C. I. Amos, J. J. Sninsky and P. K. Gregersen (2004). "A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis." *Am J Hum Genet* **75**(2): 330-337.
- Beriou, G., E. M. Bradshaw, E. Lozano, C. M. Costantino, W. D. Hastings, T. Orban, W. Elyaman, S. J. Houry, V. K. Kuchroo, C. Baecher-Allan and D. A. Hafler (2010). "TGF-beta induces IL-9 production from human Th17 cells." *J Immunol* **185**(1): 46-54.
- Berse, B., J. A. Hunt, R. J. Diegel, P. Morganelli, K. Yeo, F. Brown and R. A. Fava (1999). "Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts." *Clin Exp Immunol* **115**(1): 176-182.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." *Nature* **441**(7090): 235-238.
- Betts, B. C., E. T. St Angelo, M. Kennedy and J. W. Young (2011). "Anti-IL-6 receptor alpha (tocilizumab) does not inhibit human monocyte-derived dendritic cell maturation or alloreactive T-cell responses." *Blood*.
- Bira, Y., K. Tani, Y. Nishioka, J. Miyata, K. Sato, A. Hayashi, Y. Nakaya and S. Sone (2005). "Transforming growth factor beta stimulates rheumatoid synovial fibroblasts via the type II receptor." *Mod Rheumatol* **15**(2): 108-113.
- Blaney Davidson, E. N., E. L. Vitters, P. M. van der Kraan and W. B. van den Berg (2006). "Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation." *Ann Rheum Dis* **65**(11): 1414-1421.
- Brackertz, D., G. F. Mitchell and I. R. Mackay (1977). "Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice." *Arthritis Rheum* **20**(3): 841-850.

- Brandes, M. E., J. B. Allen, Y. Ogawa and S. M. Wahl (1991). "Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals." J Clin Invest **87**(3): 1108-1113.
- Brennan, F. M., D. Chantry, M. Turner, B. Foxwell, R. Maini and M. Feldmann (1990). "Detection of transforming growth factor-beta in rheumatoid arthritis synovial tissue: lack of effect on spontaneous cytokine production in joint cell cultures." Clin Exp Immunol **81**(2): 278-285.
- Brennan, F. M., M. Londei, A. M. Jackson, T. Hercend, M. B. Brenner, R. N. Maini and M. Feldmann (1988). "T cells expressing gamma delta chain receptors in rheumatoid arthritis." J Autoimmun **1**(4): 319-326.
- Brennan, F. M. and I. B. McInnes (2008). "Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis." J Clin Invest **118**(11): 3537-3545.
- Bresnihan, B. and P. P. Tak (1999). "Synovial tissue analysis in rheumatoid arthritis." Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol **13**(4): 645-659.
- Brizzolara, R., S. Soldano, P. Montagna, A. Sulli, B. Seriola, B. Villaggio, P. F. Triolo, P. Clerico, L. Felli, L. Molfetta and M. Cutolo (2011). "[CTLA4-Ig interferes and downregulates the proinflammatory activities of rheumatoid synovial macrophages in monoculture]." Reumatismo **63**(2): 80-85.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paeper, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler and F. Ramsdell (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Brustle, A., S. Heink, M. Huber, C. Rosenplanter, C. Stadelmann, P. Yu, E. Arpaia, T. W. Mak, T. Kamradt and M. Lohoff (2007). "The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4." Nat Immunol **8**(9): 958-966.
- Buckley, C. D., N. Amft, P. F. Bradfield, D. Pilling, E. Ross, F. Arenzana-Seisdedos, A. Amara, S. J. Curnow, J. M. Lord, D. Scheel-Toellner and M. Salmon (2000). "Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium." J Immunol **165**(6): 3423-3429.
- Cantaert, T., L. De Rycke, T. Bongartz, E. L. Matteson, P. P. Tak, A. P. Nicholas and D. Baeten (2006). "Citruinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient!" Arthritis Rheum **54**(11): 3381-3389.
- Carmona, L., J. Ballina, R. Gabriel and A. Laffon (2001). "The burden of musculoskeletal diseases in the general population of Spain: results from a national survey." Ann Rheum Dis **60**(11): 1040-1045.
- Carmona, L., V. Villaverde, C. Hernandez-Garcia, J. Ballina, R. Gabriel and A. Laffon (2002). "The prevalence of rheumatoid arthritis in the general population of Spain." Rheumatology (Oxford) **41**(1): 88-95.
- Castillo, J., C. Milani and D. Mendez-Allwood (2009). "Ofatumumab, a second-generation anti-CD20 monoclonal antibody, for the treatment of lymphoproliferative and autoimmune disorders." Expert Opin Investig Drugs **18**(4): 491-500.
- Chabaud, M., J. M. Durand, N. Buchs, F. Fossiez, G. Page, L. Frappart and P. Miossec (1999). "Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium." Arthritis Rheum **42**(5): 963-970.
- Chatham, W. W., R. Swaim, H. Frohsin, Jr., L. W. Heck, E. J. Miller and W. D. Blackburn, Jr. (1993). "Degradation of human articular cartilage by neutrophils in synovial fluid." Arthritis Rheum **36**(1): 51-58.

- Chen, R., E. A. Stahl, F. A. Kurreeman, P. K. Gregersen, K. A. Siminovitch, J. Worthington, L. Padyukov, S. Raychaudhuri and R. M. Plenge (2011). "Fine mapping the TAGAP risk locus in rheumatoid arthritis." Genes Immun **12**(4): 314-318.
- Chen, R. H., R. Ebner and R. Derynck (1993). "Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF-beta activities." Science **260**(5112): 1335-1338.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." J Exp Med **198**(12): 1875-1886.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler and H. L. Weiner (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science **265**(5176): 1237-1240.
- Chen, Z. and J. J. O'Shea (2008). "Regulation of IL-17 production in human lymphocytes." Cytokine **41**(2): 71-78.
- Chen, Z., C. M. Tato, L. Muul, A. Laurence and J. J. O'Shea (2007). "Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes." Arthritis Rheum **56**(9): 2936-2946.
- Cheon, H., S. J. Yu, D. H. Yoo, I. J. Chae, G. G. Song and J. Sohn (2002). "Increased expression of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF-beta1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals." Clin Exp Immunol **127**(3): 547-552.
- Cho, Y. G., M. L. Cho, S. Y. Min and H. Y. Kim (2007). "Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis." Autoimmun Rev **7**(1): 65-70.
- Choy, E. H., D. A. Isenberg, T. Garrod, S. Farrow, Y. Ioannou, H. Bird, N. Cheung, B. Williams, B. Hazleman, R. Price, K. Yoshizaki, N. Nishimoto, T. Kishimoto and G. S. Panayi (2002). "Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial." Arthritis Rheum **46**(12): 3143-3150.
- Christ, M., N. L. McCartney-Francis, A. B. Kulkarni, J. M. Ward, D. E. Mizel, C. L. Mackall, R. E. Gress, K. L. Hines, H. Tian, S. Karlsson and et al. (1994). "Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice." J Immunol **153**(5): 1936-1946.
- Chu, C. Q. and M. Londei (1996). "Induction of Th2 cytokines and control of collagen-induced arthritis by nondepleting anti-CD4 Abs." J Immunol **157**(6): 2685-2689.
- Chu, C. Q., Z. Song, L. Mayton, B. Wu and P. H. Wooley (2003). "IFN-gamma deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor Vbeta6 and Vbeta8 in arthritic joints." Ann Rheum Dis **62**(10): 983-990.
- Chung, Y., S. H. Chang, G. J. Martinez, X. O. Yang, R. Nurieva, H. S. Kang, L. Ma, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian and C. Dong (2009). "Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling." Immunity **30**(4): 576-587.
- Collison, L. W., G. M. Delgoffe, C. S. Guy, K. M. Vignali, V. Chaturvedi, D. Fairweather, A. R. Satoskar, K. C. Garcia, C. A. Hunter, C. G. Drake, P. J. Murray and D. A. Vignali (2012). "The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional." Nat Immunol **13**(3): 290-299.

- Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." *Nature* **450**(7169): 566-569.
- Cook-Mills, J. M. (2002). "VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species." *Mol Immunol* **39**(9): 499-508.
- Corthay, A., A. Johansson, M. Vestberg and R. Holmdahl (1999). "Collagen-induced arthritis development requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice." *Int Immunol* **11**(7): 1065-1073.
- Courtenay, J. S., M. J. Dallman, A. D. Dayan, A. Martin and B. Mosedale (1980). "Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice." *Nature* **283**(5748): 666-668.
- Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T. B. Strom, W. Elyaman, I. C. Ho, S. Khoury, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2008). "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells." *Nat Immunol* **9**(12): 1347-1355.
- Das, J., G. Ren, L. Zhang, A. I. Roberts, X. Zhao, A. L. Bothwell, L. Van Kaer, Y. Shi and G. Das (2009). "Transforming growth factor beta is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation." *J Exp Med* **206**(11): 2407-2416.
- De Blecourt, J. J. (1954). "Screening of the population for rheumatic diseases." *Ann Rheum Dis* **13**(4): 338-340.
- de Kleer, I. M., L. R. Wedderburn, L. S. Taams, A. Patel, H. Varsani, M. Klein, W. de Jager, G. Pugayung, F. Giannoni, G. Rijkers, S. Albani, W. Kuis and B. Prakken (2004). "CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis." *J Immunol* **172**(10): 6435-6443.
- Dechanet, J., J. Briolay, M. C. Rissoan, P. Chomarat, J. P. Galizzi, J. Banchereau and P. Miossec (1993). "IL-4 inhibits growth factor-stimulated rheumatoid synovioocyte proliferation by blocking the early phases of the cell cycle." *J Immunol* **151**(9): 4908-4917.
- del Rey, M. J., E. Izquierdo, S. Caja, A. Usategui, B. Santiago, M. Galindo and J. L. Pablos (2009). "Human inflammatory synovial fibroblasts induce enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis through a hypoxia-inducible transcription factor 1alpha/vascular endothelial growth factor-mediated pathway in immunodeficient mice." *Arthritis Rheum* **60**(10): 2926-2934.
- Del Rey, M. J., E. Izquierdo, A. Usategui, E. Gonzalo, F. J. Blanco, F. Acquadro and J. L. Pablos (2010). "The transcriptional response of normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to hypoxia." *Arthritis Rheum* **62**(12): 3584-3594.
- Denis, M. (1994). "Neutralization of transforming growth factor-beta 1 in a mouse model of immune-induced lung fibrosis." *Immunology* **82**(4): 584-590.
- Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." *Nature* **425**(6958): 577-584.
- Dickson, M. C., J. S. Martin, F. M. Cousins, A. B. Kulkarni, S. Karlsson and R. J. Akhurst (1995). "Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice." *Development* **121**(6): 1845-1854.

- Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger and G. Schuler (2001). "Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood." *J Exp Med* **193**(11): 1303-1310.
- Dorner, T. and G. R. Burmester (2003). "The role of B cells in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic targets." *Curr Opin Rheumatol* **15**(3): 246-252.
- Dotor, J., A. B. Lopez-Vazquez, J. J. Lasarte, P. Sarobe, M. Garcia-Granero, J. I. Riezu-Boj, A. Martinez, E. Feijoo, J. Lopez-Sagaseta, J. Hermida, J. Prieto and F. Borrás-Cuesta (2007). "Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library." *Cytokine* **39**(2): 106-115.
- Drynda, A., P. H. Quax, M. Neumann, W. H. van der Laan, G. Pap, S. Drynda, I. Meinecke, J. Kekow, W. Neumann, T. W. Huizinga, M. Naumann, W. Konig and T. Pap (2005). "Gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 reverses the inhibitory effects of TNF-alpha on Fas-induced apoptosis in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." *J Immunol* **174**(10): 6524-6531.
- Ehinger, M., M. Vestberg, A. C. Johansson, M. Johannesson, A. Svensson and R. Holmdahl (2001). "Influence of CD4 or CD8 deficiency on collagen-induced arthritis." *Immunology* **103**(3): 291-300.
- Ehrenstein, M. R., J. G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D. A. Isenberg and C. Mauri (2004). "Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy." *J Exp Med* **200**(3): 277-285.
- Eljaafari, A., M. L. Tartelin, H. Aissaoui, G. Chevrel, B. Osta, F. Lavocat and P. Miossec (2012). "Bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal cells promote Th17 cell expansion and activation through caspase 1 activation: Contribution to the chronicity of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **64**(7): 2147-2157.
- Ezquerro, I. J., J. J. Lasarte, J. Dotor, I. Castilla-Cortazar, M. Bustos, I. Penuelas, G. Blanco, C. Rodriguez, C. Lechuga Mdel, P. Greenwel, M. Rojkind, J. Prieto and F. Borrás-Cuesta (2003). "A synthetic peptide from transforming growth factor beta type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury." *Cytokine* **22**(1-2): 12-20.
- Fantini, M. C., C. Becker, G. Monteleone, F. Pallone, P. R. Galle and M. F. Neurath (2004). "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25-T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7." *J Immunol* **172**(9): 5149-5153.
- Fava, R. A., N. J. Olsen, A. E. Postlethwaite, K. N. Broadley, J. M. Davidson, L. B. Nanney, C. Lucas and A. S. Townes (1991). "Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia." *J Exp Med* **173**(5): 1121-1132.
- Firestein, G. S. (2003). "Evolving concepts of rheumatoid arthritis." *Nature* **423**(6937): 356-361.
- Fontenot, J. D., J. L. Dooley, A. G. Farr and A. Y. Rudensky (2005). "Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny." *J Exp Med* **202**(7): 901-906.
- Forlow, S. B., J. R. Schurr, J. K. Kolls, G. J. Bagby, P. O. Schwarzenberger and K. Ley (2001). "Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice." *Blood* **98**(12): 3309-3314.
- Fort, M. M., J. Cheung, D. Yen, J. Li, S. M. Zurawski, S. Lo, S. Menon, T. Clifford, B. Hunte, R. Lesley, T. Muchamuel, S. D. Hurst, G. Zurawski, M. W. Leach, D. M.

- Gorman and D. M. Rennick (2001). "IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo." *Immunity* **15**(6): 985-995.
- Franz, J. K., T. Pap, K. M. Hummel, M. Nawrath, W. K. Aicher, Y. Shigeyama, U. Muller-Ladner, R. E. Gay and S. Gay (2000). "Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **43**(3): 599-607.
- Frey, O., P. K. Petrow, M. Gajda, K. Siegmund, J. Huehn, A. Scheffold, A. Hamann, A. Radbruch and R. Brauer (2005). "The role of regulatory T cells in antigen-induced arthritis: aggravation of arthritis after depletion and amelioration after transfer of CD4+CD25+ T cells." *Arthritis Res Ther* **7**(2): R291-301.
- Fugger, L., J. B. Rothbard and G. Sonderstrup-McDevitt (1996). "Specificity of an HLA-DRB1\*0401-restricted T cell response to type II collagen." *Eur J Immunol* **26**(4): 928-933.
- Getnet, D., J. F. Grosso, M. V. Goldberg, T. J. Harris, H. R. Yen, T. C. Bruno, N. M. Durham, E. L. Hipkiss, K. J. Pyle, S. Wada, F. Pan, D. M. Pardoll and C. G. Drake (2010). "A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells." *Mol Immunol* **47**(7-8): 1595-1600.
- Ghoreschi, K., A. Laurence, X. P. Yang, C. M. Tato, M. J. McGeachy, J. E. Konkel, H. L. Ramos, L. Wei, T. S. Davidson, N. Bouladoux, J. R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W. T. Watford, H. W. Sun, G. Eberl, E. M. Shevach, Y. Belkaid, D. J. Cua, W. Chen and J. J. O'Shea (2010). "Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling." *Nature* **467**(7318): 967-971.
- Gil-Guerrero, L., J. Dotor, I. L. Huibregtse, N. Casares, A. B. Lopez-Vazquez, F. Rudilla, J. I. Riezu-Boj, J. Lopez-Sagaseta, J. Hermida, S. Van Deventer, J. Bezunarte, D. Llopiz, P. Sarobe, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta and J. J. Lasarte (2008). "In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1." *J Immunol* **181**(1): 126-135.
- Gorelik, L. and R. A. Flavell (2000). "Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease." *Immunity* **12**(2): 171-181.
- Gregersen, P. K., H. S. Lee, F. Batliwalla and A. B. Begovich (2006). "PTPN22: setting thresholds for autoimmunity." *Semin Immunol* **18**(4): 214-223.
- Gregersen, P. K., J. Silver and R. J. Winchester (1987). "The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **30**(11): 1205-1213.
- Happel, K. I., P. J. Dubin, M. Zheng, N. Ghilardi, C. Lockhart, L. J. Quinton, A. R. Odden, J. E. Shellito, G. J. Bagby, S. Nelson and J. K. Kolls (2005). "Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*." *J Exp Med* **202**(6): 761-769.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-1132.
- Haynes, D. R., T. N. Crotti, M. Loric, G. I. Bain, G. J. Atkins and D. M. Findlay (2001). "Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint." *Rheumatology (Oxford)* **40**(6): 623-630.
- Helder, A. E., T. M. Feltkamp-Vroom and R. L. Nienhuis (1973). "Electron and light microscopical observations and serological findings in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **32**(6): 515-523.

- Heldin, C. H., K. Miyazono and P. ten Dijke (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins." Nature **390**(6659): 465-471.
- Herman, S., N. Zurgil, S. Machlav, A. Shinberg, P. Langevitz, M. Ehrenfeld and M. Deutsch (2011). "Distinct effects of anti-tumor necrosis factor combined therapy on TH1/TH2 balance in rheumatoid arthritis patients." Clin Vaccine Immunol **18**(7): 1077-1082.
- Hinz, S., L. Pagerols-Raluy, H. H. Oberg, O. Ammerpohl, S. Grussel, B. Sipos, R. Grutzmann, C. Pilarsky, H. Ungefroren, H. D. Saeger, G. Kloppel, D. Kabelitz and H. Kalthoff (2007). "Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer." Cancer Res **67**(17): 8344-8350.
- Hirano, T., T. Matsuda, M. Turner, N. Miyasaka, G. Buchan, B. Tang, K. Sato, M. Shimizu, R. Maini, M. Feldmann and et al. (1988). "Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis." Eur J Immunol **18**(11): 1797-1801.
- Hirschi, K. K. and P. A. D'Amore (1996). "Pericytes in the microvasculature." Cardiovasc Res **32**(4): 687-698.
- Horai, R., S. Saijo, H. Tanioka, S. Nakae, K. Sudo, A. Okahara, T. Ikuse, M. Asano and Y. Iwakura (2000). "Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice." J Exp Med **191**(2): 313-320.
- Houssiau, F. A., J. P. Devogelaer, J. Van Damme, C. N. de Deuxchaisnes and J. Van Snick (1988). "Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides." Arthritis Rheum **31**(6): 784-788.
- Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra and K. M. Murphy (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." Science **260**(5107): 547-549.
- Hu, D. E., Y. Hori, M. Presta, G. A. Gresham and T. P. Fan (1994). "Inhibition of angiogenesis in rats by IL-1 receptor antagonist and selected cytokine antibodies." Inflammation **18**(1): 45-58.
- Huang, W., L. Na, P. L. Fidel and P. Schwarzenberger (2004). "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-Candida albicans host defense in mice." J Infect Dis **190**(3): 624-631.
- Huber, L. C., O. Distler, I. Tarnier, R. E. Gay, S. Gay and T. Pap (2006). "Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **45**(6): 669-675.
- Huber, M., S. Heink, H. Grothe, A. Guralnik, K. Reinhard, K. Elflein, T. Hunig, H. W. Mittrucker, A. Brustle, T. Kamradt and M. Lohoff (2009). "A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity." Eur J Immunol **39**(7): 1716-1725.
- Iguchi, T. and M. Ziff (1986). "Electron microscopic study of rheumatoid synovial vasculature. Intimate relationship between tall endothelium and lymphoid aggregation." J Clin Invest **77**(2): 355-361.
- Inglis, J. J., G. Criado, M. Medghalchi, M. Andrews, A. Sandison, M. Feldmann and R. O. Williams (2007). "Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen." Arthritis Res Ther **9**(5): R113.
- Ito, Y., T. Usui, S. Kobayashi, M. Iguchi-Hashimoto, H. Ito, H. Yoshitomi, T. Nakamura, M. Shimizu, D. Kawabata, N. Yukawa, M. Hashimoto, N. Sakaguchi, S. Sakaguchi, H. Yoshifuji, T. Nojima, K. Ohmura, T. Fujii and T.

- Mimori (2009). "Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **60**(8): 2294-2303.
- Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells." *Cell* **126**(6): 1121-1133.
- Izquierdo, E., J. D. Canete, R. Celis, B. Santiago, A. Usategui, R. Sanmarti, M. J. Del Rey and J. L. Pablos (2009). "Immature blood vessels in rheumatoid synovium are selectively depleted in response to anti-TNF therapy." *PLoS One* **4**(12): e8131.
- Jacobson, N. G., S. J. Szabo, R. M. Weber-Nordt, Z. Zhong, R. D. Schreiber, J. E. Darnell, Jr. and K. M. Murphy (1995). "Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4." *J Exp Med* **181**(5): 1755-1762.
- Jager, A., V. Dardalhon, R. A. Sobel, E. Bettelli and V. K. Kuchroo (2009). "Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes." *J Immunol* **183**(11): 7169-7177.
- Jawaheer, D., W. Thomson, A. J. MacGregor, D. Carthy, J. Davidson, P. A. Dyer, A. J. Silman and W. E. Ollier (1994). "'Homozygosity' for the HLA-DR shared epitope contributes the highest risk for rheumatoid arthritis concordance in identical twins." *Arthritis Rheum* **37**(5): 681-686.
- Johansson, M., L. Arlestig, G. Hallmans and S. Rantapaa-Dahlqvist (2006). "PTPN22 polymorphism and anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in combination strongly predicts future onset of rheumatoid arthritis and has a specificity of 100% for the disease." *Arthritis Res Ther* **8**(1): R19.
- Joosten, L. A., M. M. Helsen, T. Saxne, F. A. van De Loo, D. Heinegard and W. B. van Den Berg (1999). "IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation." *J Immunol* **163**(9): 5049-5055.
- Jorgensen, C., I. Couret, F. Canovas, C. Bologna, J. Brochier, T. Reme, P. Lipsky and J. Sany (1996). "Mononuclear cell retention in rheumatoid synovial tissue engrafted in severe combined immunodeficient (SCID) mice is up-regulated by tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and mediated through intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)." *Clin Exp Immunol* **106**(1): 20-25.
- Kadowaki, K. M., H. Matsuno, H. Tsuji and I. Tunru (1994). "CD4<sup>+</sup> T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice." *Clin Exp Immunol* **97**(2): 212-218.
- Kai, H., K. Shibuya, Y. Wang, H. Kameta, T. Kameyama, S. Tahara-Hanaoka, A. Miyamoto, S. Honda, I. Matsumoto, A. Koyama, T. Sumida and A. Shibuya (2006). "Critical role of M. tuberculosis for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice." *Immunology* **118**(2): 233-239.
- Kalla, A. A. and M. Tikly (2003). "Rheumatoid arthritis in the developing world." *Best Pract Res Clin Rheumatol* **17**(5): 863-875.
- Kasperkovitz, P. V., T. C. Timmer, T. J. Smeets, N. L. Verbeet, P. P. Tak, L. G. van Baarsen, B. Baltus, T. W. Huizinga, E. Pieterman, M. Fero, G. S. Firestein, T. C. van der Pouw Kraan and C. L. Verweij (2005). "Fibroblast-like synoviocytes derived from patients with rheumatoid arthritis show the imprint of synovial

- tissue heterogeneity: evidence of a link between an increased myofibroblast-like phenotype and high-inflammation synovitis." Arthritis Rheum **52**(2): 430-441.
- Kawakami, A., S. Urayama, S. Yamasaki, A. Hida, T. Miyashita, M. Kamachi, K. Nakashima, F. Tanaka, H. Ida, Y. Kawabe, T. Aoyagi, I. Furuichi, K. Migita, T. Origuchi and K. Eguchi (2004). "Anti-apoptogenic function of TGFbeta1 for human synovial cells: TGFbeta1 protects cultured synovial cells from mitochondrial perturbation induced by several apoptogenic stimuli." Ann Rheum Dis **63**(1): 95-97.
- Kehrl, J. H., L. M. Wakefield, A. B. Roberts, S. Jakowlew, M. Alvarez-Mon, R. Derynck, M. B. Sporn and A. S. Fauci (1986). "Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth." J Exp Med **163**(5): 1037-1050.
- Kennedy, A., U. Fearon, D. J. Veale and C. Godson (2011). "Macrophages in synovial inflammation." Front Immunol **2**: 52.
- Kim, G., J. B. Jun and K. B. Elkon (2002). "Necessary role of phosphatidylinositol 3-kinase in transforming growth factor beta-mediated activation of Akt in normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." Arthritis Rheum **46**(6): 1504-1511.
- Kim, H. Y., W. U. Kim, M. L. Cho, S. K. Lee, J. Youn, S. I. Kim, W. H. Yoo, J. H. Park, J. K. Min, S. H. Lee, S. H. Park and C. S. Cho (1999). "Enhanced T cell proliferative response to type II collagen and synthetic peptide CII (255-274) in patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **42**(10): 2085-2093.
- Kim, W. U., W. H. Yoo, W. Park, Y. M. Kang, S. I. Kim, J. H. Park, S. S. Lee, Y. S. Joo, J. K. Min, Y. S. Hong, S. H. Lee, S. H. Park, C. S. Cho and H. Y. Kim (2000). "IgG antibodies to type II collagen reflect inflammatory activity in patients with rheumatoid arthritis." J Rheumatol **27**(3): 575-581.
- Kimura, A., T. Naka and T. Kishimoto (2007). "IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(29): 12099-12104.
- Klareskog, L. and T. Olsson (1990). "Autoimmunity to collagen II and myelin basic protein: comparative studies in humans and rodents." Immunol Rev **118**: 285-310.
- Klareskog, L., J. Ronnelid, K. Lundberg, L. Padyukov and L. Alfredsson (2008). "Immunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis." Annu Rev Immunol **26**: 651-675.
- Knudsen, L. S., M. Klarlund, H. Skjodt, T. Jensen, M. Ostergaard, K. E. Jensen, M. S. Hansen, M. L. Hetland, H. J. Nielsen and J. S. Johansen (2008). "Biomarkers of inflammation in patients with unclassified polyarthritis and early rheumatoid arthritis. Relationship to disease activity and radiographic outcome." J Rheumatol **35**(7): 1277-1287.
- Ko, H. J., M. L. Cho, S. Y. Lee, H. J. Oh, Y. J. Heo, Y. M. Moon, C. M. Kang, S. K. Kwok, J. H. Ju, S. H. Park, K. S. Park and H. Y. Kim (2010). "CTLA4-Ig modifies dendritic cells from mice with collagen-induced arthritis to increase the CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population." J Autoimmun **34**(2): 111-120.
- Kobayashi, H., S. Ohshima, K. Nishioka, N. Yamaguchi, M. Umeshita-Sasai, T. Ishii, T. Mima, T. Kishimoto, I. Kawase and Y. Saeki (2002). "Antigen induced arthritis (AIA) can be transferred by bone marrow transplantation: evidence that interleukin 6 is essential for induction of AIA." J Rheumatol **29**(6): 1176-1182.

- Koch, A. E. (1998). "Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **41**(6): 951-962.
- Koenders, M. I., L. A. Joosten and W. B. van den Berg (2006). "Potential new targets in arthritis therapy: interleukin (IL)-17 and its relation to tumour necrosis factor and IL-1 in experimental arthritis." Ann Rheum Dis **65** Suppl 3: iii29-33.
- Kondo, Y., M. Iizuka, E. Wakamatsu, Z. Yao, M. Tahara, H. Tsuboi, M. Sugihara, T. Hayashi, K. Yoh, S. Takahashi, I. Matsumoto and T. Sumida (2012). "Overexpression of T-bet gene regulates murine autoimmune arthritis." Arthritis Rheum **64**(1): 162-172.
- Kondou, H., S. Mushiake, Y. Etani, Y. Miyoshi, T. Michigami and K. Ozono (2003). "A blocking peptide for transforming growth factor-beta1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo." J Hepatol **39**(5): 742-748.
- Korn, T., E. Bettelli, W. Gao, A. Awasthi, A. Jager, T. B. Strom, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2007). "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." Nature **448**(7152): 484-487.
- Kotake, S., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Matsuzaki, K. Itoh, S. Ishiyama, S. Saito, K. Inoue, N. Kamatani, M. T. Gillespie, T. J. Martin and T. Suda (1999). "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis." J Clin Invest **103**(9): 1345-1352.
- Kowal-Bielecka, O., R. Mroz, K. Bernacka, E. Kowal and S. Sierakowski (2001). "gamma delta-Lymphocytes in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis--correlation with clinical and laboratory parameters of the disease and with the treatment used." Rocz Akad Med Bialymst **46**: 170-181.
- Kremer, J. M., R. Westhovens, M. Leon, E. Di Giorgio, R. Alten, S. Steinfeld, A. Russell, M. Dougados, P. Emery, I. F. Nuamah, G. R. Williams, J. C. Becker, D. T. Hagerty and L. W. Moreland (2003). "Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig." N Engl J Med **349**(20): 1907-1915.
- Kulkarni, A. B., C. G. Huh, D. Becker, A. Geiser, M. Lyght, K. C. Flanders, A. B. Roberts, M. B. Sporn, J. M. Ward and S. Karlsson (1993). "Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 770-774.
- Kulkarni, A. B. and S. Karlsson (1993). "Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease." Am J Pathol **143**(1): 3-9.
- Kulkarni, A. B., J. M. Ward, L. Yaswen, C. L. Mackall, S. R. Bauer, C. G. Huh, R. E. Gress and S. Karlsson (1995). "Transforming growth factor-beta 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders." Am J Pathol **146**(1): 264-275.
- Kurowska, M., W. Rudnicka, E. Kontny, I. Janicka, M. Chorazy, J. Kowalczewski, M. Ziolkowska, S. Ferrari-Lacraz, T. B. Strom and W. Maslinski (2002). "Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2." J Immunol **169**(4): 1760-1767.
- Kuruvilla, A. P., R. Shah, G. M. Hochwald, H. D. Liggitt, M. A. Palladino and G. J. Thorbecke (1991). "Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(7): 2918-2921.
- Kwoh, C. K. (1992). "Epidemiology of the rheumatic diseases." Curr Opin Rheumatol **4**(2): 138-144.

- Lam, J., S. Takeshita, J. E. Barker, O. Kanagawa, F. P. Ross and S. L. Teitelbaum (2000). "TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand." J Clin Invest **106**(12): 1481-1488.
- Leavenworth, J. W., X. Wang, C. S. Wenander, P. Spee and H. Cantor (2011). "Mobilization of natural killer cells inhibits development of collagen-induced arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(35): 14584-14589.
- Lee, A. T., W. Li, A. Liew, C. Bombardier, M. Weisman, E. M. Massarotti, J. Kent, F. Wolfe, A. B. Begovich and P. K. Gregersen (2005). "The PTPN22 R620W polymorphism associates with RF positive rheumatoid arthritis in a dose-dependent manner but not with HLA-SE status." Genes Immun **6**(2): 129-133.
- Lee, Y., A. Awasthi, N. Yosef, F. J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D. A. Hafler, R. A. Sobel, A. Regev and V. K. Kuchroo (2012). "Induction and molecular signature of pathogenic T(H)17 cells." Nat Immunol **13**(10): 991-999.
- Lefevre, S., A. Knedla, C. Tennie, A. Kampmann, C. Wunrau, R. Dinser, A. Korb, E. M. Schnaker, I. H. Tarner, P. D. Robbins, C. H. Evans, H. Sturz, J. Steinmeyer, S. Gay, J. Scholmerich, T. Pap, U. Muller-Ladner and E. Neumann (2009). "Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints." Nat Med **15**(12): 1414-1420.
- Leibovich, S. J., P. J. Polverini, H. M. Shepard, D. M. Wiseman, V. Shively and N. Nuseir (1987). "Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha." Nature **329**(6140): 630-632.
- Leipe, J., A. Skapenko, P. E. Lipsky and H. Schulze-Koops (2005). "Regulatory T cells in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **7**(3): 93.
- Leonard, W. J. and R. Spolski (2005). "Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation." Nat Rev Immunol **5**(9): 688-698.
- Letterio, J. J. and A. B. Roberts (1998). "Regulation of immune responses by TGF-beta." Annu Rev Immunol **16**: 137-161.
- Lexberg, M. H., A. Taubner, I. Albrecht, I. Lepenies, A. Richter, T. Kamradt, A. Radbruch and H. D. Chang (2010). "IFN-gamma and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells." Eur J Immunol **40**(11): 3017-3027.
- Li, H., S. Hong, J. Qian, Y. Zheng, J. Yang and Q. Yi (2010). "Cross talk between the bone and immune systems: osteoclasts function as antigen-presenting cells and activate CD4+ and CD8+ T cells." Blood **116**(2): 210-217.
- Lina, C., W. Conghua, L. Nan and Z. Ping (2011). "Combined Treatment of Etanercept and MTX Reverses Th1/Th2, Th17/Treg Imbalance in Patients with Rheumatoid Arthritis." J Clin Immunol.
- Liu, W., A. L. Putnam, Z. Xu-Yu, G. L. Szot, M. R. Lee, S. Zhu, P. A. Gottlieb, P. Kapranov, T. R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D. M. Soper, S. F. Ziegler and J. A. Bluestone (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med **203**(7): 1701-1711.
- Liu, Y., P. Zhang, J. Li, A. B. Kulkarni, S. Perruche and W. Chen (2008). "A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells." Nat Immunol **9**(6): 632-640.
- Lubberts, E., M. I. Koenders, B. Oppers-Walgreen, L. van den Bersselaar, C. J. Coenende Roo, L. A. Joosten and W. B. van den Berg (2004). "Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-

- induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion." *Arthritis Rheum* **50**(2): 650-659.
- Lubberts, E., L. van den Bersselaar, B. Oppers-Walgreen, P. Schwarzenberger, C. J. Coenen-de Roo, J. K. Kolls, L. A. Joosten and W. B. van den Berg (2003). "IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance." *J Immunol* **170**(5): 2655-2662.
- Lundstrom, E., H. Kallberg, L. Alfredsson, L. Klareskog and L. Padyukov (2009). "Gene-environment interaction between the DRB1 shared epitope and smoking in the risk of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: all alleles are important." *Arthritis Rheum* **60**(6): 1597-1603.
- Luross, J. A. and N. A. Williams (2001). "The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis." *Immunology* **103**(4): 407-416.
- Lydyard, P. M., G. Tsoulfa, M. Sharif, B. Broker, M. Smith and G. A. Rook (1990). "Immunity to heat shock proteins in rheumatoid arthritis." *Clin Exp Rheumatol* **8 Suppl 5**: 69-74.
- Madhok, R., A. Crilly, J. Watson and H. A. Capell (1993). "Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity." *Ann Rheum Dis* **52**(3): 232-234.
- Manetti, R., F. Gerosa, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, P. Parronchi, M. P. Piccinni, S. Sampognaro, E. Maggi, S. Romagnani, G. Trinchieri and et al. (1994). "Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones." *J Exp Med* **179**(4): 1273-1283.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb and C. T. Weaver (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." *Nature* **441**(7090): 231-234.
- Mantel, P. Y., H. Kuipers, O. Boyman, C. Rhyner, N. Ouaked, B. Ruckert, C. Karagiannidis, B. N. Lambrecht, R. W. Hendriks, R. Crameri, C. A. Akdis, K. Blaser and C. B. Schmidt-Weber (2007). "GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells." *PLoS Biol* **5**(12): e329.
- Mantel, P. Y. and C. B. Schmidt-Weber (2011). "Transforming growth factor-beta: recent advances on its role in immune tolerance." *Methods Mol Biol* **677**: 303-338.
- Marie, J. C., J. J. Letterio, M. Gavin and A. Y. Rudensky (2005). "TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Exp Med* **201**(7): 1061-1067.
- Marinova-Mutafchieva, L., C. Gabay, K. Funa and R. O. Williams (2006). "Remission of collagen-induced arthritis is associated with high levels of transforming growth factor-beta expression in the joint." *Clin Exp Immunol* **146**(2): 287-293.
- Martin, B., K. Hirota, D. J. Cua, B. Stockinger and M. Veldhoen (2009). "Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals." *Immunity* **31**(2): 321-330.
- Massague, J. (1990). "The transforming growth factor-beta family." *Annu Rev Cell Biol* **6**: 597-641.
- Massague, J. (1998). "TGF-beta signal transduction." *Annu Rev Biochem* **67**: 753-791.

- Mathur, A. N., H. C. Chang, D. G. Zisoulis, G. L. Stritesky, Q. Yu, J. T. O'Malley, R. Kapur, D. E. Levy, G. S. Kansas and M. H. Kaplan (2007). "Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells." *J Immunol* **178**(8): 4901-4907.
- Mauri, C., C. Q. Chu, D. Woodrow, L. Mori and M. Londei (1997). "Treatment of a newly established transgenic model of chronic arthritis with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody." *J Immunol* **159**(10): 5032-5041.
- McCartney-Francis, N. L., M. Frazier-Jessen and S. M. Wahl (1998). "TGF-beta: a balancing act." *Int Rev Immunol* **16**(5-6): 553-580.
- McCormick, L. L., Y. Zhang, E. Tootell and A. C. Gilliam (1999). "Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma." *J Immunol* **163**(10): 5693-5699.
- McDaniel DO, A. G., Pratt PW, Reveille JD. and (1995). "Most African-American patients with rheumatoid arthritis do not have the rheumatoid antigenic determinant (epitope)." *Ann Intern Med.* **123**(3): 181-187.
- McGeachy, M. J., Y. Chen, C. M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W. M. Blumenschein, T. K. McClanahan, J. J. O'Shea and D. J. Cua (2009). "The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo." *Nat Immunol* **10**(3): 314-324.
- McInnes, I. B. (2003). "Leukotrienes, mast cells, and T cells." *Arthritis Res Ther* **5**(6): 288-289.
- McInnes, I. B., J. al-Mughales, M. Field, B. P. Leung, F. P. Huang, R. Dixon, R. D. Sturrock, P. C. Wilkinson and F. Y. Liew (1996). "The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis." *Nat Med* **2**(2): 175-182.
- McIntyre, K. W., D. J. Shuster, K. M. Gillooly, R. R. Warriar, S. E. Connaughton, L. B. Hall, L. H. Arp, M. K. Gately and J. Magram (1996). "Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice." *Eur J Immunol* **26**(12): 2933-2938.
- McKnight, A. J., G. J. Zimmer, I. Fogelman, S. F. Wolf and A. K. Abbas (1994). "Effects of IL-12 on helper T cell-dependent immune responses in vivo." *J Immunol* **152**(5): 2172-2179.
- Mehta, D. S., A. L. Wurster and M. J. Grusby (2004). "Biology of IL-21 and the IL-21 receptor." *Immunol Rev* **202**: 84-95.
- Migita, K., K. Eguchi, Y. Kawabe, Y. Ichinose, T. Tsukada, T. Aoyagi, H. Nakamura and S. Nagataki (1996). "TNF-alpha-mediated expression of membrane-type matrix metalloproteinase in rheumatoid synovial fibroblasts." *Immunology* **89**(4): 553-557.
- Monach, P. A., C. Benoist and D. Mathis (2004). "The role of antibodies in mouse models of rheumatoid arthritis, and relevance to human disease." *Adv Immunol* **82**: 217-248.
- Monteleone, G., A. Kumberova, N. M. Croft, C. McKenzie, H. W. Steer and T. T. MacDonald (2001). "Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease." *J Clin Invest* **108**(4): 601-609.
- Mor, A., S. B. Abramson and M. H. Pillinger (2005). "The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction." *Clin Immunol* **115**(2): 118-128.
- Morel, J., R. Audo, M. Hahne and B. Combe (2005). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt." *J Biol Chem* **280**(16): 15709-15718.

- Morgan, M. E., R. P. Suttmuller, H. J. Witteveen, L. M. van Duivenvoorde, E. Zanelli, C. J. Melief, A. Snijders, R. Offringa, R. R. de Vries and R. E. Toes (2003). "CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis." *Arthritis Rheum* **48**(5): 1452-1460.
- Moses, H. L., R. J. Coffey, Jr., E. B. Leof, R. M. Lyons and J. Keski-Oja (1987). "Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation." *J Cell Physiol Suppl* **Suppl 5**: 1-7.
- Moses, M. A. (1997). "The regulation of neovascularization of matrix metalloproteinases and their inhibitors." *Stem Cells* **15**(3): 180-189.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* **7**: 145-173.
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* **136**(7): 2348-2357.
- Moustakas, A., K. Pardali, A. Gaal and C. H. Heldin (2002). "Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation." *Immunol Lett* **82**(1-2): 85-91.
- Muller-Ladner, U., R. E. Gay and S. Gay (1998). "Retroviral sequences in rheumatoid arthritis synovium." *Int Rev Immunol* **17**(5-6): 273-290.
- Muller-Ladner, U., J. Kriegsmann, B. N. Franklin, S. Matsumoto, T. Geiler, R. E. Gay and S. Gay (1996). "Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice." *Am J Pathol* **149**(5): 1607-1615.
- Murphy, C. A., C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick and D. J. Cua (2003). "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation." *J Exp Med* **198**(12): 1951-1957.
- Nadkarni, S., C. Mauri and M. R. Ehrenstein (2007). "Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta." *J Exp Med* **204**(1): 33-39.
- Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo and Y. Iwakura (2003). "Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice." *J Immunol* **171**(11): 6173-6177.
- Nakamura, K., A. Kitani and W. Strober (2001). "Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta." *J Exp Med* **194**(5): 629-644.
- Nandakumar, K. S., L. Svensson and R. Holmdahl (2003). "Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes." *Am J Pathol* **163**(5): 1827-1837.
- Nanki, T., K. Hayashida, H. S. El-Gabalawy, S. Suson, K. Shi, H. J. Girschick, S. Yavuz and P. E. Lipsky (2000). "Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium." *J Immunol* **165**(11): 6590-6598.
- Niedbala, W., B. Cai, X. Wei, A. Patakas, B. P. Leung, I. B. McInnes and F. Y. Liew (2008). "Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis." *Ann Rheum Dis* **67**(10): 1474-1479.
- Nurieva, R., X. O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A. D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S. S. Watowich, A. M. Jetten and C. Dong (2007). "Essential autocrine

- regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells." *Nature* **448**(7152): 480-483.
- Ohata, J., T. Miura, T. A. Johnson, S. Hori, S. F. Ziegler and H. Kohsaka (2007). "Enhanced efficacy of regulatory T cell transfer against increasing resistance, by elevated Foxp3 expression induced in arthritic murine hosts." *Arthritis Rheum* **56**(9): 2947-2956.
- Ohshima, S., Y. Saeki, T. Mima, M. Sasai, K. Nishioka, S. Nomura, M. Kopf, Y. Katada, T. Tanaka, M. Suemura and T. Kishimoto (1998). "Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8222-8226.
- Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan and R. A. Kastelein (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." *Immunity* **13**(5): 715-725.
- Orozco, G., B. Z. Alizadeh, A. M. Delgado-Vega, M. A. Gonzalez-Gay, A. Balsa, D. Pascual-Salcedo, B. Fernandez-Gutierrez, M. F. Gonzalez-Escribano, I. F. Petersson, P. L. van Riel, P. Barrera, M. J. Coenen, T. R. Radstake, M. A. van Leeuwen, C. Wijmenga, B. P. Koeleman, M. Alarcon-Riquelme and J. Martin (2008). "Association of STAT4 with rheumatoid arthritis: a replication study in three European populations." *Arthritis Rheum* **58**(7): 1974-1980.
- Orozco, G., E. Sanchez, M. A. Gonzalez-Gay, M. A. Lopez-Nevot, B. Torres, R. Caliz, N. Ortego-Centeno, J. Jimenez-Alonso, D. Pascual-Salcedo, A. Balsa, R. de Pablo, A. Nunez-Roldan, M. F. Gonzalez-Escribano and J. Martin (2005). "Association of a functional single-nucleotide polymorphism of PTPN22, encoding lymphoid protein phosphatase, with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* **52**(1): 219-224.
- Ouyang, W., O. Beckett, Q. Ma and M. O. Li (2010). "Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development." *Immunity* **32**(5): 642-653.
- Pablos, J. L., B. Santiago, M. Galindo, C. Torres, M. T. Brehmer, F. J. Blanco and F. J. Garcia-Lazaro (2003). "Synovioyte-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis." *J Immunol* **170**(4): 2147-2152.
- Palao, G., B. Santiago, M. Galindo, M. Paya, J. C. Ramirez and J. L. Pablos (2004). "Down-regulation of FLIP sensitizes rheumatoid synovial fibroblasts to Fas-mediated apoptosis." *Arthritis Rheum* **50**(9): 2803-2810.
- Pap, T., U. Muller-Ladner, R. E. Gay and S. Gay (2000). "Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res* **2**(5): 361-367.
- Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian and C. Dong (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nat Immunol* **6**(11): 1133-1141.
- Park, M. J., H. S. Park, M. L. Cho, H. J. Oh, Y. G. Cho, S. Y. Min, B. H. Chung, J. W. Lee, H. Y. Kim and S. G. Cho (2011). "Transforming growth factor beta-transduced mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Treg/Th17 cells and osteoclastogenesis." *Arthritis Rheum* **63**(6): 1668-1680.

- Patel, D. D. and B. F. Haynes (2001). "Leukocyte homing to synovium." Curr Dir Autoimmun **3**: 133-167.
- Patel, D. D., J. P. Zachariah and L. P. Whichard (2001). "CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium." Clin Immunol **98**(1): 39-45.
- Petersen, J., C. Heilmann, O. J. Bjerrum, T. Ingemann-Hansen and J. Halkjaer-Kristensen (1983). "IgG rheumatoid factor-secreting lymphocytes in rheumatoid arthritis: evaluation of a haemolytic plaque-forming cell technique." Scand J Immunol **17**(5): 471-478.
- Philipp, K., F. Riedel, G. Germann, K. Hormann and M. Sauerbier (2005). "TGF-beta antisense oligonucleotides reduce mRNA expression of matrix metalloproteinases in cultured wound-healing-related cells." Int J Mol Med **15**(2): 299-303.
- Pickens, S. R., N. D. Chamberlain, M. V. Volin, A. M. Mandelin, 2nd, H. Agrawal, M. Matsui, T. Yoshimoto and S. Shahrara (2011). "Local expression of interleukin-27 ameliorates collagen-induced arthritis." Arthritis Rheum **63**(8): 2289-2298.
- Piek, E., C. H. Heldin and P. Ten Dijke (1999). "Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling." FASEB J **13**(15): 2105-2124.
- Pohlers, D., A. Beyer, D. Koczan, T. Wilhelm, H. J. Thiesen and R. W. Kinne (2007). "Constitutive upregulation of the transforming growth factor-beta pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts." Arthritis Res Ther **9**(3): R59.
- Pollinger, B., T. Junt, B. Metzler, U. A. Walker, A. Tyndall, C. Allard, S. Bay, R. Keller, F. Raulf, F. Di Padova, T. O'Reilly, N. J. Horwood, D. D. Patel and A. Littlewood-Evans (2011). "Th17 cells, not IL-17+ gammadelta T cells, drive arthritic bone destruction in mice and humans." J Immunol **186**(4): 2602-2612.
- Qu, Z., C. H. Garcia, L. M. O'Rourke, S. R. Planck, M. Kohli and J. T. Rosenbaum (1994). "Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining." Arthritis Rheum **37**(2): 212-220.
- Qu, Z., X. N. Huang, P. Ahmadi, J. Andresevic, S. R. Planck, C. E. Hart and J. T. Rosenbaum (1995). "Expression of basic fibroblast growth factor in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease." Lab Invest **73**(3): 339-346.
- Rangachari, M., N. Mauermann, R. R. Marty, S. Dirnhofer, M. O. Kurrer, V. Komnenovic, J. M. Penninger and U. Eriksson (2006). "T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin 17." J Exp Med **203**(8): 2009-2019.
- Raposo, B. R., P. Rodrigues-Santos, H. Carvalheiro, A. M. Agua-Doce, L. Carvalho, J. A. Pereira da Silva, L. Graca and M. M. Souto-Carneiro (2010). "Monoclonal anti-CD8 therapy induces disease amelioration in the K/BxN mouse model of spontaneous chronic polyarthritis." Arthritis Rheum **62**(10): 2953-2962.
- Reife, R. A., N. Loutis, W. C. Watson, K. A. Hasty and J. M. Stuart (1991). "SWR mice are resistant to collagen-induced arthritis but produce potentially arthritogenic antibodies." Arthritis Rheum **34**(6): 776-781.
- Remmers, E. F., R. M. Plenge, A. T. Lee, R. R. Graham, G. Hom, T. W. Behrens, P. I. de Bakker, J. M. Le, H. S. Lee, F. Batliwalla, W. Li, S. L. Masters, M. G. Booty, J. P. Carulli, L. Padyukov, L. Alfredsson, L. Klareskog, W. V. Chen, C. I. Amos, L. A. Criswell, M. F. Seldin, D. L. Kastner and P. K. Gregersen (2007). "STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus." N Engl J Med **357**(10): 977-986.

- Roark, C. L., J. D. French, M. A. Taylor, A. M. Bendele, W. K. Born and R. L. O'Brien (2007). "Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells." *J Immunol* **179**(8): 5576-5583.
- Roark, C. L., P. L. Simonian, A. P. Fontenot, W. K. Born and R. L. O'Brien (2008). "gammadelta T cells: an important source of IL-17." *Curr Opin Immunol* **20**(3): 353-357.
- Roncarolo, M. G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer and M. K. Levings (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." *Immunol Rev* **212**: 28-50.
- Rosengren, S., M. Corr and D. L. Boyle (2010). "Platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta synergistically potentiate inflammatory mediator synthesis by fibroblast-like synoviocytes." *Arthritis Res Ther* **12**(2): R65.
- Rosloniec, E. F., D. D. Brand, L. K. Myers, Y. Esaki, K. B. Whittington, D. M. Zaller, A. Woods, J. M. Stuart and A. H. Kang (1998). "Induction of autoimmune arthritis in HLA-DR4 (DRB1\*0401) transgenic mice by immunization with human and bovine type II collagen." *J Immunol* **160**(6): 2573-2578.
- Rosloniec, E. F., D. D. Brand, L. K. Myers, K. B. Whittington, M. Gumanovskaya, D. M. Zaller, A. Woods, D. M. Altmann, J. M. Stuart and A. H. Kang (1997). "An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen." *J Exp Med* **185**(6): 1113-1122.
- Roudier, J. (2000). "Association of MHC and rheumatoid arthritis. Association of RA with HLA-DR4: the role of repertoire selection." *Arthritis Res* **2**(3): 217-220.
- Saal, J. G., M. Krimmel, M. Steidle, F. Gerneth, S. Wagner, P. Fritz, S. Koch, J. Zacher, S. Sell, H. Einsele and C. A. Muller (1999). "Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope." *Arthritis Rheum* **42**(7): 1485-1496.
- Sakaguchi, S. and N. Sakaguchi (2005). "Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system." *Curr Opin Immunol* **17**(6): 589-594.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh and M. Toda (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-1164.
- Sakuma, M., K. Hatsushika, K. Koyama, R. Katoh, T. Ando, Y. Watanabe, M. Wako, M. Kanzaki, S. Takano, H. Sugiyama, Y. Hamada, H. Ogawa, K. Okumura and A. Nakao (2007). "TGF-beta type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody." *Int Immunol* **19**(2): 117-126.
- Sancho, D., M. Gomez, F. Viedma, E. Esplugues, M. Gordon-Alonso, M. A. Garcia-Lopez, H. de la Fuente, A. C. Martinez, P. Lauzurica and F. Sanchez-Madrid (2003). "CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis." *J Clin Invest* **112**(6): 872-882.
- Santambrogio, L., G. M. Hochwald, C. H. Leu and G. J. Thorbecke (1993). "Antagonistic effects of endogenous and exogenous TGF-beta and TNF on autoimmune diseases in mice." *Immunopharmacol Immunotoxicol* **15**(4): 461-478.
- Santiago, B., I. Gutierrez-Canas, J. Dotor, G. Palao, J. J. Lasarte, J. Ruiz, J. Prieto, F. Borrás-Cuesta and J. L. Pablos (2005). "Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis." *J Invest Dermatol* **125**(3): 450-455.

- Sarkar, S., L. A. Cooney, P. White, D. B. Dunlop, J. Endres, J. M. Jorns, M. J. Wasco and D. A. Fox (2009). "Regulation of pathogenic IL-17 responses in collagen-induced arthritis: roles of endogenous interferon-gamma and IL-4." Arthritis Res Ther **11**(5): R158.
- Sarkissian, M. and R. Lafyatis (1998). "Transforming growth factor-beta and platelet derived growth factor regulation of fibrillar fibronectin matrix formation by synovial fibroblasts." J Rheumatol **25**(4): 613-622.
- Schmutz, C., A. Hulme, A. Burman, M. Salmon, B. Ashton, C. Buckley and J. Middleton (2005). "Chemokine receptors in the rheumatoid synovium: upregulation of CXCR5." Arthritis Res Ther **7**(2): R217-229.
- Schramm, C., J. Kriegsmann, M. Protschka, S. Huber, T. Hansen, E. Schmitt, P. R. Galle and M. Blessing (2004). "Susceptibility to collagen-induced arthritis is modulated by TGFbeta responsiveness of T cells." Arthritis Res Ther **6**(2): R114-119.
- Schurigt, U., C. Pfirschke, I. M. Irmeler, M. Huckel, M. Gajda, T. Janik, R. Baumgrass, J. Bernhagen and R. Brauer (2008). "Interactions of T helper cells with fibroblast-like synoviocytes: up-regulation of matrix metalloproteinases by macrophage migration inhibitory factor from both Th1 and Th2 cells." Arthritis Rheum **58**(10): 3030-3040.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S. I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher and B. Fazekas de St Groth (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." J Exp Med **203**(7): 1693-1700.
- Sha, Y. and S. Markovic-Plese (2011). "A role of IL-1R1 signaling in the differentiation of Th17 cells and the development of autoimmune diseases." Self Nonself **2**(1): 35-42.
- Shull, M. M., I. Ormsby, A. B. Kier, S. Pawlowski, R. J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin and et al. (1992). "Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease." Nature **359**(6397): 693-699.
- Silman, A. J., J. Newman and A. J. MacGregor (1996). "Cigarette smoking increases the risk of rheumatoid arthritis. Results from a nationwide study of disease-discordant twins." Arthritis Rheum **39**(5): 732-735.
- Silverman, G. J. and S. Weisman (2003). "Rituximab therapy and autoimmune disorders: prospects for anti-B cell therapy." Arthritis Rheum **48**(6): 1484-1492.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Luthy, H. Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H. L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T. M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee and W. J. Boyle (1997). "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." Cell **89**(2): 309-319.
- Snir, O., M. Widhe, M. Hermansson, C. von Spee, J. Lindberg, S. Hensen, K. Lundberg, A. Engstrom, P. J. Venables, R. E. Toes, R. Holmdahl, L. Klareskog and V. Malmstrom (2009). "Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients." Arthritis Rheum **62**(1): 44-52.
- Song, X. Y., M. Gu, W. W. Jin, D. M. Klinman and S. M. Wahl (1998). "Plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 suppresses chronic disease in a

- streptococcal cell wall-induced arthritis model." *J Clin Invest* **101**(12): 2615-2621.
- Stahl, E. A., S. Raychaudhuri, E. F. Remmers, G. Xie, S. Eyre, B. P. Thomson, Y. Li, F. A. Kurreeman, A. Zhernakova, A. Hinks, C. Guiducci, R. Chen, L. Alfredsson, C. I. Amos, K. G. Ardlie, A. Barton, J. Bowes, E. Brouwer, N. P. Burt, J. J. Catanese, J. Coblyn, M. J. Coenen, K. H. Costenbader, L. A. Criswell, J. B. Crusius, J. Cui, P. I. de Bakker, P. L. De Jager, B. Ding, P. Emery, E. Flynn, P. Harrison, L. J. Hocking, T. W. Huizinga, D. L. Kastner, X. Ke, A. T. Lee, X. Liu, P. Martin, A. W. Morgan, L. Padyukov, M. D. Posthumus, T. R. Radstake, D. M. Reid, M. Seielstad, M. F. Seldin, N. A. Shadick, S. Steer, P. P. Tak, W. Thomson, A. H. van der Helm-van Mil, I. E. van der Horst-Bruinsma, C. E. van der Schoot, P. L. van Riel, M. E. Weinblatt, A. G. Wilson, G. J. Wolbink, B. P. Wordsworth, C. Wijmenga, E. W. Karlson, R. E. Toes, N. de Vries, A. B. Begovich, J. Worthington, K. A. Siminovitch, P. K. Gregersen, L. Klareskog and R. M. Plenge (2010). "Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci." *Nat Genet* **42**(6): 508-514.
- Stolt, P., C. Bengtsson, B. Nordmark, S. Lindblad, I. Lundberg, L. Klareskog and L. Alfredsson (2003). "Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases." *Ann Rheum Dis* **62**(9): 835-841.
- Stritesky, G. L., N. Yeh and M. H. Kaplan (2008). "IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage." *J Immunol* **181**(9): 5948-5955.
- Stumhofer, J. S., J. S. Silver, A. Laurence, P. M. Porrett, T. H. Harris, L. A. Turka, M. Ernst, C. J. Saris, J. J. O'Shea and C. A. Hunter (2007). "Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10." *Nat Immunol* **8**(12): 1363-1371.
- Sutton, C. E., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, C. F. Brereton, E. C. Lavelle and K. H. Mills (2009). "Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity." *Immunity* **31**(2): 331-341.
- Sweeney, S. E. and G. S. Firestein (2004). "Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(3): 372-378.
- Tada, T., T. Takemori, K. Okumura, M. Nonaka and T. Tokuhiya (1978). "Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells." *J Exp Med* **147**(2): 446-458.
- Tada, Y., A. Ho, D. R. Koh and T. W. Mak (1996). "Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis." *J Immunol* **156**(11): 4520-4526.
- Thorbecke, G. J., R. Shah, C. H. Leu, A. P. Kuruvilla, A. M. Hardison and M. A. Palladino (1992). "Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7375-7379.
- Tone, Y., K. Furuuchi, Y. Kojima, M. L. Tykocinski, M. I. Greene and M. Tone (2008). "Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer." *Nat Immunol* **9**(2): 194-202.
- Tong, T., W. Zhao, Y. Q. Wu, Y. Chang, Q. T. Wang, L. L. Zhang and W. Wei (2010). "Chicken type II collagen induced immune balance of main subtype of helper T cells in mesenteric lymph node lymphocytes in rats with collagen-induced arthritis." *Inflamm Res* **59**(5): 369-377.

- Trentham, D. E., A. S. Townes and A. H. Kang (1977). "Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis." *J Exp Med* **146**(3): 857-868.
- Trifari, S., C. D. Kaplan, E. H. Tran, N. K. Crellin and H. Spits (2009). "Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells." *Nat Immunol* **10**(8): 864-871.
- Tsoufa, G., G. A. Rook, J. D. Van-Embden, D. B. Young, A. Mehlert, D. A. Isenberg, F. C. Hay and P. M. Lydyard (1989). "Raised serum IgG and IgA antibodies to mycobacterial antigens in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **48**(2): 118-123.
- Tsubaki, T., S. Takegawa, H. Hanamoto, N. Arita, J. Kamogawa, H. Yamamoto, N. Takubo, S. Nakata, K. Yamada, S. Yamamoto, O. Yoshie and M. Nose (2005). "Accumulation of plasma cells expressing CXCR3 in the synovial sublining regions of early rheumatoid arthritis in association with production of Mig/CXCL9 by synovial fibroblasts." *Clin Exp Immunol* **141**(2): 363-371.
- Tsukazaki, T., T. A. Chiang, A. F. Davison, L. Attisano and J. L. Wrana (1998). "SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor." *Cell* **95**(6): 779-791.
- Valencia, X., G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E. M. Shevach and P. E. Lipsky (2006). "TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells." *Blood* **108**(1): 253-261.
- van Amelsfort, J. M., K. M. Jacobs, J. W. Bijlsma, F. P. Lafeber and L. S. Taams (2004). "CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid." *Arthritis Rheum* **50**(9): 2775-2785.
- van Beuningen, H. M., P. M. van der Kraan, O. J. Arntz and W. B. van den Berg (1994). "Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint." *Lab Invest* **71**(2): 279-290.
- van de Veerdonk, F. L., B. Lauwerys, R. J. Marijnissen, K. Timmermans, F. Di Padova, M. I. Koenders, I. Gutierrez-Roelens, P. Durez, M. G. Netea, J. W. van der Meer, W. B. van den Berg and L. A. Joosten (2011). "The anti-CD20 antibody rituximab reduces the Th17 cell response." *Arthritis Rheum* **63**(6): 1507-1516.
- van den Berg, W. B. and B. Bresnihan (1999). "Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-I." *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol* **13**(4): 577-597.
- van Dinther-Janssen, A. C., S. T. Pals, R. Scheper, F. Breedveld and C. J. Meijer (1990). "Dendritic cells and high endothelial venules in the rheumatoid synovial membrane." *J Rheumatol* **17**(1): 11-17.
- van Hamburg, J. P., A. M. Mus, M. J. de Bruijn, L. de Vogel, L. Boon, F. Cornelissen, P. Asmawidjaja, R. W. Hendriks and E. Lubberts (2009). "GATA-3 protects against severe joint inflammation and bone erosion and reduces differentiation of Th17 cells during experimental arthritis." *Arthritis Rheum* **60**(3): 750-759.
- van Roon, J. A., J. L. van Roy, A. Duits, F. P. Lafeber and J. W. Bijlsma (1995). "Proinflammatory cytokine production and cartilage damage due to rheumatoid synovial T helper-1 activation is inhibited by interleukin-4." *Ann Rheum Dis* **54**(10): 836-840.
- Varga, J. and B. Pasche (2009). "Transforming growth factor beta as a therapeutic target in systemic sclerosis." *Nat Rev Rheumatol* **5**(4): 200-206.
- Vaughan, J. H. (1990). "Infection and rheumatic diseases: a review (2)." *Bull Rheum Dis* **39**(2): 1-8.

- Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." *Immunity* **24**(2): 179-189.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, R. A. Flavell and B. Stockinger (2006). "Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease." *Nat Immunol* **7**(11): 1151-1156.
- Vermeire, K., H. Heremans, M. Vandeputte, S. Huang, A. Billiau and P. Matthys (1997). "Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice." *J Immunol* **158**(11): 5507-5513.
- Wahl, S. M., J. B. Allen, G. L. Costa, H. L. Wong and J. R. Dasch (1993). "Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor beta." *J Exp Med* **177**(1): 225-230.
- Waldrip, W. R., E. K. Bikoff, P. A. Hoodless, J. L. Wrana and E. J. Robertson (1998). "Smad2 signaling in extraembryonic tissues determines anterior-posterior polarity of the early mouse embryo." *Cell* **92**(6): 797-808.
- Wandstrat, A. and E. Wakeland (2001). "The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes." *Nat Immunol* **2**(9): 802-809.
- Watson, W. C. and A. S. Townes (1985). "Genetic susceptibility to murine collagen II autoimmune arthritis. Proposed relationship to the IgG2 autoantibody subclass response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC loci." *J Exp Med* **162**(6): 1878-1891.
- Williams, R. O. (2007). "Collagen-induced arthritis in mice." *Methods Mol Med* **136**: 191-199.
- Williams, R. O. (2007). "Collagen-induced arthritis in mice: a major role for tumor necrosis factor-alpha." *Methods Mol Biol* **361**: 265-284.
- Winchester, R. J. (1981). "Genetic aspects of rheumatoid arthritis." *Springer Semin Immunopathol* **4**(2): 89-102.
- Wooley, P. H., H. S. Luthra, M. M. Griffiths, J. M. Stuart, A. Huse and C. S. David (1985). "Type II collagen-induced arthritis in mice. IV. Variations in immunogenetic regulation provide evidence for multiple arthritogenic epitopes on the collagen molecule." *J Immunol* **135**(4): 2443-2451.
- Wooley, P. H., H. S. Luthra, J. M. Stuart and C. S. David (1981). "Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates." *J Exp Med* **154**(3): 688-700.
- Yang, C. M., S. F. Luo, H. L. Hsieh, P. L. Chi, C. C. Lin, C. C. Wu and L. D. Hsiao (2010). "Interleukin-1beta induces ICAM-1 expression enhancing leukocyte adhesion in human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: involvement of ERK, JNK, AP-1, and NF-kappaB." *J Cell Physiol* **224**(2): 516-526.
- Yang, L., D. E. Anderson, C. Baecher-Allan, W. D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo and D. A. Hafler (2008). "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells." *Nature* **454**(7202): 350-352.
- Yang, X. O., B. P. Pappu, R. Nurieva, A. Akimzhanov, H. S. Kang, Y. Chung, L. Ma, B. Shah, A. D. Panopoulos, K. S. Schluns, S. S. Watowich, Q. Tian, A. M. Jetten and C. Dong (2008). "T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma." *Immunity* **28**(1): 29-39.
- Yang, X. P., K. Ghoreschi, S. M. Steward-Tharp, J. Rodriguez-Canales, J. Zhu, J. R. Grainger, K. Hirahara, H. W. Sun, L. Wei, G. Vahedi, Y. Kanno, J. J. O'Shea and A. Laurence (2011). "Opposing regulation of the locus encoding IL-17

- through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5." Nat Immunol **12**(3): 247-254.
- Yarilina, A., K. Xu, C. Chan and L. B. Ivashkiv (2012). "Regulation of inflammatory responses in tumor necrosis factor - activated and rheumatoid arthritis synovial macrophages by Janus kinase inhibitors." Arthritis Rheum.
- Yeo, L., K. M. Toellner, M. Salmon, A. Filer, C. D. Buckley, K. Raza and D. Scheel-Toellner (2011). "Cytokine mRNA profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis.
- Yoshino, S. and L. G. Cleland (1992). "Depletion of alpha/beta T cells by a monoclonal antibody against the alpha/beta T cell receptor suppresses established adjuvant arthritis, but not established collagen-induced arthritis in rats." J Exp Med **175**(4): 907-915.
- Zhang, L., J. M. Li, X. G. Liu, D. X. Ma, N. W. Hu, Y. G. Li, W. Li, Y. Hu, S. Yu, X. Qu, M. X. Yang, A. L. Feng and G. H. Wang (2011). "Elevated Th22 Cells Correlated with Th17 Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis." J Clin Immunol.
- Zhang, Y., X. Feng, R. We and R. Derynck (1996). "Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response." Nature **383**(6596): 168-172.
- Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard and D. R. Littman (2007). "IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways." Nat Immunol **8**(9): 967-974.
- Ziolkowska, M., A. Koc, G. Luszczkiewicz, K. Ksiezopolska-Pietrzak, E. Klimczak, H. Chwalinska-Sadowska and W. Maslinski (2000). "High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism." J Immunol **164**(5): 2832-2838.



## **ARTÍCULOS PUBLICADOS**

---



## Artículos publicados relacionados con esta tesis doctoral

- **Elena Gonzalo-Gil**<sup>1</sup>, Gabriel Criado<sup>1</sup>, Begoña Santiago<sup>1</sup>, Javier Dotor<sup>2</sup>, José L Pablos<sup>1,3</sup>, María Galindo<sup>1,3\*</sup>. *Increased TGF-beta signaling in rheumatoid synovium and effects of TGF-beta blockade in the murine model of collagen-induced arthritis*. Enviado para publicar.



**Increased TGF-beta signaling in rheumatoid synovium and effects of TGF-beta blockade in the murine model of collagen-induced arthritis**

Elena Gonzalo-Gil <sup>1</sup>, Gabriel Criado<sup>1</sup>, Begoña Santiago<sup>1</sup>, Javier Dotor <sup>2</sup>, José L Pablos<sup>1,3</sup>, María Galindo<sup>1,3\*</sup>

(1) Instituto de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain.

(2) DIGNA Biotech, Pamplona, Spain.

(3) Servicio de Reumatología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain.

e-mail addresses for all authors: [elenagonzalo\\_bio@hotmail.com](mailto:elenagonzalo_bio@hotmail.com); [gcriado@h12o.es](mailto:gcriado@h12o.es); [b.s.martin@hotmail.com](mailto:b.s.martin@hotmail.com); [jdotor@dignabiotech.com](mailto:jdotor@dignabiotech.com); [jpgablos@h12o.es](mailto:jpgablos@h12o.es); [mgalindo@h12o.es](mailto:mgalindo@h12o.es)

\* Corresponding author: María Galindo; e-mail: [mgalindo@h12o.es](mailto:mgalindo@h12o.es)

Servicio de Reumatología. Hospital 12 de Octubre. Avenida de Córdoba sn. 28041 Madrid. Spain.

Telephone number: +34913908767/8766.

Fax: +34913908544.

Short title: TGF-beta in collagen-induced arthritis

## **Abstract**

**Objective:** To analyze the distribution of regulatory p-Smad-2/3 and inhibitory Smad-7 proteins as indirect markers for TGF- $\beta$  signalling in rheumatoid arthritis synovial tissue and to investigate the effect of TGF- $\beta$  blockade in the development and progression of collagen-induced arthritis.

**Methods:** Expression of Smad proteins in synovial tissues from rheumatoid arthritis, osteoarthritic and healthy controls was analyzed by immunohistochemistry. Arthritis was induced in DBA/1 mice by immunization with chicken type-II collagen (CII). TGF- $\beta$  was blocked *in vivo* with the specific peptide p17 starting at the time of immunization or on the day of arthritis onset. T cell population frequency and specific responses to CII were analyzed. Expression of cytokines and transcription factors was quantified in spleen and joint samples. Statistical differences between groups were compared using Mann-Whitney U test for two independent samples or one way ANOVA using Kruskal-Wallis non-parametric test as required.

**Results:** Regulatory p-Smad-2/3 and inhibitory Smad-7 expression were detected in rheumatoid arthritis and control tissues. In rheumatoid arthritis, most lymphoid infiltrating cells showed nuclear p-Smad-2/3 without Smad-7 expression. Treatment with TGF- $\beta$  antagonist delayed the onset of arthritis and tended to reduce the clinical severity of disease. Histological joint inflammation and cartilage damage were comparable in both groups. Frequency of T cells, mRNA levels of cytokines and transcription factors in spleen and joints, specific proliferation to CII, serum IL-6 and IgG1/IgG2a anti-CII antibodies were comparable in p17 and PBS treated groups in both phases.

**Conclusions:** The observed pattern of Smad proteins expression suggests active TGF- $\beta$  signaling in rheumatoid arthritis synovium. TGF- $\beta$  blockade in collagen-induced

arthritis led to a modest improvement of the disease, pointing to a pathogenetic rather than protective role for TGF- $\beta$  in this setting.

**Keywords:** Transforming growth factor (TGF), rheumatoid arthritis, collagen-induced arthritis, regulatory T cells, Th17.

## **Introduction**

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic inflammatory cell infiltration and hyperplastic growth of resident cells and blood vessels in synovial tissues [1]. TGF- $\beta$  is a homodimeric protein with pleiotropic actions in embryonic development, immune responses, inflammation and repair [2]. Excessive TGF- $\beta$ 1 signaling is associated to pathological scarring and fibrotic disease and plays a relevant role in the progression of cancer. The effects of TGF- $\beta$  on autoimmune inflammatory diseases are complex and difficult to predict, limiting the clinical development of its inhibitors [3-4].

The main concern arises from the observation that genetic deficiency of TGF- $\beta$ 1, the most potent TGF- $\beta$  isoform, leads to severe multiorgan inflammation and autoimmunity [5]. TGF- $\beta$  plays a key role in the differentiation and function of Treg cells in mice by inducing the expression of Foxp3 in vivo and in vitro [6]. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-cells also produce high levels of TGF- $\beta$  that is immunosuppressor through TGF- $\beta$ R actions on different target cells [7]. However, TGF- $\beta$  effects are more complex and also include proinflammatory and immune effector actions. In addition its role on Treg differentiation, TGF- $\beta$  may induce Th17 differentiation in mice in the presence of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 [8-9]. In humans, a greater plasticity and flexibility characterize the differentiation of human Th17 cells. TGF- $\beta$  together with IL-

21 may also induce Th17 differentiation of human T-cells, but a TGF- $\beta$  independent, IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-23 dependent pathway, has also been demonstrated [10-11]. TGF- $\beta$  dependent or independent processes in differentiation of Th17 are regulated by the activation of Ror $\alpha$  and Ror $\gamma$ t transcription factors [12-13]. Therefore, TGF- $\beta$  might have proinflammatory roles in the pathogenesis of RA and other immune-mediated human diseases by promoting Th17 development [14-15]. TGF- $\beta$  activation and signaling have multiple points of regulation that may modify its transcriptional and functional immunoregulatory effects. In Crohn disease, dominant inhibitory Smad-7 protein expression blocks TGF- $\beta$  immunoregulatory actions permitting T-cell proinflammatory signaling [16].

The role of TGF- $\beta$  in RA pathogenesis remains controversial, and conflicting data have emerged from different experiments with rheumatoid synovial cells [17-18].

TGF- $\beta$  is expressed by most cellular components of the rheumatoid synovium, principally macrophages and T lymphocytes [19-20]. In polyarticular SCW-induced arthritis in rats, intraperitoneal administration of TGF- $\beta$ 1 can prevent or ameliorate arthritis [21]. In addition, injection of TGF- $\beta$ 1 protects from arthritis development in CIA (collagen-induced arthritis) mice [22]. However, intraarticular administration of TGF- $\beta$ 1 in rats induces inflammation and joint damage [23]. TGF- $\beta$  blockade in several models of arthritis has also shown different results. Local and systemic injection of neutralizing antibodies to TGF- $\beta$  during the induction phase of CIA increased the severity of arthritis [24-25]. In contrast, treatment with anti-TGF- $\beta$ RI antibodies in BALB/c mice with CAIA (collagen antibody-induced arthritis) reduced signs of arthritis and synovial pathology in arthritic mice [26]. These models may be variably dependent on the different immunoregulatory or proinflammatory actions of TGF- $\beta$ . In the murine model of CIA, specific Th17 responses to type II collagen (CII) immunization at the

early stage of the disease have been demonstrated [27], and IL-17 blockade reduces the production of proinflammatory cytokines and the severity of the inflammatory process [28]. Increased numbers of Th17 have been found in the synovial fluid and synovium of patients with RA, but their relevance as proinflammatory effectors is unclear [29-31]. To obtain proof of TGF- $\beta$  signaling in RA synovial tissues, we have analyzed the distribution of p-Smad-2/3 and their Smad-7 inhibitor in RA synovial tissue. Smad-2/3 are phosphorylated and translocated to the nucleus upon TGF- $\beta$  receptor activation. Smad-7 is an inhibitory Smad which expression is induced by Smad-2/3 as a feedback regulatory mechanism. Therefore the pattern of expression of these proteins is a good surrogate marker for the activation status of the TGF- $\beta$  pathway [20, 32]. We also investigated the effects of a recently developed small peptide antagonist of TGF- $\beta$ 1 (p17) that permits investigating the role of TGF- $\beta$ 1 in different phases of arthritis in the CIA model. This peptide has shown the capacity to block TGF- $\beta$ 1 activity by inhibiting the phosphorylation of Smad proteins induced by TGF- $\beta$ , and inhibits human and murine-derived Treg activity *in vitro* and *in vivo*, restoring T cell proliferation [33-34]. We hypothesized that, depending on the phase of TGF- $\beta$  blockade (i.e. during the induction of arthritis or when arthritis is established), it might have different effects on the course of arthritis.

## **Materials and methods**

### **Human synovial tissues**

Synovial tissue was obtained from 7 patients with RA and 8 patients with osteoarthritis (OA) at the time of prosthetic joint replacement surgery. Tissue from 10 healthy adult donors without a history of joint disease was obtained at elective arthroscopic surgery for minor traumatic lesions.

### **Immunohistochemical detection of Smad proteins in human tissues**

Immunohistochemical (IHQ) studies were performed on paraffin-embedded sections. Tissues were staining with either polyclonal rabbit anti-phospho-Smad-2/3 (anti-p-Smad-2/3) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or polyclonal goat anti-Smad-7 (Santa Cruz Biotechnology) overnight at 4°C, followed by the appropriate biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). IHQ staining was performed with a peroxidase avidin-biotin complex technique (SK-4100; Vector). Diaminobenzidine was used as chromogen substrate, and sections were counterstained with hematoxylin.

### **Mice**

DBA/10IaHsd male mice were purchased from Harlam laboratories and maintained under specific pathogen-free conditions. All experiments followed institutional guidelines and were approved by the Ethic Committee from Hospital 12 de Octubre.

### **Induction and assessment of arthritis**

Ten-week-old male mice were immunized by intradermal injection at the base of the tail with 200µg of chicken CII in Complete Freund's Adjuvant (CFA), as previously described [35]. Joint inflammation was measured daily with a 0-10mm microcalliper (Mitutoyo; Japan). Clinical severity of the paws was assessed daily using the following scale: (0) normal, (1) slight swelling and erythema, (2) pronounced edematous swelling, and (3) stiffness of the joint, yielding a maximum score of 12 per mouse. Results are expressed as mean ± SEM of clinical score per group, along the duration of experiments.

### **Treatment protocols**

To analyse the contribution of TGF- $\beta$  to the induction of CIA, mice were treated intraperitoneally with 75  $\mu$ g of p17 (provided by Digna Biotech, Pamplona, Spain) [33] or vehicle (PBS), daily during 3 weeks starting at the time of immunization. The role of TGF- $\beta$  in progression of established arthritis was assessed by treating mice with PBS or 100  $\mu$ g of p17 daily for 10 days starting on the day of arthritis onset. Seven to ten mice per group were included in each experiment.

### **Histological joint inflammation and cartilage damage**

Mice were euthanized and paws were removed and fixed in 4% formaldehyde, decalcified with 10% EDTA pH 8.0 and embedded in paraffin. 5- $\mu$ m sections were prepared and stained with haematoxylin-eosin and safranin O for assessment of histological damage and integrity of articular cartilage. Each sample was evaluated by two independent observers. The severity of joint damage was quantified as follows: (0) normal joint, (1) moderate infiltration with discreet erosions, (2) severe infiltration and moderate erosions with preserved joint architecture and (3) severe erosions with loss of joint structure. A mean for each paw was obtained by assessing the distal and proximal interphalangeal joints and the tarsal-metatarsal joint and the addition of the four paws determined the histological score (maximum of 12 for each mouse). Cartilage destruction was evaluated with a semiquantitative scale ranging from 0 to 4, depending on cartilage loss as follows: (0) 0%, (1) 0-25%, (2) 25-50%, (3) 50-75% and (4) 75-100% of joint cartilage loss. A mean for each paw was obtained and the score for each mouse was calculated (maximum 16).

### **Analysis of CII-specific responses**

Single cell suspensions of inguinal lymph nodes (ILN) were cultured in the presence of 50µg/ml CII. After 48 hours, supernatant was collected and IFN-γ and IL-17 production was measured by ELISA (mouse IFN-γ and mouse IL-17A ELISA max set standards, BioLegend). The specific proliferative response to CII was determined by the incorporation of WST-1 (*cell proliferation reagent*, Roche; Mannheim, Germany) in cultured cells after 72 hours.

### **Flow cytometry**

ILN were stimulated with 20ng/ml PMA (Sigma-Aldrich; Madrid, Spain) and 1µg/ml ionomycin (Sigma-Aldrich) in the presence of 10µg/ml brefeldin A (Sigma-Aldrich) for 4 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were stained with anti-CD4-PerCP (clone RM4-5, BD Biosciences; San Diego CA, USA), anti-CD8-PE-Cy5 (clone 53-6.7, BioLegend) or anti-γδTCR-PE-Cy5 (clone eBioGL3, eBioscience; San Diego CA USA) antibodies, permeabilized with 0,5% saponin and stained with anti-IFNγ-FITC (clone XMG1.2, BD Biosciences), anti-IL17-PE (clone TC11-18H10, Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach, Germany) and anti-IL4-PE (clone 11B11, BD Biosciences) antibodies.

To detect Treg, single cells suspensions from ILN were stained with anti-CD4-PerCP or anti-CD8-PE-Cy5 and anti-CD25-FITC (IL-2 receptor α chain p55, clone 7D4, BD Biosciences) antibodies. Cells were fixed, permeabilized and stained with anti-Foxp3-PE (clone MF-23, BD Biosciences) antibody following manufacturer instructions. Flow cytometry analysis was performed in a FACSCalibur instrument and analysed with Cell Quest Pro software (BD Biosciences).

### **Quantitative real-time-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses**

Expression of IL-6, IL-17, IFN- $\gamma$ , Ror $\gamma$ t, IL-23p19 and FoxP3 was analysed by quantitative RT-PCR. Tissues from spleen and pooled inflamed joints from each animal were snap frozen in liquid nitrogen and pulverized. Total RNA was extracted using TRI Reagent (Sigma-Aldrich) and 1 $\mu$ g was used for first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis with High Capacity cDNA Transcription Kit (Applied Biosystems; Warrington, UK). Quantitative RT-PCR was performed on an Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System using Power SYBR Green PCR Master Mix and the following primers: IL-6 sense: 5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3', antisense: 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'; IL-17 sense: 5'-GCAATGAAGACCCTGATAGATATCC-3', antisense: 5'-TTCATGTGGTGGTCCAGCTTT-3'; IFN- $\gamma$  sense: 5'-GCGGCTGACTGAACTCAGATT-3', antisense: 5'-CACTGCAGCTCTGAATGTTTCTTATT-3'; FoxP3 sense: 5'-CCCATCCCCAGGAGTCTTG-3', antisense: 5'-ACCATGACTAGGGGCACTGTA-3'; IL-23p19 sense: 5'-AAAATAATGTGCCCGTATCCAG-3', antisense: 5'-GCTCCCCTTTGAAGATGTCAG-3'; ROR $\gamma$ t sense: 5'-AGTGTAATGTGGCCTACTCCT-3', antisense: 5'-GCTGCTGTTGCAGTTGTTTCT-3'; GAPDH sense: 5'-CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA-3', antisense: 5'-GCGGCACGTCAGATCCA-3'. For relative quantification, we compared the amount of target normalized to the endogenous reference, by using standard curves of target genes and the endogenous reference GAPDH.

### **Serum measurements**

Levels of anti-collagen antibody IgG1 and IgG2a in the serum of CIA mice were assessed by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, plates (Costar,

Washington, USA) were coated with 2µg/ml of CII dissolved in Tris buffer (0,05M Tris, 0,2M NaCl, pH 7.4) and incubated overnight at 4°C. Plates were blocked with 2% bovine serum albumin, and then incubated with serial dilutions of sera. A standard curve was generated for each assay by including serial dilutions of a reference sample of pooled sera from arthritic mice. The higher concentration of the reference sample was arbitrarily assigned an antibody concentration of 1 RU/ml. Bound IgG1 or IgG2a antibodies were detected by incubation with horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG1 and IgG2a (BD Biosciences), followed by addition of TMB (3,3', 5,5'-TetraMethylBenzidine, BD Biosciences) substrate. Optical density was measured at 450 nm and corrected at 560 nm. Antibody concentrations for each sample were obtained by reference to the standard curve. Levels of IL-6 in the sera of mice were assessed by ELISA (mouse IL-6 ELISA max set standard, BioLegend).

### **Statistical analysis**

A descriptive analysis of each experiment was performed to compare the incidence and severity of the disease. The impact of treatment on the clinical score of CIA mice along the course of disease was analyzed by ANOVA for repeated measures. Statistical differences between groups were compared using Mann-Whitney U test for two independent samples or one way ANOVA using Kruskal-Wallis non-parametric test as required. Correlation between histological and cartilage damage scores was analyzed by Spearman's test. Analysis was performed using GraphPad PRISM software (version 5.01, Graph Pad; CA, USA) and advanced SPSS software version 15.0 (SPSS Iberica, Madrid, Spain). *P* values less than 0.05 were considered significant.

## **Results**

### **Phosphorylation of Smad proteins in RA synovial tissues**

To obtain evidence of TGF- $\beta$  activation in RA synovium, we analyzed the presence and distribution of regulatory p-Smad-2/3 and inhibitory Smad-7 by IHQ. Increased p-Smad-2/3 with a nuclear distribution was observed in blood vessels, synovial lining cells and mononuclear cell infiltrates of RA and OA synovial tissues compared to healthy controls (figure 1A, C, E). Expression of Smad-7 was also detected in blood vessels and synovial lining cells but it was similar between all three groups (figure 1B, D, F). Mononuclear infiltrates in either RA or OA synovial tissues abundantly expressing nuclear p-Smad-2/3 protein did not express Smad-7, pointing to unopposed p-Smad-2/3 activity in lymphocytes cells (figure 1A, B).

### **Effect of specific blockade of TGF- $\beta$ 1 during induction of CIA**

TGF- $\beta$  blockade during the induction phase of CIA delayed arthritis presentation as indicated by the time required to achieve 50% of disease incidence (day 20 in PBS group vs day 25 in p17 group) (Figure 2A). However, arthritis incidence reached 100% in both groups at the end of the experiment (42 days post-immunization). Mice treated with p17 showed a trend towards reduced severity in comparison to control mice, as assessed by clinical score (Figure 2B) and paw swelling (not shown), but differences were not statistically significant ( $p=0.12$ ). A total of 3 experiments were performed and a small but similar reduction of clinical scores was consistently observed [Additional file 1].

Histopathological analyses of joints at 6 weeks after immunization did not show differences between mice treated with p17 or PBS. Extensive erosions with loss of joint structure and massive accumulation of inflammatory cells were observed in both groups

(Histological score PBS  $8.47 \pm 0.76$  vs p17  $8.49 \pm 0.9$ ) (Figure 2C). Cartilage destruction was severe and similar in both groups (Cartilage score PBS  $13.25 \pm 0.65$  vs p17  $13.74 \pm 1.02$ ) (Figure 2C).

### **Immunological effects of specific blockade of TGF- $\beta$ 1 during CIA induction phase**

To investigate potential changes on T-cells induced by blockade of TGF- $\beta$  after CII immunization, we analyzed T-cell responses in ILN cells. P17 treatment induced a small, non-significant reduction in the frequency of Treg and Th17 cells in ILN (Figure 3A). TGF- $\beta$  blockade did not modify the frequency of Th1 or Th2 cells (Figure 3A). We next investigated the proportion of IL-17 producing CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$  T cells, as a relevant cell source of IL-17 in the joints from CIA mice [36]. Differences in the proportion of IL-17 and IFN- $\gamma$  producing CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta$  T cells were not detected (data not shown). T-cell proliferative responses to CII in ILN cells from CIA mice were not modified by treatment with p17 (Figure 3B). Production of IFN- $\gamma$  by CII stimulated T-cells was unchanged and only a marginally significant reduction on the production of IL-17 was observed ( $p=0.09$ ) (Figure 3B).

Serum levels of IL-6 and anti-CII Ab IgG1 and IgG2a responses were analyzed at 2 and 6 weeks after immunization. IL-6 was similar at 2 and 6 weeks after CII immunization in treated and control groups (Figure 4A). IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies were also similarly increased at 6 weeks in both groups (Figure 4B).

To analyze mRNA levels of cytokines and transcription factors in CIA mice after p17 treatment during induction of disease, spleen and inflamed paws were collected at 6 weeks. Foxp3, IL-6, IL-17 and IFN- $\gamma$  mRNA expression in spleen was comparable in both groups (data not shown). Although increased Foxp3 and reduced expression of IL-17 were found in inflamed paws after treatment with p17, differences were not

statistically significant (Figure 4C). No differences were observed in IFN- $\gamma$ , IL-23 and Ror $\gamma$ t mRNA expression between both groups (Figure 4C).

### **Blockade of TGF- $\beta$ 1 in mice with established arthritis**

To analyze the role of TGF- $\beta$  on established arthritis in CIA, mice were treated with p17 for 10 days, starting on the day of disease onset. Mice treated with p17 showed reduced severity of CIA in comparison to control mice, as assessed by clinical score and number of affected joints (not shown), although differences were not statistically significant ( $p=0.27$ ). This small reduction on severity was also consistent among different experiments [Additional file 2A]. The degree of histological synovial inflammation and cartilage damage was also slightly, non-significantly reduced in p17 compared to PBS treated mice (Histological score:  $5.73 \pm 0.88$  vs  $6.64 \pm 1.22$ ; Cartilage damage score:  $10.31 \pm 0.94$  vs  $12.00 \pm 0.71$ ) [Additional file 2B].

### **Immunological effects of specific blockade of TGF- $\beta$ 1 during established CIA**

Blockade of TGF- $\beta$  did not modify the proportion of Treg, Th17, Th1 and Th2 in arthritic mice (Figure 5A). Proportion of IL-17 producing CD8 $^+$  and  $\gamma\delta$  T cells was also comparable in treated and untreated groups (data not shown). Specific proliferation of T cells to CII showed an increased response (PBS  $0.15 \pm 0.03$ ;  $p=0.03$  and p17  $0.11 \pm 0.03$ ;  $p=0.01$ ) compared to baseline condition (PBS  $0.07 \pm 0.02$  and p17  $0.04 \pm 0.01$ ) (Figure 5B), but there were not statistical differences between groups. Differences between groups in production of IL-17 and IFN- $\gamma$  in response to CII were not observed (Figure 5B).

Treatment with p17 did not modify IL-6 and anti CII-specific antibodies, IgG1 and IgG2a at the end of each experiment (Figure 6A).

Analysis of mRNA expression showed no difference in Foxp3, IL-6 and IL-17 levels in spleen of CIA mice after TGF- $\beta$  blockade, whereas levels of IFN- $\gamma$  significantly increased upon treatment with p17 (PBS  $0.09 \pm 0.01$  vs p17  $0.29 \pm 0.06$ ;  $p=0.04$ ) (Figure 6B). In CIA inflamed paws from p17 treated mice only IL-23p19 was significantly higher (PBS  $0.02 \pm 0.01$  vs p17  $0.09 \pm 0.01$ ;  $p=0.003$ ) (Figure 6C). Levels of Foxp3, IL-6 and Ror $\gamma$ t were similar in both groups. Also, treatment with p17 increased levels of IL-17 and IFN- $\gamma$ , although the difference was not statistically significant (Figure 6C).

## **Discussion**

Several studies have demonstrated the presence of TGF- $\beta$ 1 in the synovial tissue and synovial fluid of RA patients [37] and higher expression of TGF- $\beta$  receptor type II (TGF- $\beta$ RII) in rheumatoid compared to osteoarthritic synovial fibroblasts [38]. Furthermore, increased expression of TGF- $\beta$  and TGF- $\beta$ RI in rheumatoid synovial fibroblasts positively correlates with clinical markers of disease activity pointing to a correlation between TGF- $\beta$  and inflammation [39]. Our data confirm that the classical TGF- $\beta$  signalling pathway is activated in RA and OA synovial tissues, as shown by increased phosphorylation of Smad-2/3. Inhibitory Smad-7 expression parallels p-Smad-2/3 expression in synovial cells of healthy and inflamed tissues but, remarkably, synovial lymphoid infiltrating cells did not express Smad-7 despite the abundant nuclear p-Smad-2/3 expression.

In the CIA model of arthritis, systemic blockade of TGF- $\beta$ , either during the induction phase or during established arthritis, did not have a great impact in the incidence or severity of the disease. The small effects cannot be attributed to insufficient TGF- $\beta$  inhibition, because a similar protocol of p17 treatment has been previously shown to

block activity of TGF- $\beta$  *in vivo* [33]. We confirmed the capacity of p17 to potentially inhibit TGF- $\beta$  induced phosphorylation of Smad proteins in spleen cells from CIA mice *in vitro* (data not shown).

This may indicate a non relevant role for TGF- $\beta$  in this model that could be explained by multiple effects of different sign on different components of the immune or effector phase of the disease. Nevertheless, the net effect of TGF- $\beta$  blockade was beneficial, discarding a protective effect for this factor in this model of autoimmune inflammation. The observed effects, although modest, were clearer on T-cell responses than on inflammatory tissue damage. Bone and cartilage destruction progressed similarly in mice treated with the TGF- $\beta$  inhibitor in the established phase of the disease. These clinical effects are consistent with those observed in other models of arthritis. In murine CAIA, intraperitoneal treatment with an anti-TGF- $\beta$ RI antibody prevents signs of arthritis [26]. In rats, local injection of TGF- $\beta$  induces synovial hyperplasia and recruitment of inflammatory cells [23, 40] and injection of anti-TGF- $\beta$  antibody inhibits chronic synovial inflammation in SCW-induced arthritis [41].

The effects of TGF- $\beta$  inhibition on T-cell responses had not been previously analyzed in animal models of arthritis. In experimental autoimmune encephalomyelitis, a related T-cell mediated disease, TGF- $\beta$  overexpression in T cells induces a more severe disease by increasing Th17 cells. Consistently, TGF- $\beta$  blockade inhibits Th17 differentiation and prevents disease development [42]. In CIA, we observe that TGF- $\beta$  blockade during the induction phase, moderately reduced the frequency of Th17 subpopulations and the production of IL-17 by ILN cells. The net effects were small suggesting that TGF- $\beta$  may be not absolutely necessary for Th17 differentiation as previously shown in TGF- $\beta$ 1 deficient mice [9]. An alternative, IL-23 dependent and TGF- $\beta$  independent pathway of Th17 differentiation has been described and might have greater pathogenic potential

in arthritis [43]. Therefore, we can conclude that in our model, TGF- $\beta$  has a small effect on Th17 differentiation and perhaps other cytokines such as IL-23 may be involved. Although CD4<sup>+</sup> T cells are considered to be the major T cell source of IL-17, recent reports indicate that other T cells populations such as  $\gamma\delta$ T cells and CD8<sup>+</sup> cells can contribute to IL-17 production in CIA mice [36, 44-45]. However, our results did not show any effect of specific TGF- $\beta$  blockade on IL-17 production by  $\gamma\delta$  and CD8<sup>+</sup> T cells.

Treg cells have been demonstrated to provide a protective role in CIA [46]. TGF- $\beta$  plays an essential role in Treg differentiation, as mice deficient in TGF- $\beta$ 1 show a defect in the maintenance of Foxp3 Treg cells and develop a lethal lymphoproliferative disorder [47-48]. Furthermore, TGF- $\beta$  signaling protects Treg cells from apoptosis [49]. The capacity of p17 to decrease Treg production depends on its inhibitory effect on TGF- $\beta$ 1 and, to a lesser extent, TGF- $\beta$ 2 as it has been previously demonstrated in a model of cancer immunity [34]. In the absence of functional TGF- $\beta$ 1, Treg development might proceed by compensatory expression of TGF- $\beta$ 2 and TGF- $\beta$ 3 in the thymus and periphery [50]. Our results show only a small reduction of the production of Treg in ILN after TGF- $\beta$  of CIA mice during induction of disease. Therefore, the mechanisms involved in Treg development in cancer or autoimmune arthritis may be different.

In established disease, where T cells are already differentiated we did not observe any difference in T cell differentiation between p17 treated and control mice.

## **Conclusions**

Our data provide evidence of ongoing TGF- $\beta$  signaling in RA synovial tissue and show a marginal therapeutic effect of its inhibition in the CIA model. Further studies in

humans are desirable since translation of the animal data to the human disease is difficult considering the different biology of T-cell differentiation.

### **List of abbreviations**

RA: rheumatoid arthritis

CIA: collagen-induced arthritis

CAIA: collagen antibody-induced arthritis

CII: type-II collagen

OA: osteoarthritis

IHQ: immunohistochemical

anti-p-Smad-2/3: anti-phospho-Smad-2/3

CFA: Complete Freund's Adjuvant

ILN: inguinal lymph nodes

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

TGF- $\beta$ RII: TGF- $\beta$  receptor type II

### **Competing Interest**

JD is an employee of Digna Biotech.

**All others author(s) declare that they have no competing interests.**

### **Authors' contributions**

EG, GC and BS participated in the study design, acquisition, analysis and interpretation of data and preparation of the manuscript. JD contributed to the preparation of the manuscript. JLP and MG participated in the conception and design of the study analysis

of data and preparation of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

### **Authors' information**

GC is a recipient of a Miguel Servet Fellowship (FP07/00250) from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

### **Acknowledgements**

This study was supported by FER (Fundación Española de Reumatología) and RIER (Red de Inflamación y Enfermedades Reumáticas RD08/0075).

### **References**

1. Rooney M, Condell D, Quinlan W, Daly L, Whelan A, Feighery C, Bresnihan B: **Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1988, **31**:956-63.
2. Massague J: **The transforming growth factor-beta family.** *Annu Rev Cell Biol* 1990, **6**:597-641.
3. Elliott RL, Blobe GC: **Role of transforming growth factor Beta in human cancer.** *J Clin Oncol* 2005, **23**:2078-93.
4. Varga J, Pasche B. **Transforming growth factor beta as a therapeutic target in systemic sclerosis:** *Nat Rev Rheumatol* 2009, **5**:200-6.
5. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D: **Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease.** *Nature* 1992, **359**:693-9.

6. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W: **A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells.** *Nat Immunol* 2008, **9**:632-40.
7. Nakamura K, Kitani A, Strober W: **Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta.** *J Exp Med* 2001, **194**:629-44.
8. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK: **Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.** *Nature* 2006, **441**:235-8.
9. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT: **Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.** *Nature* 2006, **441**:231-4.
10. Yang L, Anderson DE, Baecher-Allan C, Hastings WD, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK, Hafler DA: **IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells.** *Nature* 2008, **454**:350-2.
11. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F: **Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells.** *Nat Immunol* 2007, **8**:942-9.
12. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR: **The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells.** *Cell* 2006, **126**:1121-33.

13. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y, Ma L, Shah B, Panopoulos AD, Schluns KS, Watowich SS, Tian Q, Jetten AM, Dong C: **T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma.** *Immunity* 2008, **28**:29-39.
14. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C: **A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17.** *Nat Immunol* 2005, **6**:1133-41.
15. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ: **IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation.** *J Exp Med* 2005, **201**:233-40.
16. Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT: **Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease.** *J Clin Invest* 2001, **108**:601-9.
17. Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, Amara A, Curnow SJ, Lord JM, Scheel-Toellner D, Salmon M: **Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium.** *J Immunol* 2000, **165**:3423-9.
18. Cho ML, Min SY, Chang SH, Kim KW, Heo SB, Lee SH, Park SH, Cho CS, Kim HY: **Transforming growth factor beta 1(TGF-beta1) down-regulates TNFalpha-induced RANTES production in rheumatoid synovial fibroblasts through NF-kappaB-mediated transcriptional repression.** *Immunol Lett* 2006, **105**:159-66.

19. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, Sporn MB, Fauci AS: **Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth.** *J Exp Med* 1986, **163**:1037-50.
20. Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH: **Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation.** *Immunol Lett* 2002, **82**:85-91.
21. Brandes ME, Allen JB, Ogawa Y, Wahl SM: **Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals.** *J Clin Invest* 1991, **87**:1108-13.
22. Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggitt HD, Palladino MA, Thorbecke GJ: **Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:2918-21.
23. Allen JB, Manthey CL, Hand AR, Ohura K, Ellingsworth L, Wahl SM: **Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta.** *J Exp Med* 1990, **171**:231-47.
24. Sancho D, Gomez M, Viedma F, Esplugues E, Gordon-Alonso M, Garcia-Lopez MA, de la Fuente H, Martinez AC, Lauzurica P, Sanchez-Madrid F: **CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis.** *J Clin Invest* 2003, **112**:872-82.
25. Thorbecke GJ, Shah R, Leu CH, Kuruvilla AP, Hardison AM, Palladino MA: **Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:7375-9.

26. Sakuma M, Hatsushika K, Koyama K, Katoh R, Ando T, Watanabe Y, Wako M, Kanzaki M, Takano S, Sugiyama H, Hamada Y, Ogawa H, Okumura K, Nakao A: **TGF-beta type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody.** *Int Immunol* 2007, **19**:117-26.
27. Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y: **Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice.** *J Immunol* 2003, **171**:6173-7.
28. Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenende Roo CJ, Joosten L, Avander Berg WB: **Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:650-9.
29. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P: **Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:963-70.
30. Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM, 2<sup>nd</sup>, Pope RM: **TH-17 cells in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**:R93.
31. Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi JI, Kaibara N, Hori A, Iwamoto Y, Yoshikai Y: **Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis* 2008, **67**:1299-304.
32. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P: **TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.** *Nature* 1997, **390**:465-71.
33. Dotor J, Lopez-Vazquez AB, Lasarte JJ, Sarobe P, Garcia-Granero M, Riezu-Boj JI, Martinez A, Feijoo E, Lopez-Sagaseta J, Hermida J, Prieto J, Borrás-

- Cuesta F: **Identification of peptide inhibitors of transforming growth factor beta 1 using a phage-displayed peptide library.** *Cytokine* 2007, **39**:106-15.
34. Gil-Guerrero L, Dotor J, Huibregtse IL, Casares N, Lopez-Vazquez AB, Rudilla F, Riezu-Boj JI, Lopez-Sagaseta J, Hermida J, Van Deventer S, Bezunartea J, Llopiz D, Sarobe P, Prieto J, Borrás-Cuesta F, Lasarte JJ: **In vitro and in vivo down-regulation of regulatory T cell activity with a peptide inhibitor of TGF-beta1.** *J Immunol* 2008, **181**:126-35.
35. Inglis JJ, Criado G, Medghalchi M, Andrews M, Sandison A, Feldmann M, Williams RO: **Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen.** *Arthritis Res Ther* 2007, **9**:R113.
36. Ito Y, Usui T, Kobayashi S, Iguchi-Hashimoto M, Ito H, Yoshitomi H, Nakamura T, Shimizu M, Kawabata D, Yukawa N, Hashimoto M, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Yoshifuji H, Nojima T, Ohmura K, Fujii T, Mimori T: **Gamma/delta T cells are the predominant source of interleukin-17 in affected joints in collagen-induced arthritis, but not in rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 2009, **60**:2294-303.
37. Brennan FM, Chantry D, Turner M, Foxwell B, Maini R, Feldmann M: **Detection of transforming growth factor-beta in rheumatoid arthritis synovial tissue: lack of effect on spontaneous cytokine production in joint cell cultures.** *Clin Exp Immunol* 1990, **81**:278-85.
38. Bira Y, Tani K, Nishioka Y, Miyata J, Sato K, Hayashi A, Nakaya Y, Sone S: **Transforming growth factor beta stimulates rheumatoid synovial fibroblasts via the type II receptor.** *Mod Rheumatol* 2005, **15**:108-13.

39. Pohlers D, Beyer A, Koczan D, Wilhelm T, Thiesen HJ, Kinne RW:  
**Constitutive upregulation of the transforming growth factor-beta pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.** *Arthritis Res Ther* 2007, **9**:R59.
40. Fava RA, Olsen NJ, Postlethwaite AE, Broadley KN, Davidson JM, Nanney LB, Lucas C, Townes AS: **Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia.** *J Exp Med* 1991, **173**:1121-32.
41. Wahl SM, Allen JB, Costa GL, Wong HL, Dasch JR: **Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor beta.** *J Exp Med* 1993, **177**:225-30.
42. Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B: **Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease.** *Nat Immunol* 2006, **7**:1151-6.
43. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, Ramos HL, Wei L, Davidson TS, Bouladoux N, Grainger JR, Chen Q, Kanno Y, Watford WT, Sun HW, Eberl G, Shevach EM, Belkaid Y, Cua DJ, Chen W, O'Shea JJ: **Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling.** *Nature* 2010, **467**:967-71.
44. Roark CL, French JD, Taylor MA, Bendele AM, Born WK, O'Brien RL:  
**Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma delta T cells.** *J Immunol* 2007, **179**:5576-83.
45. Raposo BR, Rodrigues-Santos P, Carvalheiro H, Agua-Doce AM, Carvalho L, Pereira da Silva JA, Graca L, Souto-Carneiro MM: **Monoclonal anti-CD8**

- therapy induces disease amelioration in the K/BxN mouse model of spontaneous chronic polyarthritis.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**:2953-62.
46. Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, Snijders A, Offringa R, de Vries RR, Toes RE: **CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis.** *Arthritis Rheum* 2003, **48**:1452-60.
47. Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S: **Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:770-4.
48. Christ M, McCartney-Francis NL, Kulkarni AB, Ward JM, Mizel DE, Mackall CL, Gress RE, Hines KL, Tian H, Karlsson S: **Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice.** *J Immunol* 1994, **153**:1936-46.
49. Ouyang W, Beckett O, Ma Q, Li MO: **Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development.** *Immunity* 2010, **32**:642-53.
50. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY: **TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells.** *J Exp Med* 2005, **201**:1061-7.

### **Legend to Figure**

**Figure 1. Active TGF- $\beta$  signaling in synovial tissues.** Immunodetection of p-Smad-2/3 and Smad-7 in RA (A-B), OA (C-D) and healthy (E-F) synovial tissues. Arrows show p-Smad-2/3 in mononuclear cell aggregates of RA synovial tissue. Representative results of immunolabeling. Original magnification X400.

**Figure 2. Blockade of TGF- $\beta$  signaling during CIA induction.** **A**, Delayed arthritis onset in mice treated with p17 ( $\blacktriangle$ ) compared to control mice ( $\square$ ). **B**, Decreased severity of CIA in p17 treated mice. Clinical scores were evaluated daily during 6 weeks after induction of arthritis in mice treated with p17 or vehicle (PBS). **C**, Representative hematoxylin-eosin and safranin O staining of the tarsal-metatarsal joint collected from DBA/1 mice at 6 weeks after immunization. Histological joint inflammation (left panels) and cartilage damage (right panels) in p17-treated mice (down), PBS-treated mice (middle) and healthy (non immunized) mice (up) are shown. Original magnification: x 100. Results from 1 representative of 3 independent experiments are shown.

**Figure 3. Effect of specific blockade of TGF- $\beta$ 1 during induction of CIA on T-cell responses.** **A**, Comparable frequency of cytokine producing (left panel) and regulatory T CD4<sup>+</sup> cells (right panel) in PBS and p17 treated mice. **B**, T-cell responses to CII in p17 treated mice. Cells from ILN were cultured for 72 hours with or without chicken CII (50 $\mu$ g/ml) and proliferation (left panel) and IL-17 and IFN- $\gamma$  production (right panel) were assessed. Results shown are from 1 representative of 3 independent experiments.

**Figure 4. In vivo responses after blockade of TGF- $\beta$  during CIA induction.** **A**, Serum levels of IL-6 at 2 and 6 weeks after immunization in CIA mice treated with p17 at the time of immunization. **B**, Anti-CII antibodies (IgG1 and IgG2a) in p17 treated mice at 2 and 6 weeks. Results are expressed in Relative Units per ml (RU/ml). **C**, mRNA expression of cytokines and transcription factors in paws of CIA mice treated

with PBS (□) and p17 (▲). Results are expressed in arbitrary units normalized for the expression of GAPDH in each sample. Data shown in **A** and **B** are from 1 representative of 3 independently experiments. Data in **C** are pooled from 2 experiments.

**Figure 5. T cell responses in CIA mice with established disease after specific blockade of TGF-β1.** **A**, Frequency of cytokine producing and regulatory T CD4<sup>+</sup> cells in PBS and p17 treated mice. **B**, Response to CII (50μg/ml) was assessed in p17 and PBS treated mice as described figure 3. Results (mean ± SEM) shown are from 1 representative of 3 independent experiments.

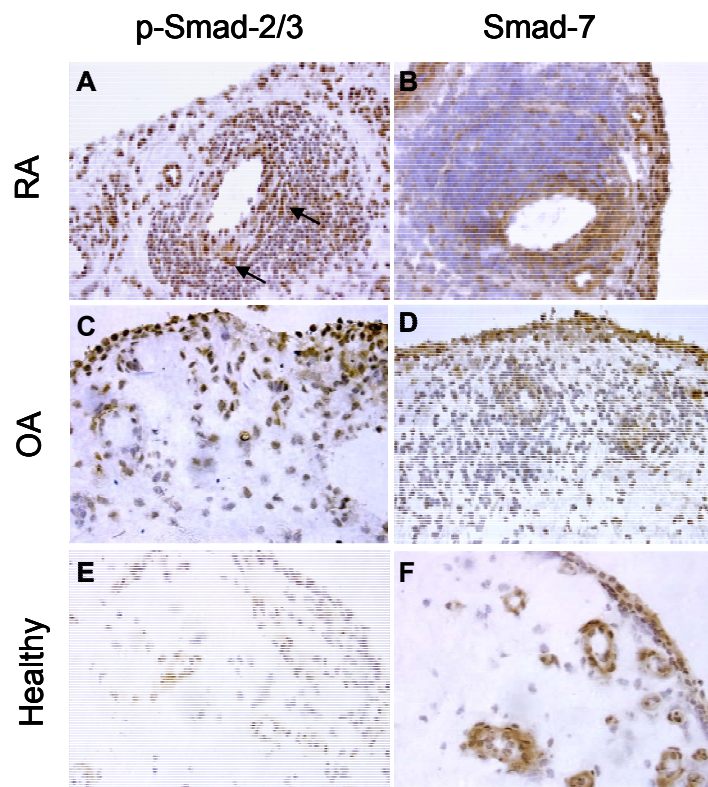
**Figure 6. In vivo responses after blockade of TGF-β in mice with established arthritis.** **A**, Production of IgG1 and IgG2a anti-CII antibodies (RU/ml) and IL-6 (pg/ml) in serum of arthritic mice treated during established disease. Expression of cytokines and transcription factors in spleen **B**, and inflamed paws **C**, of arthritic mice after blockade of TGF-β were analyzed by quantitative RT-PCR. \*p<0,05. \*\*p<0,01. Results are expressed in arbitrary units using GAPDH as endogenous reference in each sample. Data shown in **A** and **B** are from 1 representative of 3 independently experiments. Data in **C** are pooled from 2 experiments.

## **Additional files**

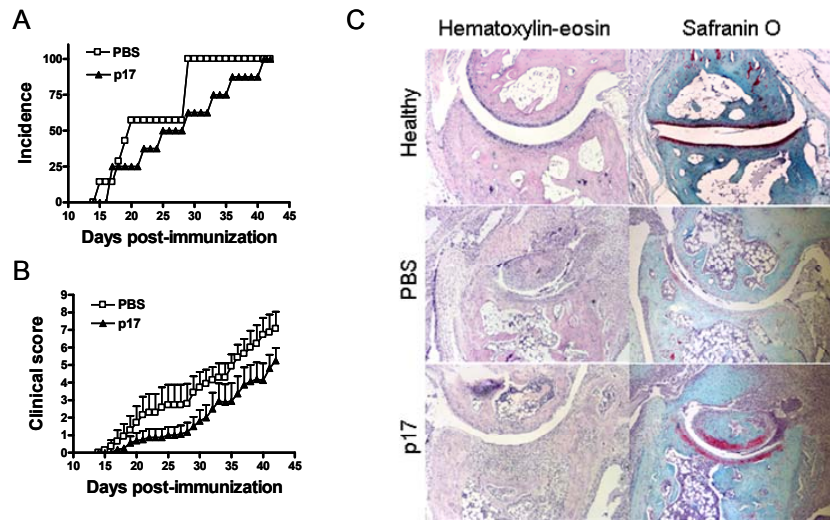
### **Figure legends**

**Additional file 1. Blockade of TGF-β signaling during CIA induction.** Delayed arthritis onset **A**, and decreased severity **B**, in mice treated with p17 (▲) compared to control mice (□) during induction of disease. Results from 2 independent experiments are shown.

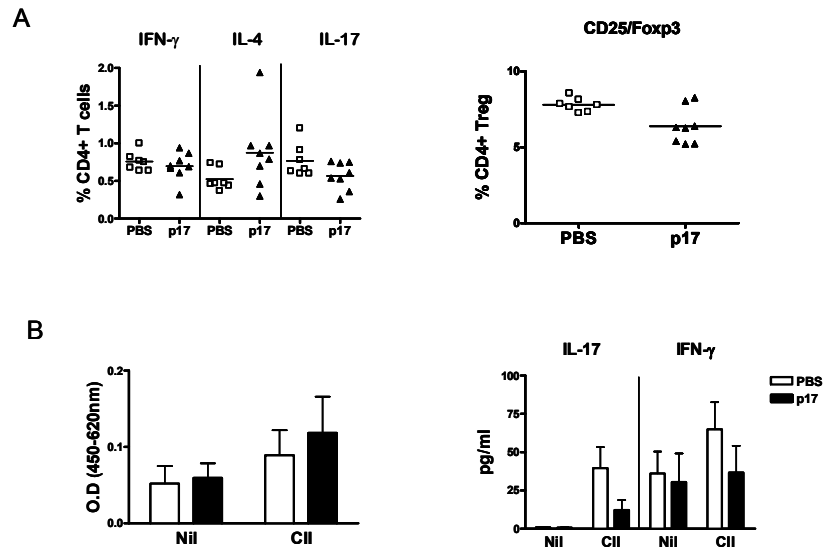
**Additional file 2. Blockade of TGF- $\beta$  signaling in established arthritis. A,** Reduced severity of CIA in p17 treated mice. The severity of clinical signs was measured for 10 days in arthritic mice treated with PBS or p17 and comparable data were observed in different experiments. **B,** Representative hematoxylin-eosin and safranin O staining of the tarsal-metatarsal joint collected on day 10 after arthritis onset in mice treated/not treated with p17. Histological joint inflammation (left panels) and cartilage damage (right panels) in p17-treated mice (down) and PBS-treated mice (middle) compared to healthy non-immunized mice (up). Original magnification: x 100. Mean histological and cartilage damage scores of treatment groups in arthritic DBA/1 on day 10 after arthritis onset. Results shown are from 1 representative of 3 independent experiments.



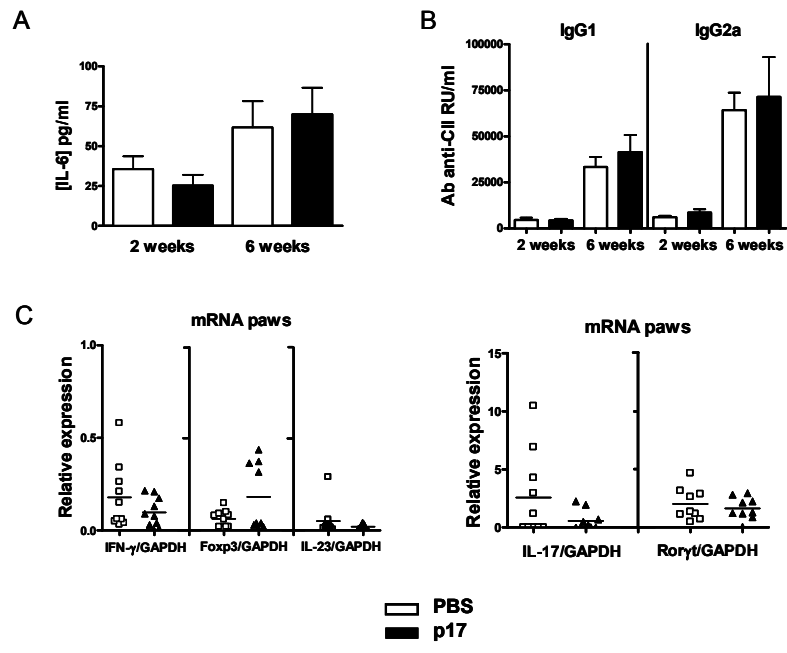
**Figure 1**



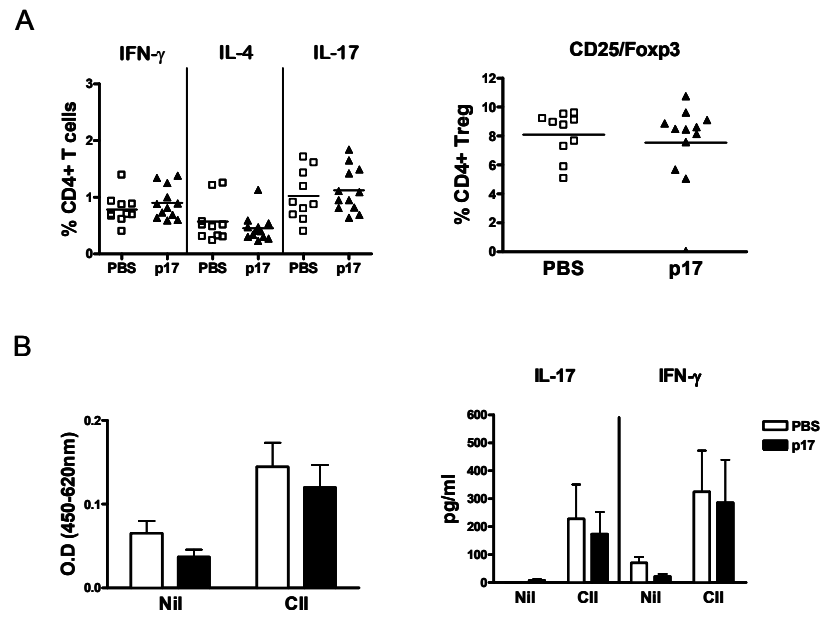
**Figure 2**



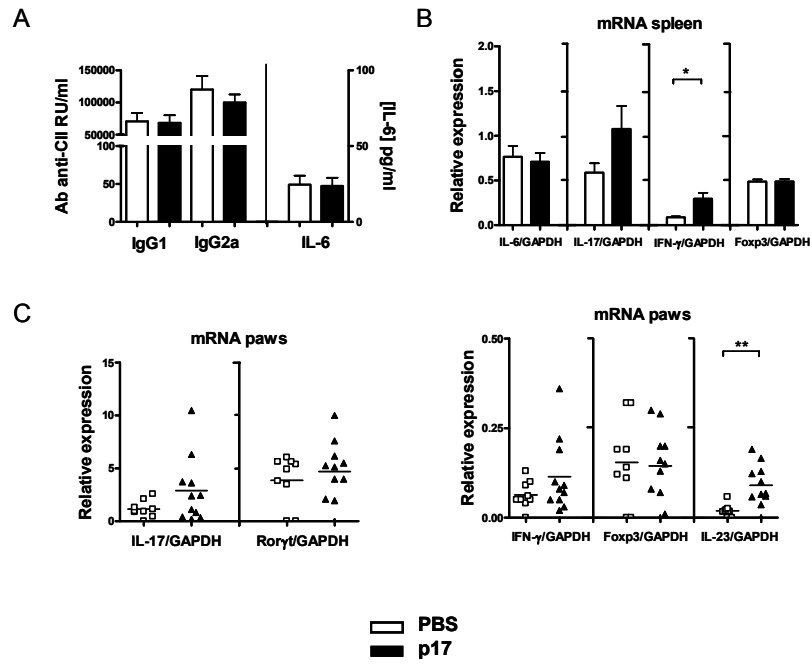
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

**Additional files provided with this submission:**

Additional file 1: Additional file 1.pdf, 17K

<http://arthritis-research.com/imedia/3092879098039326/supp1.pdf>

Additional file 2: Additional file 2.pdf, 126K

<http://arthritis-research.com/imedia/1407970124803932/supp2.pdf>



Otros artículos publicados por el autor durante la realización de esta Tesis doctoral:

- **Elena Gonzalo**, Oscar Toldos, Maria P Martinez-Vidal, Maria C Ordoñez, Begoña Santiago, Antonio Fernández-Nebro, Estibaliz Loza, Isabel García, Myriam León, José L Pablos and María Galindo. *Clinicopathological correlations of renal microthrombosis and inflammatory markers in proliferative lupus nephritis*. *Arthritis Research & Therapy*, 2012. 14:R126.
- Manuel J. Del Rey, Elena Izquierdo, Alicia Usategui, **Elena Gonzalo**, Francisco J. Blanco, Francesco Acquadro and José L. Pablos. *The Transcriptional Response to Hypoxia of Normal and Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts*. *Arthritis Rheum*, 2010. 62(12): 3584-94.
- Galindo M, **Gonzalo E**, Martinez-Vidal MP, Montes S, Redondo N, Santiago B, Loza E, Pablos JL. *Immunohistochemical Detection of Intravascular Platelet Microthrombi in Patients with Lupus Nephritis and Antiphospholipid Antibodies*. *Rheumatology*, 2009. 48(8): 1003-7.

