



UNIVERSIDAD
NACIONAL DE
SAN MARTÍN

I N T E C H

Universidad Nacional de San Martín

Escuela de Ciencia y Tecnología

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas

Instituto Tecnológico de Chascomús

(CONICET – UNSAM)

Tesis para optar al título de Doctor en Biología Molecular y Biotecnología

Análisis de variantes de *splicing* del receptor II de TGF- β como posibles biomarcadores y blancos terapéuticos de artritis

Tesista: **Preisegger Matías Adán**

Director de tesis: **Prof. Dr. Dewey Ricardo Alfredo**

Codirector: **MD. MBA. CPI. Velasco Zamora Jorge**

La ciencia no es cara, cara es la ignorancia

Bernardo Houssay

A mi vieja

Merecedora de cada logro que pueda alcanzar

Agradecimientos

Al Instituto de Investigaciones Biotecnológicas - Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), CONICET-UNSAM, por haberme dado un lugar para trabajar en sus instalaciones.

A la Universidad Nacional de San Martín, por brindarme la posibilidad de hacer un doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), instituto Médico CER y la Fundación Articular por haber financiado con becas mis estudios de doctorado.

Al Dr. Ricardo Dewey por su confianza y dedicación.

A Jorge Velasco Zamora, por permitirme formar parte de la comunidad del instituto médico CER y apostar a mi formación.

A Sebastián Orlowski por aceptar y formar parte del trabajo llevado a cabo en esta tesis.

A mis compañeras del laboratorio de rodilla, las cuales han hecho todo esto mucho más fácil: Mamá Tania, con sus consejos y el “hace mate”; Marce, con su humor y el gif/el capítulo de los simpsons adecuado para cada situación; la tía Anita, con sus mangazos de torta y sus campañas anti-pañuelo de tela; y Pame, juventud y voz de mando de la UB6.

Al plantel de la ruta 2, principalmente a Leito por el aguante y las horas de ruta/mate/futbol/política compartidas.

A los vecinos de UB6: Marian, Vale, Checho, Sofi, Andrés y Edwin; por los mates, cafés y camaradería.

A Fotoquímica, bunker amigo. La sra. Lis, Charly, Fede, Gaby, Omar y especialmente al negro por bancarme en Chascomús siempre.

A las vecinas de flujo: la gran Agus, Lau, Coti y Marisol, por soportar mi música y acompañar tantas horas ahí dentro.

A Marion, Jara, Cebo, Franco, Mati, Flaco, Inés, Vale y resto de la comunidad del INTECH, por la predisposición y la buena onda brindada.

A mi familia, especialmente al tío Fer por apoyar mi carrera en los momentos más complicados.

A los amigos de La Plata y Daireaux. El gran Cinto, Fafa, Pampa, Juampino, Narigón, Nere, Flor, Sol, Agus, Juancito, Marquitos, Dante, Pai, Mati, Carolina, La banda del ángel y Los mejores; por estar y alentarme en este proceso.

A Ricardo, Bel y Juan por acompañar siempre.

A Ariadna, mi compañera de equipo, la que me hace jugar mejor.

Publicaciones

Parte de los resultados de la presente tesis formaron parte de las siguientes publicaciones:

Patentes:

-“TGF- β receptor II isoform, fusion peptide, methods of treatment and methods in vitro”. **Preisegger M**, Dewey RA, Velasco Zamora J, Rodríguez TM, Chisari AN, La Colla A, Vázquez P, Bertolio M, Romo A. **Continuation-in-part of US Application No. 15/105,162** filed June 16, 2016, entitled, ISOFORM OF THE TGF-BETA RECEPTOR II, which is a national stage entry of PCT/US2014/071338 filed December 19, 2014, under the International Convention claiming priority over US Provisional Patent Application No. 61/917,974 filed December 19, 2013. **Licenciada a la empresa RADBIO SAS mediante Convenio de Licenciamiento Resolución-2019-890-APN-DIR#CONICET.** (<https://patents.google.com/patent/WO2015095628A1>).

-“Método para determinar la actividad de enfermedades autoinmunes y kit”. **Preisegger M**, Dewey RA, Carrea A, Perone MJ, Velasco Zamora J. **Solicitud de Patente PCT/ES2017/070752**, presentada el 14/11/2017. Publicación Internacional WO/2018/087416, 17/05/2018. **Licenciada a la empresa RADBIO SAS mediante Convenio de Licenciamiento Resolución-2019-890- APN-DIR#CONICET.** (<https://patentscope.wipo.int/search/zh/detail.jsf;jsessionid=E4440D0A3115F5912B333DA261F025A3.wapp2nB?docId=WO2018087416&recNum=93&office=&queryString=%28ANA%3AES%29&prevFilter=&sortOption=%E5%85%AC%E5%B8%83%E6%97%A5%E9%99%8D%E5%BA%8F&maxRec=34312>).

-“Método para determinar la actividad de enfermedades autoinmunes y kit”. **Preisegger M**, Dewey RA, Carrea A, Perone MJ, Velasco Zamora J. Solicitud de patente número de acta 20160103481, INPI 14/11/2016. Publicación Boletín 994 INPI, AR107780 A1, 06/06/2018. **Licenciada a la empresa RADBIO SAS mediante Convenio de Licenciamiento Resolución-2019-890-APN-DIR#CONICET.**

Introducción

1. Factor de crecimiento transformante β	11
1.1 Isoformas, estructura y activación de TGF- β	11
1.2 Receptores de TGF- β	12
1.3 Vías de señalización de TGF- β	12
1.4 Variantes de <i>splicing</i> de TGFBR2	14
1.5 Receptores mutantes, receptores solubles recombinantes y solubles endógenos de TGF- β	16
1.6 Regulación del sistema inmune por TGF- β	18
1.6.1 Efectos sobre linfocitos T	19
1.6.2 Efectos sobre linfocitos B	20
1.6.3 Efectos sobre células NK	20
1.6.4 Efectos sobre monocitos/macrófagos	20
1.6.5 Efectos sobre granulocitos	21
1.6.6 Acción de TGF- β sobre las MSC	21
2.Artritis	22
2.1 Artritis reumatoidea	23
2.1.1 Epidemiología y etiología	23
2.1.2 Patología y características clínicas.....	23
2.1.3 Clasificación, diagnóstico y evaluación de la actividad de la AR	25
2.1.4 Tratamientos y evaluación de la respuesta terapéutica.....	28
2.1.5 Remisión de la AR	29
2.1.6 TGF- β y AR	29
2.1.6.1 Efectos de TGF- β sobre leucocitos en AR.....	30
2.1.6.2 Mecanismos de acción de TGF- β en AR	31
2.2 Osteoartritis	34
2.2.1 Epidemiología y etiología	35
2.2.2 Clasificación y diagnóstico de la OA	35
2.2.3 Tratamientos y evaluación de la respuesta terapéutica.....	36
2.2.4 TGF- β y OA.....	36
2.2.4.1 Niveles de TGF- β en articulaciones sanas y articulaciones de OA	37
2.2.4.2 Efecto del TGF- β en cartílago	38
2.2.4.3 Efecto del TGF- β en hueso	39
2.2.4.4 Células madre mesenquimales (MSC) y OA	40
2.2.4.5 Células madre mesenquimales (MSC), TGF- β y OA	42

Objetivos

Objetivos generales	42
Objetivos específicos Capítulo 1: TGFBR2 y artritis reumatoidea.....	42
Objetivos específicos Capítulo 2: TGFBR2 y osteoartritis	42

Materiales y métodos

1. Materiales	45
1.1 Cepa bacteriana y plásmidos.....	45
1.2 Líneas celulares y cultivos primarios	46
1.3 Enzimas	46
1.4 Citoquinas/ Anticuerpos	46
2. Métodos	47
2.1 Procedimientos microbiológicos	47
2.1.1 Preparación de bacterias competentes químicas	47
2.1.2 Transformación de bacterias competentes químicas	47
2.2 Técnicas de biología molecular	47
2.2.1 Extracción de ARN.....	47
2.2.2 Generación de ADN complementario (ADNc).....	47
2.2.3 RT-PCR y RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)	48
2.2.4 Preparación de ADN plasmídico en gran escala (maxipreparación)	48
2.2.5 Obtención y cuantificación de proteínas	48
2.3 Procedimientos con cultivos celulares eucariotas	49
2.3.1 Aislamiento de leucocitos de sangre periférica humana.....	49
2.3.1.1 Separación de células sanguíneas	49
2.3.1.2 Fijación, permeabilización y marcación intracitoplasmática	49
2.3.1.3 Inmunoseparación magnética de subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica....	49
2.3.2 Aislamiento de células mesenquimales (MSC).....	50
2.3.2.1 Aislamiento de células mesenquimales estromales de tejido adiposo (ASC).....	50
2.3.2.2 Aislamiento de células mesenquimales de líquido sinovial (LS-MSC OA) y lavado articular postrauma (LS-MSC No-OA).....	50
2.3.2.3 Diferenciación de MSC hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico	51
2.3.3 Producción de vectores lentivirales.....	52
2.3.4 Titulación de los sobrenadantes virales.....	52
2.3.5 Transducción de MSC con vectores lentivirales	52
2.3.6 Citometría de flujo	53
2.4 Estadística.....	53

Resultados

-Capítulo 1-TGFBR2 y artritis reumatoidea	54
1. Validación de correlaciones entre los niveles de ARNm de las variantes de <i>splicing</i> TGFBR2A y TGFBR2B en monocitos y determinaciones clínicas de la AR.	55
2. Análisis de un potencial biomarcador de actividad de la AR y simplificación del método de purificación celular.	59
3. Evaluación del porcentaje de neutrófilos TGFBR2-SE positivos como biomarcador de actividad de artritis reumatoidea.....	61
Discusión: TGFBR2 y artritis reumatoidea.....	67
Conclusiones y perspectivas	74
-Capítulo 2-TGFBR2 y osteoartritis.....	76
1. Caracterización de MSC provenientes de líquido sinovial (OA) y lavado articular de artroscopias post traumáticas (No-OA) de humanos.	77
2. Evaluación de los niveles de ARNm de las variantes de <i>splicing</i> del TGFBR2 en LS-MSC.	80
3. Potencial de diferenciación de LS-MSC y su relación con las variantes de <i>splicing</i> del TGFBR2	81
Discusión: TGFBR2 y osteoartritis	99
Conclusiones y perspectivas	105

Consideraciones finales

Referencias bibliográficas

Abreviaturas

ACR: colegio americano de reumatología
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ANOVA: Análisis de varianza
anti-PCC: antipéptidos cíclicos citrulinados
AR: artritis reumatoidea
ARA: asociación americana de reumatismo
ARN: Ácido ribonucleico
ASC: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano
BMP: proteínas morfogénicas óseas
BMSC: MSC derivadas de médula ósea
BSA: seroalbúmina bovina
CMV: citomegalovirus
CRP: proteína C reactiva
Ct: ciclo umbral
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DAS28: marcador de la actividad de la enfermedad mediante la cuenta de 28 articulaciones
DMARD: drogas antirreumáticas modificadoras de la enfermedad
eGFP: proteína fluorescente verde mejorada
EGM: evaluación global de la enfermedad desde el punto de vista del médico
EGP: evaluación global de la enfermedad desde el punto de vista del paciente
ESD: eritrosedimentación
EULAR: liga europea contra el reumatismo
FR: factor reumatoideo
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GDF: factores de diferenciación del crecimiento
HAQ: cuestionario de evaluación de la salud
hASC: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano
HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
HRP: peroxidasa de rábano picante
IFN- γ : interferón γ
IFP: interfalángicas proximales
Ig: inmunoglobulina
IL: Interleuquina
LAP: péptido de latencia asociado
LLC: complejo latente grande
LTBP: proteínas latentes de unión a TGF- β
LTR: Long terminal repeats
MAP: proteínas activadas por mitógenos
MCF: metacarpofalángicas
MIS: sustancia inhibidora de Müllerian
M-MLV: virus de la leucemia murina Moloney
MMP: metaloproteasas de la matriz

MOI: multiplicidad de infección
MSC: Células mesenquimales estromales
MTF: metatarsofalángicas
MTX: metotrexato
NAD: número de articulaciones doloridas
NAI: número de articulaciones inflamadas
NK: natural killer
NSAID: drogas antiinflamatorias no esteroideas
OA: osteoartritis
PBMC: células mononucleares de sangre periférica
PCP: proteína clorofila peridina
PE: ficoeritrina
PEG: polietilenglicol
PIC: cóctel de inhibidores de proteasas
PMA: acetato de forbol miristato
SBE: elementos de unión a Smad
SDS: Dodecilsulfato sódico
SFB: suero fetal bovino
SH: suero humano
SLC: complejo latente pequeño
SSC: dispersión lateral
TGFBR1/2/3: receptor tipo I/II/III de TGF- β
TGF- β : factor de crecimiento transformante β
TNF- α : factor de necrosis tumoral α
T β RIIDN: T β RII dominante negativo
UT: unidades de transducción
VAS: escala analógica visual
VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial
VS: voluntario sano
VSV-G: glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular

Introducción

1. Factor de crecimiento transformante β

El factor de crecimiento transformante beta o TGF- β (por sus siglas en inglés, *transforming growth factor- β*) es una citoquina pleiotrópica, purificada inicialmente a partir de placenta y de plaquetas humanas (Frolik, C. A. *et al.*, 1983; Assoian, R. K. *et al.*, 1983), que tiene efectos sobre la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celulares. Estos efectos afectan múltiples procesos biológicos como el desarrollo embrionario, la carcinogénesis, fibrosis, cicatrización de heridas y las respuestas inmunitarias (Massagué, J., 1990). Gracias a los proyectos de secuenciación del genoma humano y de ratón, se ha establecido que los genomas de los mamíferos codifican 33 polipéptidos relacionados con la superfamilia de TGF- β , que incluye las tres isoformas de TGF- β y a su vez se encuentra integrada por activinas, inhibinas, BMP (por sus siglas en inglés, *bone morphogenetic proteins*), GDF (por sus siglas en inglés, *growth differentiation factors*), MIS (por sus siglas en inglés, *Müllerian inhibiting substance*), Nodal y leftys (Morikawa, M. *et al.*, 2016; Chang, H. *et al.*, 2002).

1.1 Isoformas, estructura y activación de TGF- β

En mamíferos se han identificado tres isoformas de TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3; codificadas por genes diferentes que presentan entre un 60 y 80% de homología (Penn, J. W., *et al.*, 2012). Las tres isoformas están presentes de manera abundante durante el desarrollo y muestran patrones de expresión temporal y espacial distintos y superpuestos. Cada una cumple un rol diferente, cuya naturaleza depende del tipo celular, de su estado de diferenciación, de las condiciones de crecimiento y de otros factores de crecimiento presentes (Govinden, R. *et al.*, 2003). TGF- β 1 es la isoforma más común, se expresa en células y tejidos normales y malignos y su actividad biológica e interacción con receptores celulares de superficie han sido estudiadas exhaustivamente.

Los fenotipos resultantes del *knockout* de las tres isoformas de mamíferos son muy diferentes. Ratones *knock-out* para TGF- β 1 presentan 20 días después del nacimiento un síndrome de desgaste acompañado de una respuesta inflamatoria celular mixta multifocal y necrosis tisular, lo que lleva a un fallo de sus órganos y la muerte dentro de las tres a cuatro semanas del nacimiento (Shull, M. M. *et al.*, 1992; Kulkarni, A. B. *et al.*, 1993). Ratones *knock-out* para TGF- β 2 exhiben una alteración grave en el desarrollo de muchos tejidos, afectándose principalmente las interacciones epitelio-mesénquima, el crecimiento celular, la producción de matriz extracelular y la remodelación de tejidos. Lo que produce defectos cardíacos congénitos, defectos del esqueleto, paladar hendido y defectos urogenitales, y la mayoría de los ratones mueren al nacer. (Sanford, L. P. *et al.*, 1997). Ratones que carecen de TGF- β 3 mueren dentro de las 20 horas luego del nacimiento, con un fenotipo caracterizado por palatogénesis defectuosa y desarrollo pulmonar tardío (Kartinen, V. *et al.*, 1995). Esto indica que estos ligandos tienen actividades específicas incapaces de ser compensadas con las presencias de los otros miembros de la familia (Sanford, L. P. *et al.*, 1997).

La forma bioactiva de los TGF- β , de 25 kDa, consiste en dos cadenas peptídicas maduras unidas por puentes disulfuro. Generalmente, los TGF- β se encuentran como homodímeros (TGF- β 1.1, TGF- β 2.2, TGF- β 3.3), aunque también se han identificado moléculas heterodiméricas en extractos óseos bovinos (TGF- β 1.2 y TGF- β 2.3) (Ogawa, Y. *et al.*, 1992).

1.2 Receptores de TGF- β

En células de mamíferos, la mayoría de las respuestas a TGF- β están mediadas por los receptores de superficie tipo I (TGFBR1) y tipo II (TGFBR2), los cuales se expresan en múltiples tipos celulares y tejidos (Massagué, J. *et al.*, 1994). El clonado molecular de TGFBR1 y TGFBR2, de 55 kDa y 70 kDa respectivamente, ha demostrado que son miembros de una familia de proteínas con una pequeña región extracelular rica en cisteínas, un dominio simple transmembrana y un dominio serina/treonina quinasa citoplasmático (Franzén, P. *et al.*, 1993, Lin, H. Y. *et al.*, 1992). Entre los dominios quinasa de TGFBR1 y TGFBR2 existe un 40% de homología. En el caso del receptor de TGF- β de tipo I o ALK (de sus siglas en inglés, *activin receptor-like kinase*) se conocen 7 receptores en mamíferos (ALK 1-7). En la mayoría de los tipos celulares estudiados TGF- β utiliza a ALK-5 y TBR11-A para mediar la señalización intracelular. Los receptores tipo I presentan, en la porción citoplasmática precedente al dominio quinasa, una región altamente conservada de 30 aminoácidos que se conoce como dominio GS, debido a que se trata de una secuencia rica en glicinas y serinas (Wrana, J. L. *et al.*, 1994a).

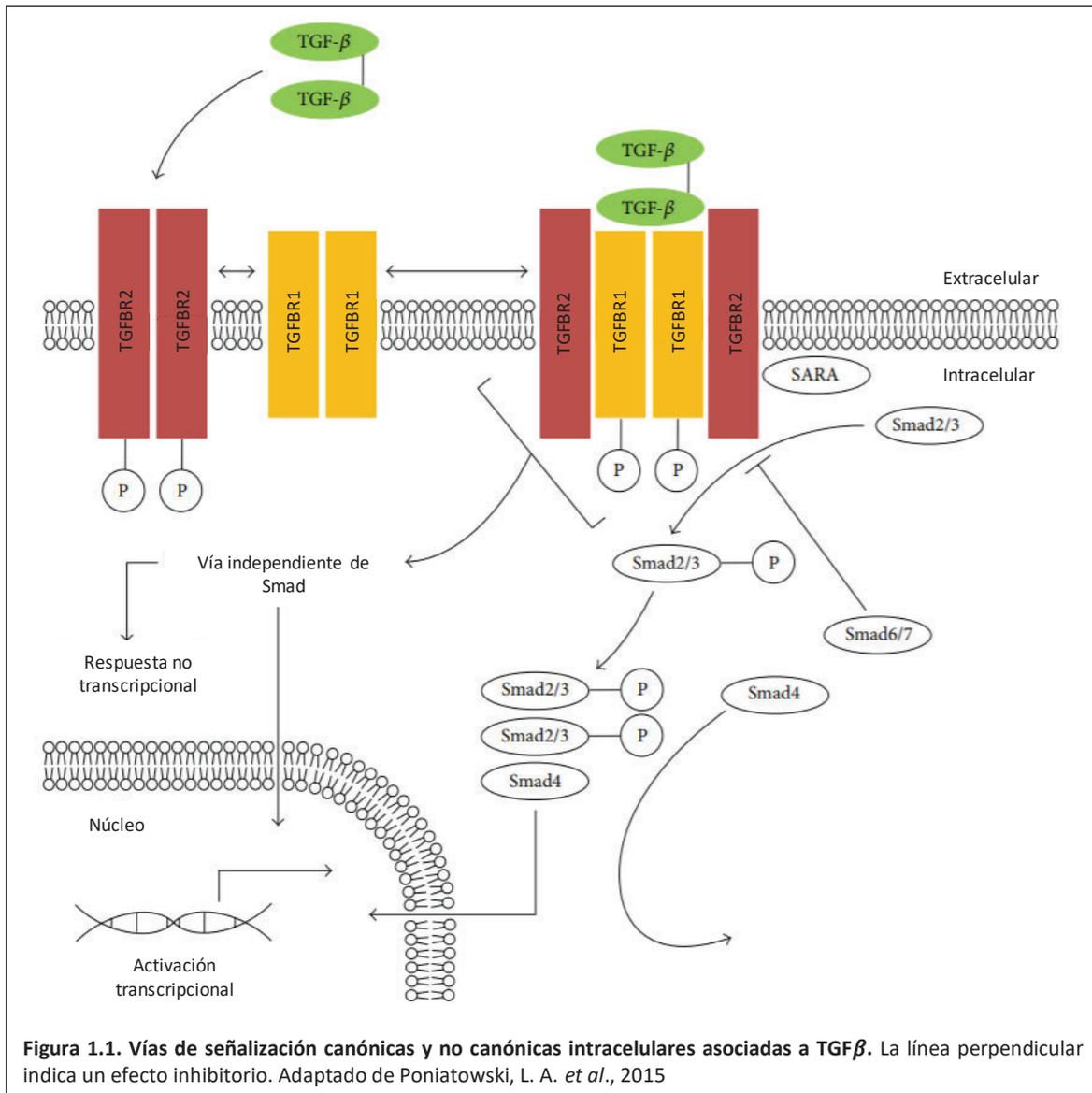
La eficiencia y especificidad de la unión de TGF- β al complejo receptor formado por TGFBR1 y TGFBR2 está definida, en parte, por el receptor tipo III de TGF- β o TGFBR3, también conocido como betaglicano. Este receptor, un proteoglicano anclado a membrana de 100 - 280 kDa, se expresa de manera ubicua en casi todos los tipos celulares, puede unirse a las tres isoformas de TGF- β y presenta un dominio citoplasmático corto sin un motivo de señalización aparente (López-Casillas, F. *et al.*, 1991). Por otro lado, el dominio extracelular de TGFBR3 puede ser escindido proteolíticamente, lo que produce un receptor soluble o sTGFBR3. Esta isoforma es capaz de antagonizar los efectos del receptor unido a membrana, aunque también se ha visto que en presencia de una baja concentración de TGF- β , sTGFBR3 puede favorecer la unión de TGF- β a TGFBR2 (Gatza, C. E. *et al.*, 2010).

1.3 Vías de señalización de TGF- β

Evidencias genéticas de células mutantes resistentes a la acción de TGF- β sugieren que tanto el receptor tipo I como el tipo II son requeridos para la señalización de TGF- β (Wrana, J. L. *et al.*, 1992). De hecho, TGF- β induce la formación de heterocomplejos de TGFBR1 y TGFBR2 (Wrana, J. L. *et al.*, 1992; Franzén, P. *et al.*, 1993), principalmente heterotetrámeros formados por dos moléculas de cada uno de los receptores (Yamashita, H. *et al.*, 1994).

TGFBR2 es una quinasa constitutivamente activa que se encuentra autofosforilada. TGF- β 1 se une directamente a TGFBR2, TGFBR1 es luego reclutado al complejo y es fosforilado por TGFBR2 en su dominio GS (Wrana, J. L. *et al.*, 1994b; Cárcamo, J. *et al.*, 1995; Souchelnytskyi, S. *et al.*, 1996). A continuación, TGFBR1 se asocia transitoriamente con proteínas R-Smad (R-Smad2 y R-Smad3) y las fosforila en sus extremos C-terminales ricos en serinas. Luego, cada R-Smad fosforilada se disocia del receptor y forma un complejo con Co-Smad4. Este complejo de proteínas Smad es translocado al núcleo donde, junto con otros factores de transcripción, se une a secuencias específicas en el ADN, denominadas SBE (por sus siglas en inglés, *Smad-binding elements*), para regular la transcripción de una gran cantidad de genes (Massagué, J. *et al.*, 2000; Shi, Y. *et al.*, 2003). Uno de los genes activados luego de esta señalización es el que codifica para I-Smad7. La expresión de esta proteína inhibe la señalización desencadenada por TGF- β 1, ya sea mediante competencia con R-

Smad por la unión a TGFBR1 (Suzuki, C. *et al.*, 2002) o mediante la formación de complejos con Smurf1, una ubiquitín ligasa E3, que desencadena la ubiquitinación y posterior degradación de los receptores de TGF- β (Ebisawa, K. *et al.*, 2001). Un esquema de esta vía de señalización se muestra en la Figura 1.1.



A diferencia de TGF- β 1 y TGF- β 3, TGF- β 2 parece tener un modo de activación de TGFBR2 diferente ya que el receptor posee una afinidad intrínseca muy baja por esta isoforma (Lin, H. Y. *et al.*, 1995). La necesidad de TGFBR3 o betaglicano para que las células respondan al TGF- β 2 ha sido descrita en distintos tipos celulares (Brown, C. B. *et al.*, 1999). TGFBR3 une a TGF- β 2 y lo presenta a TGFBR2 luego de la oligomerización de ambos tipos de receptores (López-Casillas, F. *et al.*, 1993).

Además de activar la vía canónica de Smads, TGF- β también puede regular procesos celulares a través de vías intracelulares alternativas como la de quinasas MAP, GTPasas tipo Rho,

fosfatidilinositol-3-quinasa, entre otras (Zhang, Y. E., 2009). Esto aumenta aún más la complejidad de la señalización de TGF- β .

Una correcta e ininterrumpida vía de señalización de TGF- β es indispensable para que el desarrollo embrionario y distintas funciones biológicas transcurran normalmente (Massagué, J., 1990). La ausencia de TGF- β o una sensibilidad alterada a la citoquina en algún tejido derivan en condiciones patológicas serias como mortalidad perinatal o posnatal temprana (Shull, M. M. *et al.*, 1992; Kulkarni, A. B. *et al.*, 1993), enfermedades autoinmunes (Kulkarni, A. B. *et al.*, 1993; Kulkarni, A. B. *et al.*, 1995) o cáncer (Massague, J. 2008; Derynck, R. *et al.*, 2001; Siegel, P. M. *et al.*, 2003). Asimismo, la producción excesiva de TGF- β se ha relacionado con acumulación de tejido fibroso cicatrizante (Huang, J. S. *et al.*, 2002), psoriasis (Li, A. G. *et al.*, 2004), glomerulonefritis (Reeves, W. B. *et al.*, 2000), fibrosis pulmonar y hepática (Kaminski, N. *et al.*, 2000), síndrome de Camurati-Engeldman (Saito, T. *et al.* 2001; Tang, Y. *et al.* 2009), inmunosupresión inducida por tumor (de Visser, K. E. *et al.*, 1999) y metástasis (Derynck, R. *et al.*, 2001; Siegel, P. M. *et al.*, 2003).

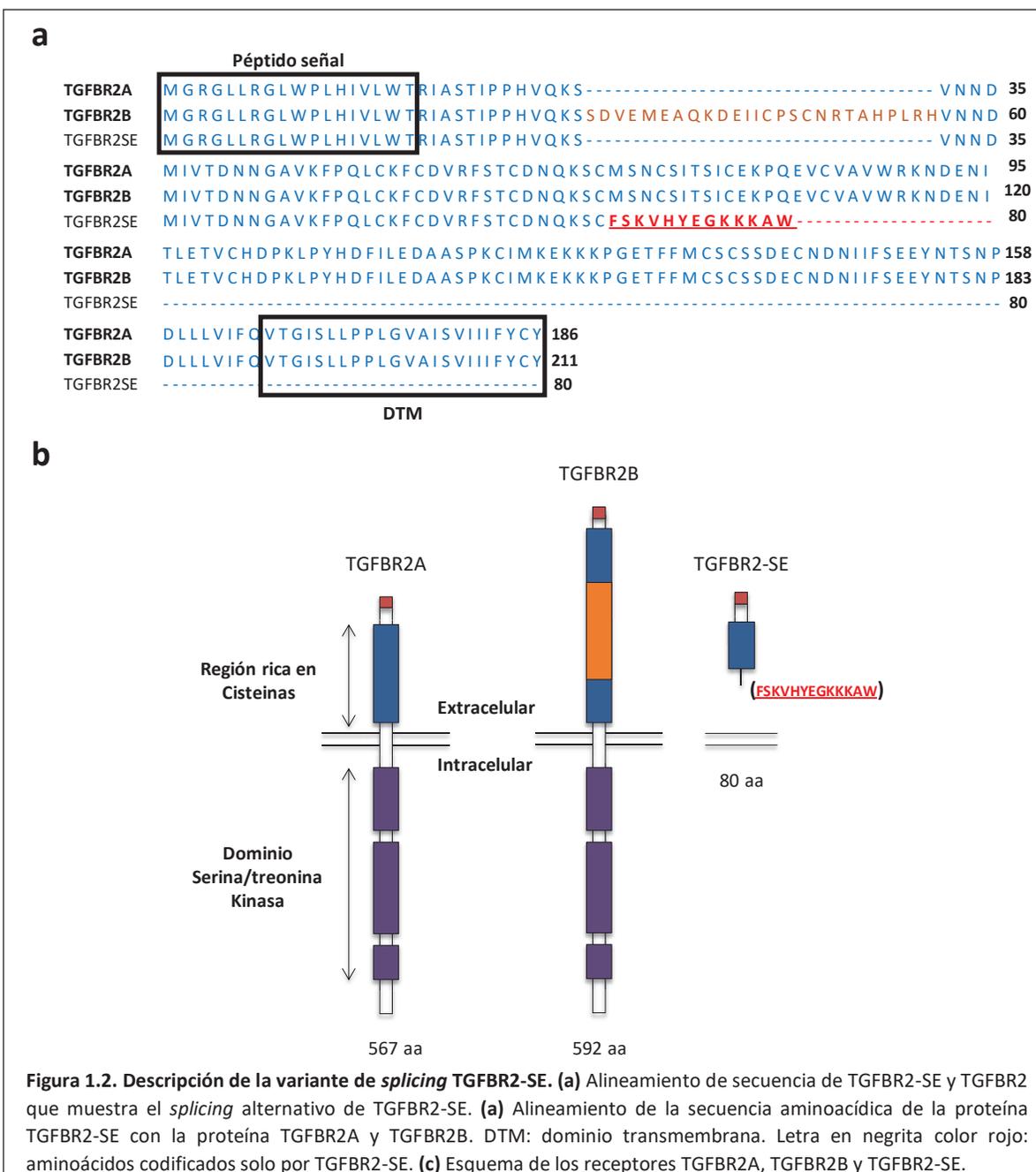
1.4 Variantes de *splicing* de TGFBR2

Se ha caracterizado funcionalmente una isoforma de TGFBR2 que une y señala directamente vía TGF- β 2, sin el requerimiento de TGFBR3. Esta isoforma, llamada TGFBR2B, es una variante producida por *splicing* alternativo de TGFBR2 que resulta en la adición de 75 pb que codifican para 25 aminoácidos en la región N-terminal (dominio extracelular) del receptor maduro. Esta inserción produce, además, un intercambio de isoleucina por valina en el empalme del sitio de *splicing* entre las dos variantes del receptor (Hirai, R. *et al.*, 1996; Rotzer, D. *et al.*, 2001). Más recientemente, se informó que en ausencia de TGFBR3, TGFBR2B requiere del receptor tipo I para unir a TGF- β 2 (del Re, E. *et al.*, 2004).

Se creía que, mientras que TGFBR2A se expresa de manera ubicua en células humanas, la expresión del receptor TGFBR2B en la superficie celular estaba restringida a células humanas relacionadas con la función ósea como osteoblastos fetales y células de osteosarcoma, a pesar de que el ARNm de esta variante de *splicing* también se había detectado en otros tipos celulares, como en la línea derivada de carcinoma hepatocelular humano, Hep 3B, y en la línea derivada de neuroblastoma humano, IMR 32 (Rotzer, D. *et al.*, 2001). Sin embargo, en estudios posteriores se encontró que el receptor TGFBR2B también se expresa en células epiteliales de algunas glándulas prostáticas humanas, mientras que su ARNm se detectó en distintas líneas celulares prostáticas humanas. Por otro lado, en este mismo estudio, se identificó otra variante de *splicing* de TGFBR2, denominada TGFBR2C, que presenta 36 aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal y que se localiza, principalmente, en células epiteliales y musculares de próstata humana (Konrad, L. *et al.*, 2007).

Recientemente en nuestro laboratorio se identificó en células humanas una nueva variante de *splicing* con una delección adicional de 149 nucleótidos en el dominio extracelular correspondiente a los últimos 62 nucleótidos del exón II y de los primeros 87 nucleótidos del exón III del gen *tgfr2* (Figura 1.10). Esta delección en el ARNm de la nueva variante de TGFBR2, produce un cambio en el marco de lectura a partir del aminoácido 68, que se corresponde con la aparición prematura de un codón de terminación, generándose una proteína truncada de sólo 80 aminoácidos. (Carrea A, Tesis doctoral. 2013; Dewey, R. A. *et al.*, Patente de invención: USA y AR. 2014). La nueva isoforma contiene un péptido señal de modo similar a lo que ocurre en las otras 2 isoformas de TGFBR2, pero

difiere con ellas en que carece del dominio de transmembrana. Esta característica hace que se genere una proteína soluble secretable de 57 aminoácidos denominada TGFBR2 Soluble Endógena o TGFBR2-SE. Esta proteína truncada presenta 13 aminoácidos distintivos (FSKVHYEGKKKAW) en el extremo carboxilo terminal que la diferencia de las otras dos isoformas conocidas (figura 1.4). Esto permitió generar un anticuerpo para identificación de TGFBR2-SE tanto por western blot como por citometría de flujo. Si bien el peso molecular de esta isoforma predicho a partir de su secuencia nucleotídica es de 6,5 kDa, análisis por western blot de inmunoprecipitados de lisados celulares revelaron que la proteína TGFBR2-SE madura contiene sumoilaciones tanto con SUMO 1, como con SUMO2/3. (Bertolio, M. *et al.*, 2018; La Colla, A. *et al.*, 2018; Carrea, A. Tesis doctoral 2013) (figura 1.2).



1.5 Receptores mutantes, receptores solubles recombinantes y solubles endógenos de TGF- β

Para bloquear los efectos de la acción de TGF- β tanto *in vivo* como *in vitro*, se han utilizado anticuerpos neutralizantes (Hill C. *et al.* 2001) y oligonucleótidos antisentido (Maggard, M. *et al.*, 2001; Schlingensiepen, K. H. *et al.*, 2011), pero el empleo de un receptor TGFBR2 modificado ha demostrado ser de suma utilidad. Este receptor mutante, que carece del dominio serina/treonina quinasa citoplasmático, funciona como dominante negativo (TGFBR2-DN). La sobreexpresión de TGFBR2-DN interrumpe, específicamente, la señalización mediada por TGF- β . De esta manera se puede estudiar el comportamiento de diversos tipos celulares en ausencia de la acción parácrina y autócrina de la citoquina (Chen, R. H. *et al.*, 1993; Brand, T. *et al.*, 1993; Wieser, R. *et al.*, 1993; Fan, X. *et al.*, 2002). Si bien se conoce la acción del mutante TGFBR2-DN, se desconoce el efecto que produce la eliminación del dominio intracitoplasmático de la variante de *splicing* TGFBR2-B.

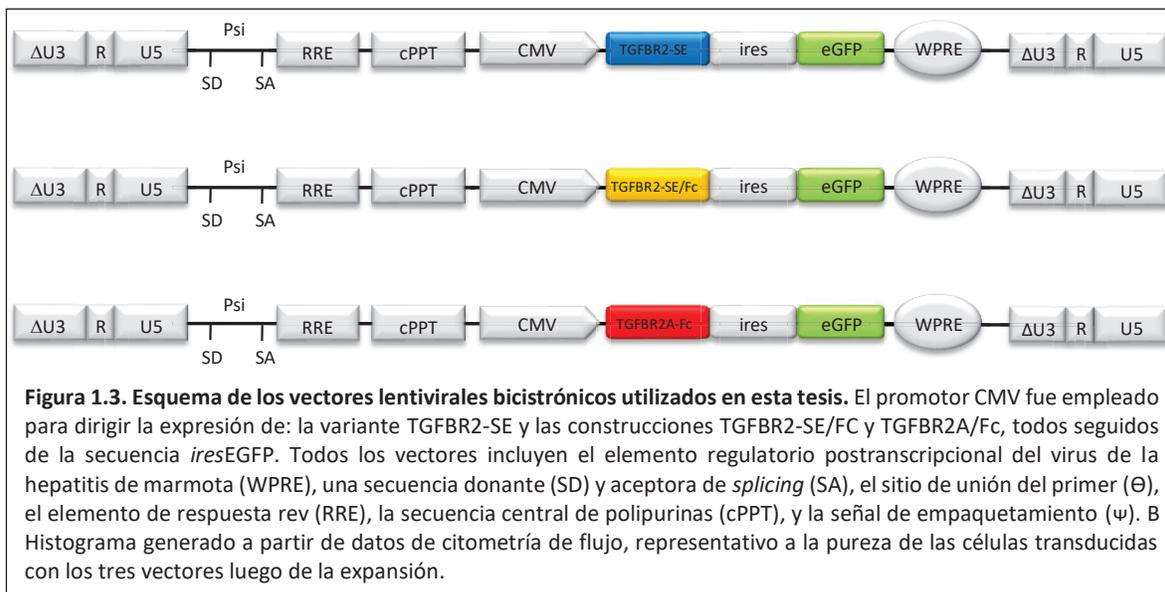
Otra alternativa para antagonizar los efectos de TGF- β , muy utilizada en estudios clínicos, está basada en el uso de una variante soluble de TGFBR2 (sTGFBR2/Fc) (Isaka, Y. *et al.*, 1999; Muraoka, R. S. *et al.*, 2002; Yang, Y. *et al.*, 2002; Suzuki, E. *et al.*, 2004). Esta versión recombinante consiste en el dominio extracelular del receptor fusionado a la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG1 (Komesli, S. *et al.*, 1998; Smith, J. D. *et al.*, 1999). sTGFBR2/Fc tiene una afinidad muy alta por TGF- β 1 y TGF- β 3, hecho que permitió usarlo para dilucidar la unión de las distintas isoformas de TGF- β a sus receptores (del Re, E. *et al.*, 2004). *In vivo*, sTGFBR2/Fc presenta ciertas ventajas frente a otras moléculas pequeñas usadas para inhibir a TGF- β . Su alto peso molecular (~100 kDa) le confiere una vida media más larga que, junto a su elevada afinidad, aumentan su capacidad de secuestrar bajas cantidades de TGF- β extracelular (Russo, M. L. *et al.*, 2009). Varias empresas farmacéuticas han desarrollado agentes terapéuticos basados en receptores solubles de citoquinas que están siendo ensayados en estudios clínicos. El más conocido en términos de éxito terapéutico y comercial es Etanercept, una proteína de fusión entre el receptor soluble de tipo II de TNF- α y la región Fc de la inmunoglobulina humana IgG1. Este antagonista de TNF- α fue el primer receptor soluble en recibir aprobación para uso en humanos (Moreland, L. W. *et al.*, 1999). Al igual que en sTGFBR2/Fc, la presencia del dominio Fc incrementa en gran medida la vida media de la proteína de fusión en plasma, lo que prolonga su actividad terapéutica y permite una purificación más económica mediante cromatografía de afinidad con proteína A/G.

Un conocimiento más profundo de los mecanismos moleculares que regulan la producción de receptores solubles naturales de citoquinas y de las funciones de estos receptores permitirá mejorar la comprensión de la patogenia de diversas enfermedades y generar nuevas estrategias terapéuticas y de diagnóstico. Además, estos receptores solubles de citoquinas, tanto los producidos naturalmente por las células, como los generados por ingeniería genética, constituyen una nueva generación de agentes terapéuticos con un tremendo potencial para su aplicación en una amplia variedad de enfermedades humanas. En este contexto, el hallazgo de un nuevo receptor soluble endógeno de TGF- β , TGFBR2-SE, y el estudio tanto del mecanismo de acción del mismo, como de sus posibles aplicaciones terapéuticas y como biomarcador resulta sumamente importante.

La aplicación de vectores virales para el *delivery* de genes se realiza en base a su capacidad natural para infectar células. Su utilidad como herramienta relativamente segura en biología molecular es posible gracias a la modificación del genoma viral mediante la supresión de algunas secuencias de

codificación críticas que previenen la replicación espontánea en las células diana (Zufferey, R. *et al.*, 1998).

Con el fin de estudiar el efecto generado por la sobreexpresión de receptores solubles endógenos y sintéticos, han sido diseñados en nuestro laboratorio, los vectores virales auto-inactivantes o Self-nactivating vectors (SIN) (Zufferey R, *et al.* 1998) bicistrónicos con eGFP, conteniendo el cDNA de TGFBR2-SE (pRRL.CMV.TGFBR2-SE.ires.eGFP.WPRE), de TGFBR2-SE fusionado a Fc de IgG1 (pRRL.CMV.TGFBR2-SE/Fc.ires.eGFP.WPRE) y de TGFBR2A/Fc (pRRL.CMV.TGFBR2A/Fc.ires.eGFP.WPRE), denominados Lv-TGFBR2-SE, Lv-TGFBR2A/Fc y Lv-TGFBR2-SE/Fc respectivamente, figura 1.3).



Siguiendo la misma estrategia que la utilizada para sTGFBR2/Fc, en nuestro laboratorio se ha generado y purificado TGFBR2-SE fusionada a Fc de IgG1 lo que ha permitido ampliar el conocimiento sobre esta nueva isoforma y se comenzó a evaluar su potencial terapéutico *in vivo* en modelos animales de fibrosis hepática y cáncer (La Colla, A. *et al.*, 2018).

En línea con la generación de herramientas con el fin de ahondar en el estudio de TGFBR2-SE, se generó un anticuerpo monoclonal murino unido al fluorocromo ATTO647N (Rhea Biotech, Brasil) con fines de detección intracitoplasmática. La especificidad de dicho anticuerpo radica en que fue generado a partir de un péptido sintético compuesto por la secuencia de aminoácidos exclusiva de TGFBR2-SE (FSKVHYEGKKKAW). Utilizando el Kit Cytotfix/ Cytoperm[®] de BD (BD, NJ, USA) y la utilización del anticuerpo Anti-TGFBR2-SE ATTO647N, se detectó la presencia intracitoplasmática de TGFBR2-SE en hASC UT y hASC sobreexpresando TGFBR2-SE mediante citometría de flujo (figura 1.4, Bertolio, M. *et al.*, resultados no publicados). Se utilizó como control negativo un cultivo de A549 ya que se había reportado previamente en nuestro laboratorio que esta línea celular no expresa TGFBR2-SE (Carrea, A. Tesis doctoral 2013).

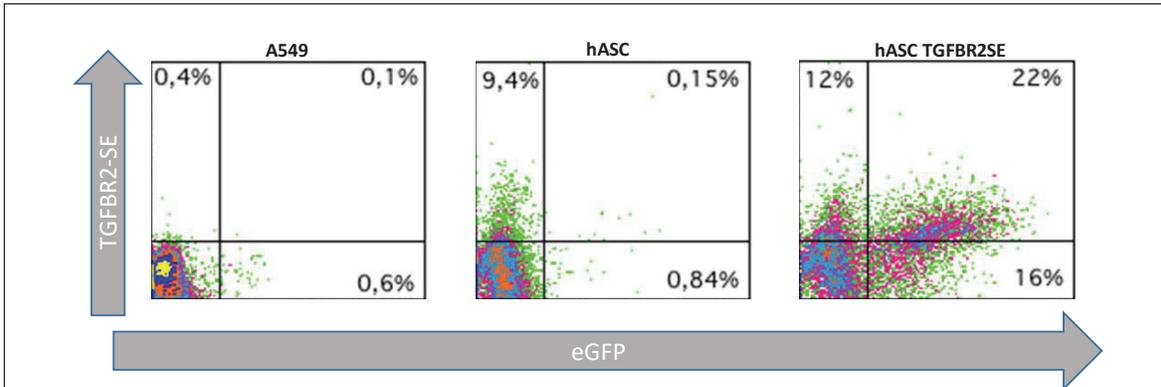
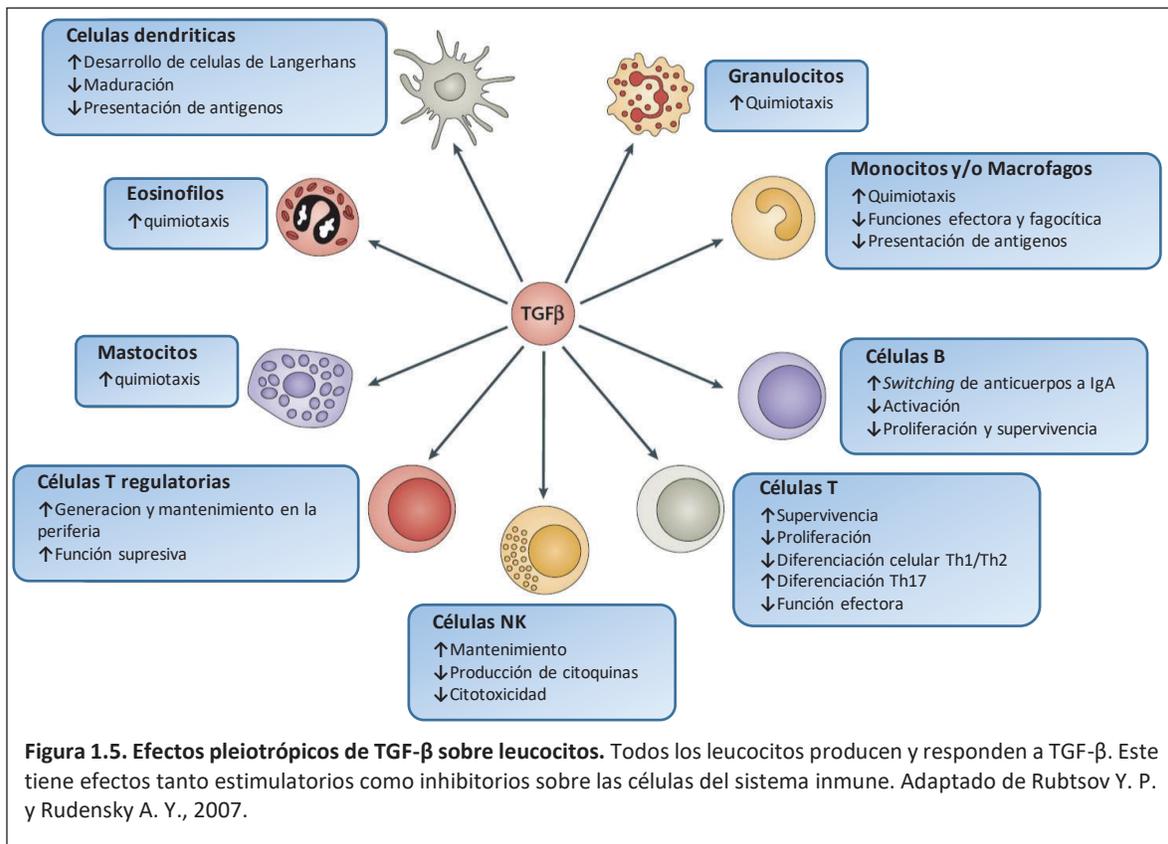


Figura 1.4. Detección intracitoplasmática de TGFBR2-SE. Medida del porcentaje de hASC TGFBR2-SE positivas en cultivos hASC UT y hASC sobreexpresando TGFBR2-SE, tomando como línea de base la máxima fluorescencia de un cultivo de A549.

1.6 Regulación del sistema inmune por TGF- β

La principal función de TGF- β en el sistema inmune es mantener la homeostasis mediante la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos. Además, controla los procesos inflamatorios al regular la quimiotaxis, activación y supervivencia de linfocitos, células *natural killers* (NK), células dendríticas, macrófagos, mastocitos y granulocitos. La regulación ejercida por TGF- β depende del estado de diferenciación celular y de la presencia de citoquinas inflamatorias y de moléculas coestimuladoras. En conjunto, TGF- β inhibe el desarrollo de inmunopatologías contra autoantígenos o antígenos inofensivos sin comprometer las respuestas inmunitarias contra patógenos (Li, M. O. *et al.*, 2006).

En la Figura 1.5 se resumen los efectos que tiene esta citoquina sobre las distintas poblaciones de leucocitos.



1.6.1 Efectos sobre linfocitos T

TGF-β inhibe la proliferación de células T naïve, mientras que tiene un efecto mínimo sobre las células T activadas, hecho que se correlaciona con una baja expresión de TGFBR2 en estas células (Cottrez, F. *et al.*, 2001). La inhibición de la proliferación de células T por TGF-β es un mecanismo importante para mantener la homeostasis de estas células y prevenir desórdenes linfoproliferativos.

TGF-β inhibe la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ en células T *helper* (Th) (Gorelik, L. *et al.*, 2002) y de linfocitos T CD8⁺ en linfocitos T citotóxicos (Ranges, G. E. *et al.*, 1987). La expresión de TGFBR2DN bajo la acción del promotor CD4 bloquea la señalización de TGF-β en células T CD4⁺ y CD8⁺. Ratones con esta modificación desarrollan un fenotipo inflamatorio autoinmune asociado con la diferenciación de células T CD4⁺ en células Th₁ o Th₂ y, espontáneamente, sus linfocitos T CD8⁺ se activan y producen citoquinas efectoras (Gorelik, L. *et al.*, 2000).

Durante la expansión y diferenciación de células T, TGF-β promueve su supervivencia (Li, M. O. *et al.*, 2006).

Las células T supresoras o Treg suprimen las respuestas inmunitarias y mantienen la tolerancia inmunológica. Las Treg naturales son CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (Fontenot, J. D. *et al.*, 2005) y comprenden un 5-10 % de las células T CD4⁺ periféricas (Sakaguchi, S., 2004). TGF-β1 puede convertir células T CD4⁺ CD25⁻ en Treg *in vitro* (Chen, W. *et al.*, 2003).

Tanto células T activadas (Kehrl, J. H. *et al.*, 1986a) como Treg (Nakamura, K. *et al.*, 2001) expresan TGF-β1. Este TGF-β1 impide la activación de células T y el desarrollo de enfermedades inflamatorias.

1.6.2 Efectos sobre linfocitos B

TGF- β inhibe la proliferación de células B, induce apoptosis de células B inmaduras o en reposo y bloquea la activación de estas células (Li, M. O. *et al.*, 2006).

Un rol particular de TGF- β es promover la diferenciación de células plasmáticas secretoras de IgA (McIntyre, T. M. *et al.*, 1995). La inactivación condicional de la señalización de TGF- β en células B de ratón tiene como consecuencia un aumento de las inmunoglobulinas séricas, sin embargo, estos ratones están casi desprovistos de IgA (Cazac, B. B. *et al.*, 2000). Esto sugiere que, *in vivo*, TGF- β es un importante regulador de la tolerancia de las células B a los autoantígenos.

Las células B en reposo expresan ARNm de TGF- β 1, pero secretan bajas cantidades de la proteína. Sin embargo, luego de ser estimuladas producen grandes cantidades de TGF- β 1 (Kehrl, J. H. *et al.*, 1986b). Esto concuerda con el hecho de que bajas dosis de TGF- β 1 promueven la secreción de anticuerpos, mientras que altas dosis la inhiben (Snapper, C. M. *et al.*, 1993).

1.6.3 Efectos sobre células NK

TGF- β es un potente inhibidor de las funciones de las células NK al atenuar su actividad citolítica y la producción de IFN- γ (Rook, A. H. *et al.*, 1986; Bellone, G. *et al.*, 1995). También controla su homeostasis.

Las células NK serían una fuente importante de TGF- β 1 *in vivo* ya que, constitutivamente, producen la citoquina (Gray, J. D. *et al.*, 1998).

1.6.4 Efectos sobre monocitos/macrófagos

En general, TGF- β estimula células en estado de reposo (monocitos), mientras que inhibe células activadas (macrófagos) (Ashcroft, G. S., 1999).

TGF- β recluta monocitos en zonas de heridas o inflamación a través de diferentes mecanismos: actúa como quimioattractor de monocitos (Wahl, S. M. *et al.*, 1987), induce moléculas de adhesión que permiten la unión de monocitos a la matriz extracelular e induce metaloproteasas de la matriz (MMP) que pueden disolver membranas vasculares y facilitar la trans migración de los monocitos (Wahl, S. M. *et al.*, 1993a). Además, potencia la inflamación en monocitos al inducir la síntesis de citoquinas proinflamatorias como IL-1 e IL-6 (Wahl, S. M. *et al.*, 1987; Turner, M. *et al.*, 1990).

Una vez que los monocitos se diferenciaron a macrófagos TGF- β funciona, principalmente, como un inhibidor. Por ejemplo, limita su capacidad fagocítica al disminuir la expresión de receptores *scavenger* (Han, J. *et al.*, 2000) y reduce la fagocitosis de partículas recubiertas con IgG al disminuir la expresión de receptores de IgG en distintas células (Tridandapani, S. *et al.*, 2003).

TGF- β también tiene un efecto inhibitorio sobre la función presentadora de antígenos y sobre la activación de macrófagos. El primer efecto sería importante para resolver una respuesta inmunitaria en curso al disminuir la estimulación de células T en el sitio de infección, mientras que el segundo serviría para terminar un proceso inflamatorio y para prevenir el desarrollo de inmunopatologías (Li, M. O. *et al.*, 2006).

1.6.5 Efectos sobre granulocitos

TGF- β es un potente quimioattractor de neutrófilos (Brandes, M. E. *et al.*, 1991a) y de eosinófilos humanos (Luttmann, W. *et al.*, 1998). Esta citoquina tendría un rol importante en el reclutamiento de células en los sitios de heridas o infección. La quimiotaxis de neutrófilos mediada por TGF- β sería un mecanismo de defensa importante del hospedador.

La regulación de la activación y de las funciones efectoras de los granulocitos por TGF- β es controvertida (Brandes, M. E. *et al.*, 1991a).

El TGF- β 1 derivado de neutrófilos sería relevante en los derrames sinoviales (Fava, R. A. *et al.*, 1991). El producido por eosinófilos estaría involucrado en fibrosis y en el remodelado de las vías aéreas en asma (Munitz, A. *et al.*, 2004).

1.6.6 Acción de TGF- β sobre las MSC

Las MSC en respuesta a señales quimiotácticas, migran a sitios específicos, como sitios de inflamación, donde segregan citoquinas y factores de crecimiento que promueven la inmunosupresión, la regeneración de tejidos, la angiogénesis, o la supervivencia de MSC, entre otros (Karp, J. M. *et al.*, 2009; Caplan, A. I. *et al.*, 2006). Estas células también exhiben la capacidad de migrar hacia sitios patológicos como cánceres de mama, páncreas, cerebro y próstata (Moniri, M. R. *et al.*, 2012; Nakamizo, A. *et al.*, 2005; Birnbaum, T. *et al.*, 2007; Karnoub, A. E. *et al.*, 2007; Barcellos de Souza, P. *et al.*, 2016). Este último comportamiento denota el gran potencial anticáncer que estas células poseen como vehículos de *delivery* terapéuticos.

El mecanismo por el cual las MSC migran frente a diferentes estímulos fisiológicos o patológicos, es complejo y comprende un área activa de investigación. Se sabe que TGF- β induce la migración de MSC durante procesos fisiológicos tales como la regeneración ósea (revisado en Crane, J. L. *et al.*, 2014) (figura 1.6). Además, muchas células cancerosas producen niveles elevados de TGF- β , lo cual sugiere que este factor puede mediar el tropismo de las MSC hacia los tumores (Birnbaum, T. *et al.*, 2007; Barcellos de Souza, P. *et al.*, 2016).

Estudios de esta última década han revelado que algunos de los efectos terapéuticos de MSC se atribuyen a su potente capacidad inmunosupresora (Shi, Y. *et al.*, 2010 y 2012; Wei, X. *et al.*, 2013). A su vez se ha revelado la interesante propiedad, no reconocida previamente, de TGF- β de promover respuestas inmunes en presencia de MSC (Xu, C. *et al.*, 2014).

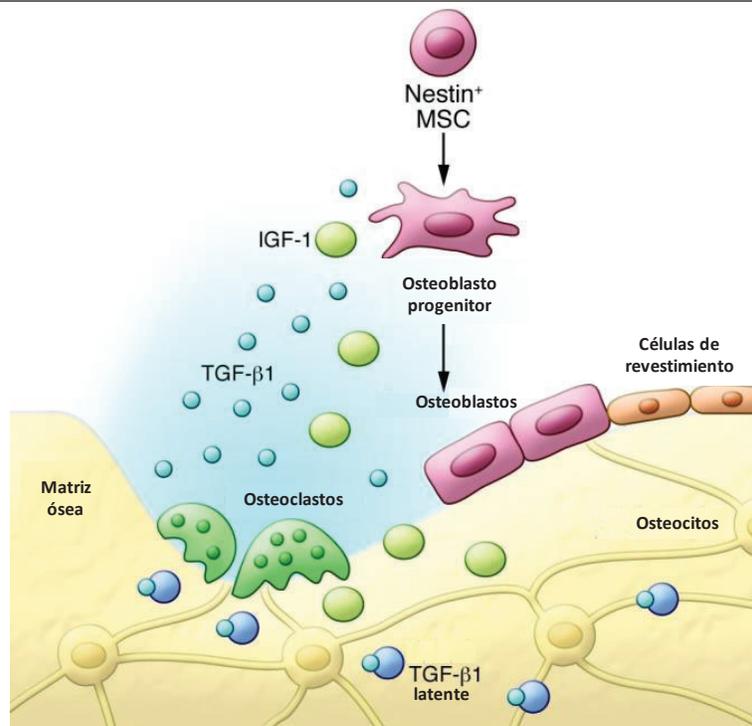


Figura 1.6. TGF-β, MSC y resorción ósea. La activación de TGF-β recluta a las MSC durante la remodelación ósea. TGF-β1 se libera de la matriz ósea y se activa durante la resorción ósea mediada por osteoclastos, creando un gradiente. TGF-β1 induce la migración de MSC a los sitios de remodelación ósea para acoplar a la resorción ósea y la formación de hueso. Este microambiente también proporciona señales que dirigen la diferenciación linaje-específica de las MSC. Adaptado de Crane, J. L. *et al.*, 2014.

2.Artritis

Aunque la inflamación de las articulaciones es un síntoma o señal y no un diagnóstico específico, el término artritis se usa a menudo para referirse a cualquier problema médico que afecta las articulaciones. Existen más de 100 tipos diferentes de artritis y enfermedades asociadas, entre las que se incluyen enfermedades que afectan los huesos, los músculos, las articulaciones y los tejidos que las sostienen. En algunas enfermedades en las que se presenta la artritis, otros órganos, como los ojos, el corazón o la piel, también se pueden ver afectados.

Tipos de artritis

Existen varios tipos de artritis, siendo las de mayor incidencia en el mundo la Osteoartritis o Artrosis, y la Artritis reumatoidea.

Osteoartritis (OA): es la forma más común de artritis, comúnmente comienza con la edad y con frecuencia afecta las manos, las rodillas, los pies y las caderas. A veces este tipo de artritis aparece después de una lesión o golpe en la articulación. Por ejemplo, es posible que se haya lesionado la rodilla cuando era joven y desarrolle OA en la articulación de la rodilla años después (Allen, K. D. *et al.*, 2015).

Artritis reumatoidea (AR): es la forma más común de artritis autoinmune. Es una enfermedad crónica que causa dolor en las articulaciones, rigidez, hinchazón y disminución del movimiento

articular. Las más afectadas son las pequeñas articulaciones de las manos y los pies. A veces, la AR puede afectar a órganos como los ojos, la piel o los pulmones. Es una patología de distribución universal, con una prevalencia mundial de entre el 0,2 y el 1,2%, y mayor frecuencia en mujeres que en varones (relación 2:1) (Cross, M. *et al.*, 2014).

Ambos tipos de artritis representan un desafío científico tanto para el desarrollo de nuevos fármacos como para la identificación de posibles biomarcadores objetivos de diagnóstico, pronóstico y actividad de estas enfermedades.

2.1 Artritis reumatoidea

La artritis reumatoidea (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y sistémica que se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones periféricas con su consiguiente daño estructural y deterioro funcional (Brennan, F. *et al.* 2007). En el compromiso articular de la AR se observa una excesiva proliferación de células sinoviales, células presentadoras de antígenos y leucocitos, donde los linfocitos T y B son los principales efectores del proceso inflamatorio (Scriver, R. *et al.*, 2007).

2.1.1 Epidemiología y etiología

La AR tiene distribución mundial y es la forma autoinmune inflamatoria más común de la artritis. Afecta aproximadamente a 1 de cada 100 personas en todo el mundo y su incidencia entre 2 y 4 casos cada 10 000 habitantes por año. Es más frecuente en mujeres que en hombres, con una relación 2:1 mundial. Puede aparecer a cualquier edad, aunque lo hace preferentemente, entre los 35 y los 50 años (Cross, M. *et al.*, 2014).

Estudios realizados en nuestro país establecieron una prevalencia de 0.329 % y una incidencia de 1,85 cada 10 000 habitantes por año (Di, W. T. *et al.*, 2016).

Como toda enfermedad autoinmune se cree que aparece por anomalías en la respuesta inmune, innata o adaptativa, y que tiene componentes genéticos y ambientales (Funovits, J. *et al.*, 2010).

2.1.2 Patología y características clínicas

En la AR la membrana sinovial de las articulaciones se inflama y acumula linfocitos T y B, macrófagos y células plasmáticas. Este revestimiento se va engrosando gradualmente y forma el *pannus* que invade al cartílago articular. Finalmente, se produce la destrucción del cartílago y del hueso (Firestein, G. S., 1994) (Figura 1.7) que son visibles por radiografía de rayos X.

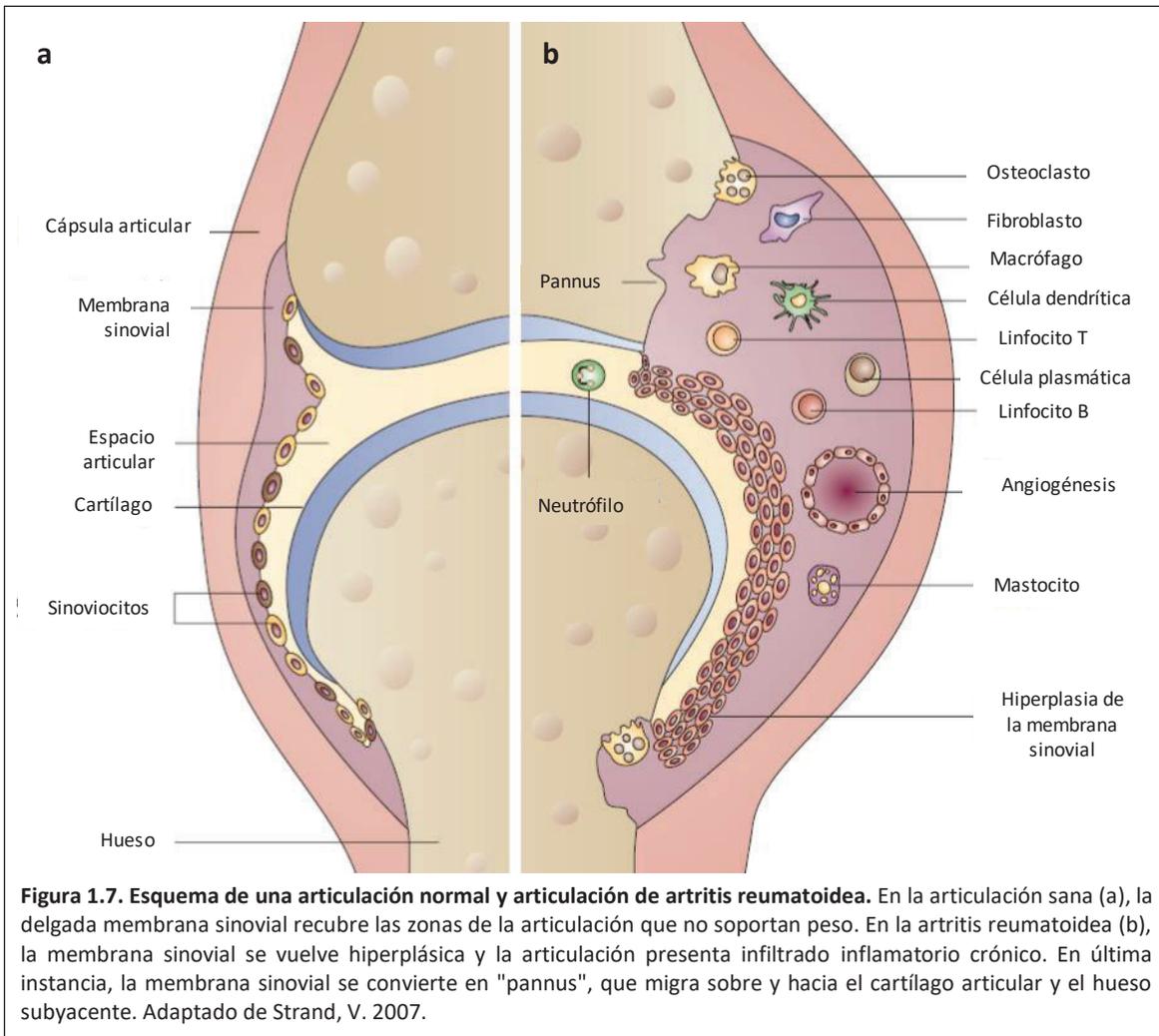


Figura 1.7. Esquema de una articulación normal y articulación de artritis reumatoidea. En la articulación sana (a), la delgada membrana sinovial recubre las zonas de la articulación que no soportan peso. En la artritis reumatoidea (b), la membrana sinovial se vuelve hiperplásica y la articulación presenta infiltrado inflamatorio crónico. En última instancia, la membrana sinovial se convierte en "pannus", que migra sobre y hacia el cartílago articular y el hueso subyacente. Adaptado de Strand, V. 2007.

El aumento de la actividad de la enfermedad produce elevación de la eritrosedimentación (ESD) y de la proteína C reactiva (PCR) y factor reumatoideo (FR) positivo. También puede aumentar el número de plaquetas y presentar anemia (Hill, J., 2006).

En general, la AR se caracteriza por dolor e inflamación de las articulaciones afectadas, rigidez matutina cuya duración varía entre minutos y horas, pérdida de la movilidad, fatiga, ansiedad y depresión. También pueden presentarse manifestaciones extraarticulares como nódulos subcutáneos, sequedad en ojos y boca (síndrome de Sjögren), pericarditis, pleuritis, etc. (Hill, J., 2006).

No sólo es la más frecuente de las enfermedades reumáticas inflamatorias, sino una de las de mayor tendencia a la destrucción articular. Aún en los estadios muy tempranos de la enfermedad (menos de tres meses de evolución) el 10 % de los pacientes ya presenta daño erosivo radiológicamente visible (Machold, K. P. *et al.*, 2007). Más aún, dentro de los 2 años de iniciados los síntomas las lesiones pueden hallarse hasta en el 70 % de los pacientes (van der Heijde, D. M., 1995; Wolfe, F. *et al.*, 1998).

2.1.3 Clasificación, diagnóstico y evaluación de la actividad de la AR

Los nuevos criterios de clasificación de la AR desarrollados en conjunto por ACR/EULAR en el 2010 (Funovits, J. *et al.*, 2010), se basan en el compromiso articular, FR y/o Anticuerpos Anti Péptidos/Proteínas Citrulinadas (ACPA), los reactantes de fase aguda (velocidad de eritrosedimentación (ESD) y medida de proteína C reactiva en suero (PCR)) y la duración de los síntomas. Una puntuación $\geq 6/10$ es necesaria para la clasificación de un paciente con AR definitiva (tabla 1.2).

	Puntuación
Población objetivo (¿Quién debe hacerse la prueba?): Pacientes que: 1) Tienen al menos una articulación con sinovitis clínica definitiva (edema) 2) con sinovitis no explicada mejor por otra enfermedad	
Criterios de clasificación para la AR (algoritmo basado en puntuación: sumar la puntuación de las categorías A-D; una puntuación de $\geq 6/10$ es necesaria para la clasificación de un paciente con AR definitiva)	
A. Compromiso articular 1 articulación grande 2-10 articulaciones grandes 1-3 articulaciones pequeñas (con o sin compromiso de articulaciones grandes) 4-10 articulaciones pequeñas (con o sin compromiso de articulaciones grandes) > 10 articulaciones (al menos 1 articulación pequeña)	0 1 2 3 5
B. Serología (al menos 1 resultado de la prueba es necesaria para la clasificación) FR negativo y ACPA negativo FR débil positivo o ACPA débil positivo FR fuerte positivo o ACPA fuerte positivo	0 2 3
C. Reactantes de fase aguda (al menos 1 prueba es necesaria para la clasificación) PCR normal y ESD normal PCR anormal o ESD anormal	0 1
D. Duración de los síntomas < 6 semanas ≥ 6 semanas	0 1

Tabla 1.2. Criterios para la Clasificación 2010 del ACR/EULAR para Artritis Reumatoidea.

Desafortunadamente, estos criterios no fueron diseñados para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Debido a que la destrucción de las articulaciones comienza dentro de las pocas semanas desde la aparición de los síntomas, es necesario realizar un diagnóstico y un tratamiento tempranos, de manera de disminuir al máximo la progresión de la enfermedad. También es indispensable el monitoreo de la AR en términos de pronóstico y respuesta terapéutica. Hasta el presente no existe un biomarcador que satisfaga tales necesidades y tampoco un único test que confirme el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, la realización de varias pruebas en conjunto puede incrementar las certezas del diagnóstico y permitir el seguimiento tanto de la progresión de la enfermedad como de la efectividad de los tratamientos.

Las pruebas de laboratorio que a menudo ayudan en el diagnóstico y en la evaluación de la actividad de la enfermedad en pacientes con AR son: la determinación de la ESD, determinación de los niveles de CRP, de FR y de anticuerpos antipéptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC).

Valores elevados de ESD se asocian con enfermedad severa. Desafortunadamente, este parámetro no es específico y puede verse afectado por otros factores como la edad, el sexo y la presencia de anemia (Funovits, J. *et al.*, 2010).

En cuanto a CRP, este reactante de fase aguda ha demostrado buena correlación con la actividad de la enfermedad. Además, valores basales elevados predicen daño radiológico. Es más específico que la ESD, sin embargo, debe tenerse en cuenta que aproximadamente un 30% de los pacientes con AR presentan reactantes de fase aguda dentro de valores normales a pesar de encontrarse en actividad (Funovits, J. *et al.*, 2010).

El FR, un complejo de IgM e IgG, es el anticuerpo tradicional en AR. Altos niveles de FR se correlacionan con un peor pronóstico y una mayor actividad de la enfermedad (Hill, J., 2006). Tampoco es específico ya que en AR temprana es positivo sólo en el 35 % de los casos (Funovits, J. *et al.*, 2010). Además, ser FR positivo no es diagnóstico de la enfermedad ya que puede encontrarse en otras enfermedades del tejido conectivo, en algunas infecciones crónicas y en enfermedades inflamatorias crónicas (Hill, J., 2006).

Los anticuerpos anti-PCC son producidos por células B y se han encontrado dentro de las articulaciones inflamadas en AR (Hill, J., 2006). La positividad de los anti-PCC es predictiva de artritis persistente y de daño radiológico. Estos autoanticuerpos, a pesar de tener sensibilidad similar al FR, han demostrado ser más específicos y con mayor valor predictivo positivo para AR (Funovits, J. *et al.*, 2010).

También son de gran utilidad evaluaciones radiográficas de las articulaciones y evaluaciones mediante otras técnicas por imagen, como ecografía y resonancia magnética, que pueden detectar precozmente erosiones óseas (Funovits, J. *et al.*, 2010).

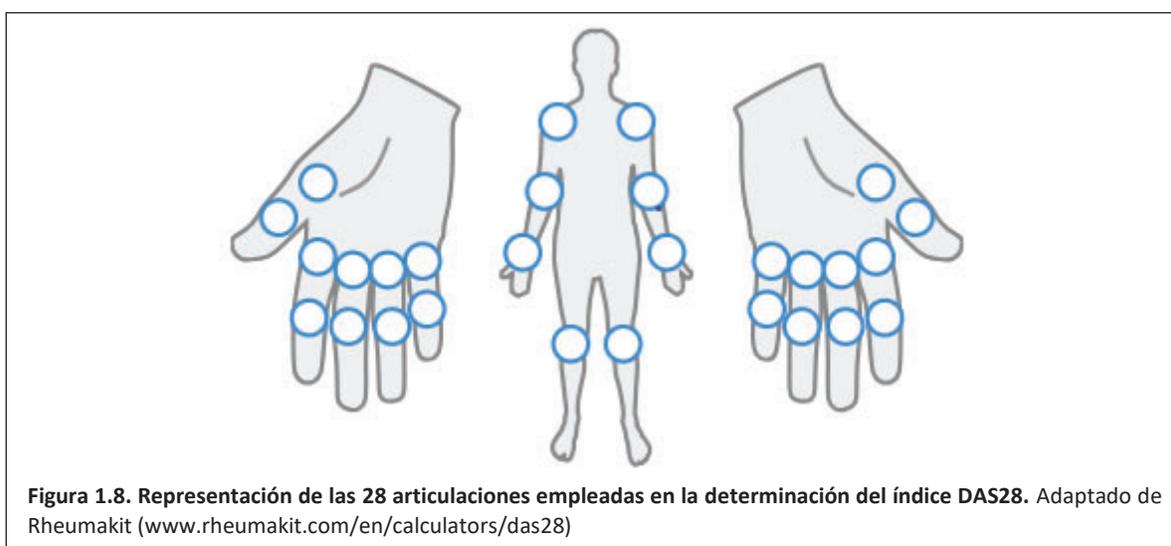
Para medir el dolor y la actividad de la enfermedad existen escalas analógicas visuales (VAS) que consisten en una línea horizontal de 100 mm de longitud. La escala que evalúa el dolor va desde 0 (ningún dolor) hasta 100 (máximo dolor). El paciente debe hacer una marca que represente el nivel de dolor que siente. Luego se mide la distancia entre la marca y el comienzo de la escala. La escala que se refiere a la actividad de la enfermedad puede ser determinada tanto por el paciente (evaluación global de la enfermedad desde el punto de vista del paciente, EGP) como por el médico (evaluación global de la enfermedad desde el punto de vista del médico, EGM). En este caso 0 corresponde a “muy bien” y 100 a “muy mal”. Estas escalas han demostrado ser una representación confiable del dolor experimentado por los pacientes y sensible al cambio en la actividad de la AR (Hill, J., 2006; Lázaro de Mercado, P. *et al.*, 2007; Funovits, J. *et al.*, 2010).

Los cuestionarios de autoevaluación son indispensables para una adecuada evaluación del paciente con AR. El HAQ (por sus siglas en inglés, *Health Assessment Questionnaire*) es un cuestionario de respuesta fácil y rápida y cálculo sencillo con buena reproducibilidad y consistencia interna (Ramey, D. R. *et al.*, 1992). Consta de 20 preguntas distribuidas en 8 categorías que incluyen: vestirse y arreglarse, levantarse, comer, caminar, higienizarse, alcanzar, prensión y otras actividades (Pincus, T. *et al.*, 2003). El valor de cada categoría se califica desde 0 (realizar las tareas sin dificultad) hasta 3 (incapacidad para hacerlo). Los valores de cada categoría son promediados y el resultado final tiene un rango de 0 (normal) a 3 (mayor grado de discapacidad). Un HAQ > 1.25 refleja enfermedad

severa (Hawley, D. J. *et al.*, 1993). Un HAQ ≥ 0.87 se asocia con discapacidad laboral (Hogrefe, J. F. *et al.*, 2007).

La medición de la actividad de la enfermedad se ha convertido en un componente importante para el tratamiento de la AR. En este sentido, debido a que las evaluaciones clínicas y las pruebas de laboratorio no han demostrado un buen desempeño individual, estas se han incorporado en índices compuestos para alcanzar una mejor capacidad discriminativa. El que mejor califica para evaluar y discriminar entre alta y baja actividad de la AR es el DAS28 (Prevoo, M. L. *et al.*, 1995).

El DAS28-ESD (por sus siglas en inglés, *Disease Activity Score using 28 joint counts*) comprende determinaciones subjetivas —número de articulaciones doloridas (NAD)— y objetivas —número de articulaciones inflamadas (NAI) y ESD—. En la figura 1.8 se muestran las 28 articulaciones evaluadas en la determinación de este índice; el conteo articular no considera las articulaciones de pies, tobillos y caderas.



El DAS28-ESD se calcula de la siguiente manera:

$$DAS28 = 0,56\sqrt{NAD} + 0,28\sqrt{NAI} + 0,70(\ln ESD)$$

Este índice puede tomar valores entre 0 y 9.4. Su interpretación es:

- DAS28-ESD $< 2,6$: remisión.
- DAS28-ESD $\leq 3,2$: baja actividad.
- DAS28-ESD $> 3,2$ y $\leq 5,1$: moderada actividad.
- DAS28-ESD $> 5,1$: alta actividad.

Un cambio en el DAS28-ESD de 1.2 se considera significativo y se recomienda realizar el DAS28-ESD cada tres meses. Cabe destacar, que un paciente individual puede estar activo de su enfermedad con hasta 10 articulaciones tumefactas, aún con un DAS 28 en niveles de remisión.

Si bien este índice es mejor que el uso de una única determinación, hay que tener en cuenta que las determinaciones que lo componen, además de la subjetividad de dos de ellas, pueden verse influidas por el daño acumulativo y por otras enfermedades distintas a la AR (por ejemplo, fibromialgia y osteoartritis). Por lo tanto, para mejorar la evaluación clínica de la AR sería de gran valor el uso de información objetiva adicional acerca de procesos subyacentes a la enfermedad.

2.1.4 Tratamientos y evaluación de la respuesta terapéutica

La AR requiere, generalmente, tratamiento de por vida que incluye medicamentos, fisioterapia, ejercicio, educación y, en ocasiones, cirugía.

Existen tres líneas de tratamientos con medicamentos (Hill, J., 2006):

-Terapias de primera línea. Se usan analgésicos como aspirina y paracetamol para aliviar el dolor, drogas antiinflamatorias no esteroideas o NSAID (por sus siglas en inglés, non-steroidal anti-inflammatory drugs) que reducen los síntomas producidos por la inflamación al disminuir la producción de prostaglandinas o corticoesteroides, que reducen la inflamación y la aparición de erosiones, cuyo modo de acción es mediante su unión a receptores específicos inhibiendo la producción de citoquinas clave y la activación y proliferación de células T.

-Terapias de segunda línea. Las drogas antirreumáticas modificadoras de la enfermedad o DMARD (por sus siglas en inglés, disease-modifying antirheumatic drugs) son inductoras de remisión de la enfermedad. Se usan combinadas entre ellas o con drogas de primera línea. Incluyen: metotrexato, azatioprina, compuestos de oro, hidroxicloroquina, entre otras.

-Terapias biológicas. Son terapias dirigidas que modifican la respuesta biológica. Se usan antagonistas de citoquinas proinflamatorias endógenas como receptores solubles o anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, Etanercept, Adalimumab e Infliximab bloquean a TNF- α , Rituximab (anti-CD20) está dirigido contra los linfocitos B, Anakinra bloquea la acción de IL-1 y Tocilizumab la de IL-6.

El objetivo del tratamiento de la AR es inducir la remisión completa de la enfermedad o, alternativamente, conseguir la mínima actividad inflamatoria posible. Los criterios de respuesta de EULAR (por sus siglas en inglés, *European League Against Rheumatism*) tienen en cuenta tanto el grado de mejoría como la situación actual del paciente. La respuesta de EULAR se define según el cambio logrado en el DAS28-ESD luego del tratamiento (tabla 1.3; van Gestel, A. M. *et al.*, 1999).

Actividad	DAS28-ESD>1,2	DAS28-ESD \leq 1,2 y >0,6	DAS28-ESD \leq 0,6
Baja DAS28-ESD \leq 3,2	Buena respuesta		
Moderada DAS28-ESD>3,2 y \leq 5,1		Moderada respuesta	
Alta DAS28-ESD>5,1			Sin respuesta

Tabla 1.3. Criterios de respuesta EULAR

2.1.5 Remisión de la AR

Existen dos criterios de remisión de la AR, uno establecido por ACR (por sus siglas en inglés, *American College of Rheumatology*) y otro por EULAR. El primero consiste en una evaluación global y el segundo evalúa la remisión según el DAS28-ESD.

Criterios de remisión de la AR según ACR (Pinals, R. S. *et al.*, 1981):

- Rigidez matutina ausente o no mayor a quince minutos.
- Ausencia de cansancio.
- Ausencia de dolor articular en la anamnesis.
- Ausencia de dolor articular a la presión.
- Ausencia de inflamación sinovial y tenosinovial.
- Eritrosedimentación normal.

La presencia de al menos cinco de estos criterios durante dos meses o más son suficientes para catalogar a un paciente en remisión completa de su enfermedad; siempre que no se encuentre alguna de las siguientes exclusiones: manifestaciones clínicas de vasculitis activa, pericarditis, pleuritis, miositis, pérdida de peso reciente sin causa o fiebre atribuida a la AR. Las desventajas de estos criterios son que no están adecuadamente detallados, no hay consenso sobre cómo evaluar fatiga y rigidez matutina y, además, tres de las seis variables son subjetivas (Funovits, J. *et al.*, 2010).

Criterios de remisión de la AR según EULAR (Pinals, R. S. *et al.*, 1981; Fransen, J. *et al.*, 2004):

- DAS28-ESD < 2.6.

Este valor está en revisión debido a que no todos los pacientes con DAS28-ESD < 2.6 se encuentran en remisión. Un nuevo valor de corte de remisión propuesto para el DAS28-ESD es < 2.4, pero aún este valor permite la presencia de hasta 12 articulaciones inflamadas. De todas maneras, es aconsejable tener en cuenta las articulaciones no evaluadas en el DAS28-ESD antes de definir si un paciente se encuentra realmente en remisión (Mäkinen, H. *et al.*, 2005; Landewé, R. *et al.* 2006).

2.1.6 TGF- β y AR

Existen evidencias de que TGF- β y sus receptores actúan como potentes reguladores de los eventos inflamatorios en el tejido sinovial de la AR. Tanto en líquido sinovial como en células derivadas de la estructura articular de pacientes con AR se han encontrado niveles aumentados de TGF- β 1 (Lafyatis, R. *et al.*, 1989; Chu, C. Q. *et al.*, 1991; Szekanecz, Z. *et al.*, 1995; Schlaak, J. F. *et al.*, 1996). Además, se han correlacionado los niveles séricos aumentados de TGF- β 1 en pacientes con AR con un mayor daño articular (Mieliauskaitė, D. *et al.*, 2009).

Numerosos estudios realizados en modelos de fibrosis han mostrado el efecto beneficioso de bloquear el TGF- β con oligonucleótidos antisentido (Arias, M. *et al.*, 2003; Philipp, K. *et al.*, 2005), anticuerpos específicos anti-TGF- β (Denis, M., 1994; McCormick, L. L. *et al.*, 1999) o péptidos

sintéticos (Ezquerro, I. J. *et al.*, 2003; Santiago, B. *et al.*, 2005; Kondou, H. *et al.*, 2003), demostrando el papel de TGF- β como agente profibrótico.

En modelos animales de artritis se observó, que la administración sistémica de TGF- β 1 en ratas susceptibles suprimió el desarrollo de artritis experimental. Además, la inyección intraperitoneal de un anticuerpo neutralizante de TGF- β incrementó la artritis inducida en ratones DBA/1 (Thorbecke, G. *et al.*, 1992; Sancho, D. *et al.*, 2003). A su vez se ha demostrado que células madre mesenquimales derivadas de médula ósea e inducidas con TGF- β disminuyen la incidencia y la gravedad de la artritis en ratones con CIA con la enfermedad establecida. Asimismo, incrementan la proporción Foxp3/IL-17 en el bazo y la cavidad peritoneal, y disminuyen la producción de citocinas proinflamatorias (Park, M. J. *et al.*, 2011). Otro estudio realizado en ratones con CIA mostró un aumento significativo de TGF- β 1 y TGF- β 2 en la articulación (Marinova-Mutafchieva, L. *et al.*, 2006), principalmente durante la fase de remisión, indicando que ambas citocinas están implicadas en la regulación de la actividad de la enfermedad. Estos resultados sugieren que TGF- β , tanto exógeno como endógeno, tiene una actividad antiartrítica.

Sin embargo, también son numerosos los trabajos que exhiben un papel de TGF- β totalmente contrario. De hecho, inyecciones repetidas de TGF- β 1 en la articulación de ratones sanos inducen inflamación e hiperplasia sinovial (Van Beuningen, H. M. *et al.*, 1994). Igualmente, la inyección articular de TGF- β 1 en ratas induce reclutamiento de neutrófilos, eritema, proliferación e infiltración sinovial, principalmente por linfocitos T (Fava, R. A. *et al.*, 1991; Allen, J. B. *et al.*, 1990). Varios trabajos apoyan este concepto de TGF- β como agente proinflamatorio. El tratamiento con un Ac anti- TGF- β 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 citocinas proinflamatorias (Wahl, S. M. *et al.*, 1993). Otros autores muestran que el tratamiento con un Ac-anti- TGFBR1 en ratones con artritis inducida con Ac anti-colágeno previene los signos de la artritis, el desarrollo de la hiperplasia, la inflamación y la angiogénesis sinovial (Sakuma, M. *et al.*, 2007). Según estos hallazgos TGF- β , tanto exógeno como endógeno, actuaría como pro-artrítico.

La posible explicación a estos resultados contradictorios puede encontrarse en la regulación diferencial de la inflamación por parte de TGF- β .

2.1.6.1 Efectos de TGF- β sobre leucocitos en AR

Se ha demostrado que, en pacientes con AR, TGF- β ejerce un efecto singular sobre linfocitos, macrófagos y granulocitos.

En líquido sinovial, el uso de un anticuerpo específico contra TGF- β es capaz de neutralizar la mayor parte de la actividad que inhibe la proliferación de células T. Además, se demostró que en líquido sinovial TGF- β es capaz de inhibir completamente la proliferación de células T CD4⁺ y parcialmente la de los linfocitos T CD8⁺ (31.1% de inhibición). Estos resultados indican que este factor de crecimiento sería un modulador importante de la respuesta inmune durante la sinovitis (Lotz, M. *et al.*, 1990).

Otro estudio reveló que el líquido sinovial reumatoide suprime directamente la función de los linfocitos y su señalización con células dendríticas. Esta inhibición es llevada a cabo, principalmente, por TGF- β y pareciera alterar indirectamente la regulación de las moléculas coestimuladoras

CD80/CD86 en células dendríticas. Esto sugiere que el TGF- β del líquido sinovial, al suprimir la señalización célula dendrítica-linfocito T, sería un componente principal involucrado en perpetuar la enfermedad clínica (Summers, K. L. *et al.*, 1999).

En lo que respecta a los macrófagos, estos parecen tener un rol central en la AR ya que están presentes en grandes cantidades tanto en la membrana sinovial inflamada como en la unión del cartílago con el pannus (Kinne, R. W. *et al.*, 2000). De hecho, se encontró que TGF- β 1 está presente en el 63 % de las células del revestimiento, 43% de macrófagos intersticiales y en el 48% de células vasculares endoteliales del tejido sinovial de AR, mientras que sólo se encuentra en unas pocas células del tejido sinovial normal y en osteoartritis (Szekanecz, Z. *et al.*, 1995). Por lo tanto, TGF- β 1 actuaría como un potente regulador de los eventos inflamatorios, fibróticos y angiogénicos en el tejido sinovial de la AR.

Además, se ha demostrado que el tratamiento exitoso de pacientes con AR con DMARD produce un efecto substancial sobre el contenido de macrófagos de la membrana sinovial, con un efecto menos pronunciado sobre los linfocitos T de memoria. Esto sugiere que el efecto principal de las DMARD estaría dirigido contra los macrófagos, con la consecuente disminución de citoquinas pro y antiinflamatorias tales como IL-1 β , TNF- α y TGF- β (Smith, M. D. *et al.*, 2001).

TGF- β cumple un papel importante como factor proinflamatorio al estimular la secreción de citocinas como TNF- α e IL-1, siendo indirectamente un potente quimioatrayente de neutrófilos (Cheon, H. *et al.*, 2002; Buckley, C. D. *et al.*, 2000). En pacientes con enfermedades autoinmunes como la AR, y en modelos experimentales de estas enfermedades, se ha reportado función fagocítica deficiente de granulocitos, lo que podría contribuir al riesgo aumentado de infecciones observado en estos pacientes. TGF- β parece jugar un papel esencial en la adquisición de esta sensibilidad disminuida por parte de los granulocitos (Gresham, H. D. *et al.*, 1991).

Por otra parte, TGF- β es capaz de ejercer efectos patogénicos en el tejido sinovial, donde los granulocitos representarían una fuente significativa del TGF- β presente en los derrames sinoviales (Fava, R. A. *et al.*, 1991).

2.1.6.2 Mecanismos de acción de TGF- β en AR

Aunque aún no está definitivamente establecido el mecanismo de acción de TGF- β en la AR, se postulan diversas acciones por medio de las cuales esta citoquina puede regular la patogénesis en el curso de la enfermedad:

-TGF- β puede modular la expresión de citoquinas inflamatorias tales como TNF- α e IL-1 β (Derynck, R. *et al.*, 1998; Cheon, H. *et al.*, 2002; Buckley, C.D. *et al.*, 2000).

-TGF- β regula la producción de metaloproteasas (Edwards, D. R. *et al.*, 1996; Cheon, H. *et al.*, 2002; Buckley, C.D. *et al.*, 2000).

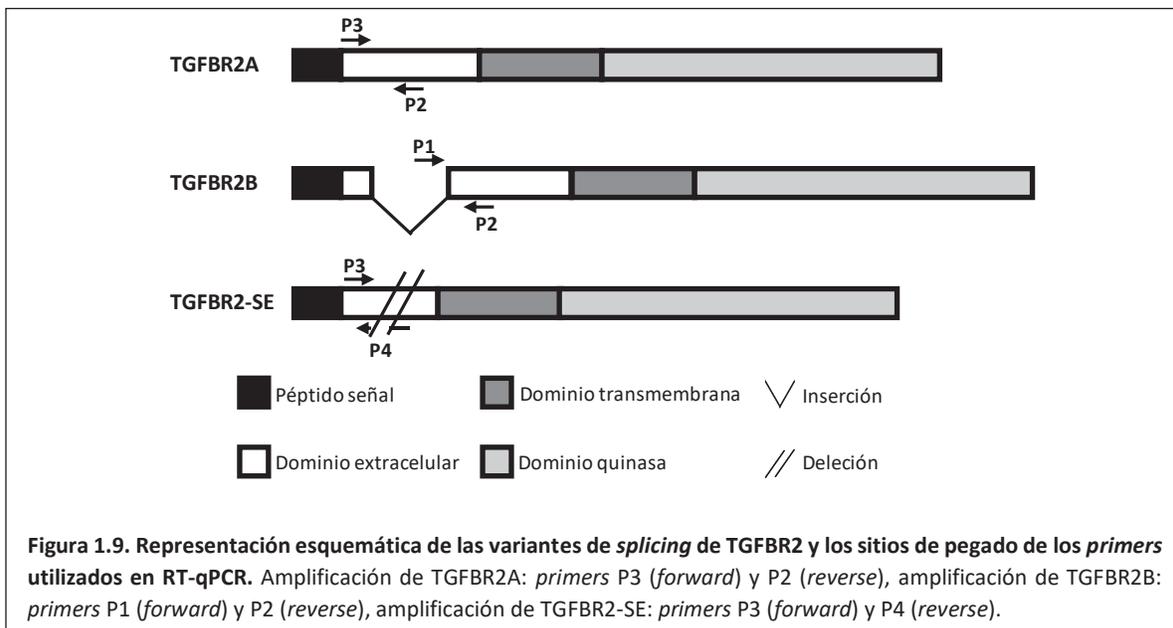
-TGF- β 1 es un factor fuertemente quimiotáctico pudiendo atraer células inflamatorias al tejido sinovial (Allen, J. B. *et al.*, 1990).

-TGF- β puede acelerar la hipertrofia sinovial al inducir la proliferación de fibroblastos e, incluso, puede modular la apoptosis de los fibroblastos sinoviales (Derynck, R. *et al.*, 1998; Kim, G. *et al.*, 2002).

-TGF- β puede inducir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (por sus siglas en inglés, *vascular endothelial growth factor*), contribuyendo de esta manera, indirectamente, a la angiogénesis de la membrana sinovial artrítica (Berse, B. *et al.*, 1999).

2.1.6.3 Variantes de *splicing* de TGFBR2 y AR.

Debido al impacto que tiene TGF- β sobre los leucocitos de pacientes con AR, en nuestro laboratorio se estudió si los niveles de ARNm de variantes de *splicing* de TGFBR2 en pacientes con AR podrían estar correlacionados con algún/algunos parámetros clínicos de la enfermedad (Carrea, A. Tesis doctoral 2015). Para ello, se purificaron células mononucleares y neutrófilos de pacientes sin y con AR (N=9 por grupo, apareados por edad y sexo). De las células mononucleares se purificaron monocitos mediante adherencia al plástico (porcentajes de pureza 36%-89%), quedando en la fracción no adherente mayoritariamente linfocitos. En primera instancia se cuantificaron los niveles relativos de ARNm para las tres variantes de *splicing* del receptor TGFBR2 en las tres poblaciones aisladas mediante RT-qPCR, utilizando *primers* específicos (figura 1.9).



Estos niveles fueron comparados con la finalidad de obtener indicios de sus potenciales usos como biomarcadores de diagnóstico de la AR, no encontrándose una tendencia entre dichos niveles y la presencia de la enfermedad. Posteriormente se procedió a analizar potenciales relaciones entre los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* de TGFBR2 y parámetros clínicos de la enfermedad para cada uno de los pacientes. De este análisis surgieron un grupo de correlaciones estadísticamente significativas (tabla 1.4).

Variables correlacionadas	Coefficiente de Spearman (rs)	Valor de p
Número articulaciones inflamadas – ARNm TGFBR2A en monocitos	0,845	0,006
Número articulaciones inflamadas – ARNm TGFBR2B en monocitos	0,778	0,018
Número articulaciones doloridas – ARNm TGFBR2A en monocitos	0,778	0,018
Número articulaciones doloridas – ARNm TGFBR2B en monocitos	0,720	0,034
DAS28-ESD – ARNm TGFBR2A en monocitos	0,7	0,043
DAS28-ESD – ARNm TGFBR2B en monocitos	0,733	0,031
ESD – ARNm TGFBR2-SE en linfocitos	0,714	0,036
HAQ – ARNm TGFBR2B en granulocitos	-0,870	0,004
VAS médico – ARNm TGFBR2B en granulocitos	-0,711	0,038
DAS28-ESD – ARNm TGFBR2-SE en granulocitos	-0,761	0,037

Tabla 1.4. Correlaciones estadísticamente significativas entre las distintas variables determinadas en los pacientes involucrados en la cohorte 1. Las correlaciones se realizaron mediante el *test de Spearman* usando el *software* OriginPro 8.5.1 (Origin Lab Corporation, Northampton, MA, USA). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Dentro de las correlaciones con mayor proyección como potencial biomarcador de actividad, se encontró que el índice DAS28-ESD correlacionaba positivamente y de manera significativa con los niveles de ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B de monocitos de pacientes con AR (figura 1.10).

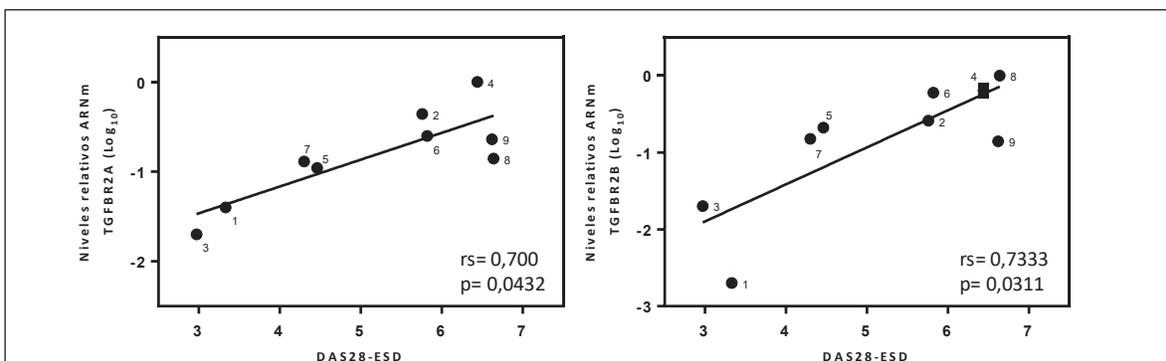


Figura 1.10. Correlaciones positivas entre las abundancias relativas de los ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B en monocitos y el índice DAS28-ESD, cohorte 1. Los números corresponden al número asignado a cada voluntario involucrado en el estudio. El análisis de las correlaciones se hizo utilizando el *test de Spearman*, para lo que se usó el *software* Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). rs: coeficiente de correlación de Spearman. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos

A su vez, la correlación con un índice de Spearman más alto y estadísticamente más significativa fue observada cuando se desafió el índice DAS28-ESD con los niveles relativos de la suma de ambas variantes de *splicing* (figura 1.11).

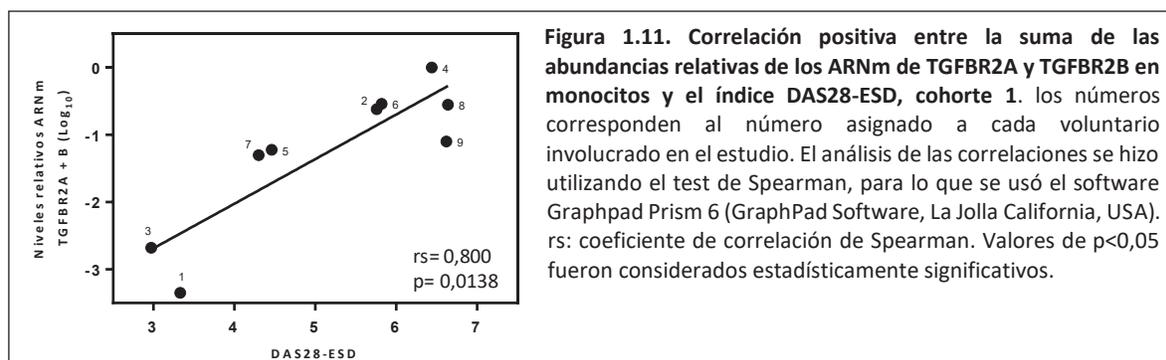


Figura 1.11. Correlación positiva entre la suma de las abundancias relativas de los ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B en monocitos y el índice DAS28-ESD, cohorte 1. los números corresponden al número asignado a cada voluntario involucrado en el estudio. El análisis de las correlaciones se hizo utilizando el *test de Spearman*, para lo que se usó el *software* Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). rs: coeficiente de correlación de Spearman. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Estos resultados sitúan a los monocitos y a dichas variantes de *splicing* como potenciales biomarcadores de actividad y sugieren un análisis más profundo, demandando un método de purificación más específico que permita obtener mayores porcentajes de pureza. Y con la finalidad de desarrollar un método que permita ser realizado en laboratorios bioquímicos y hospitales, estudiar estrategias de simplificación de la metodología.

Por otra parte, del estudio de las variantes de *splicing* del receptor II en neutrófilos, se observó que, en una cohorte de 9 pacientes con AR, los niveles de ARNm de TGFBR2-SE de neutrófilos correlacionaron negativamente, y de manera significativa, con los valores de DAS28-ESD (figura 1.12).

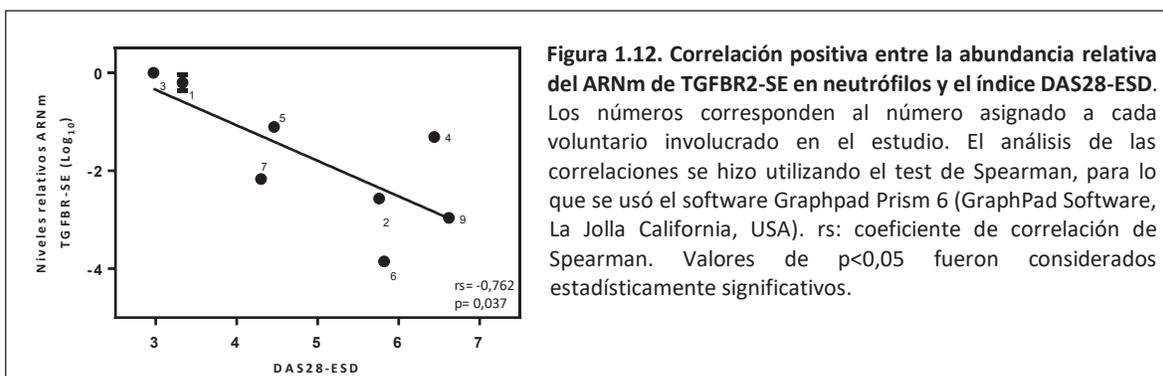


Figura 1.12. Correlación positiva entre la abundancia relativa del ARNm de TGFBR2-SE en neutrófilos y el índice DAS28-ESD. Los números corresponden al número asignado a cada voluntario involucrado en el estudio. El análisis de las correlaciones se hizo utilizando el test de Spearman, para lo que se usó el software Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). rs: coeficiente de correlación de Spearman. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultado que demanda un mayor análisis de la relación entre TGFBR2-SE en neutrófilos y la actividad de AR, en búsqueda de potenciales biomarcadores de actividad

2.2 Osteoartritis

La Osteoartritis (Artrosis u Osteoartrosis = OA) representa la patología articular más prevalente y la mayor causa de dolor musculoesquelético, provocando gran discapacidad en la población añosa de todo el mundo (Lawrence, R. C. *et al.*, 1998). Es una enfermedad de origen fundamentalmente degenerativo, con grados variables de inflamación que compromete cualquiera de los tejidos articulares; el cartílago se degenera y demuestra lesiones de fibrilación, con fisuras y ulceraciones que van determinando la pérdida total del espesor de la superficie articular (Kuttner, K. *et al.*, 1995). Los cambios en el cartílago y en el hueso subcondral se traducen en las imágenes radiológicas (pinzamiento del espacio articular, formación de osteofitos, esclerosis del hueso subcondral, quistes y deformidades) tan características de esta entidad.

La homeostasis de una articulación sana depende de la interacción adecuada entre las células articulares y los tejidos. La comunicación celular perturbada provocaría la pérdida de la integridad del tejido y el daño a todos los tejidos articulares. De este modo, la OA se puede considerar como una enfermedad articular completa en la que se pierde la homeostasis y es en este punto en el que la articulación ha entrado en un estado de enfermedad irreversible. (Van der Kraan, P. M., 2018).

2.2.1 Epidemiología y etiología

Los síntomas y signos articulares de la artrosis (dolor, rigidez, derrame articular, limitación de la movilidad) son progresivos y de evolución crónica. En el primer estadio de la enfermedad, el dolor está asociado al movimiento y al esfuerzo al que se someten las articulaciones. No obstante, la dolencia cesa mientras se está en reposo. Luego, cuando se agrava, el malestar puede aparecer durante la noche y afectar el descanso nocturno, pudiendo llegar a sentirse en forma constante y comprometer en gran medida las actividades diarias. El dolor y las deformaciones articulares producen contracturas y luego atrofia muscular, que contribuyen a la inestabilidad e incongruencia articular, que terminan dañando aún más al cartílago, al hueso y conducen a cuadros clínicos severos, con mayor dolor y restricción de los movimientos.

La OA es multifactorial y entre sus diversas causas influyentes se encuentran alteraciones genéticas (por ejemplo, mutaciones en genes del colágeno, particularmente COL2A1), factores sistémicos (mayor edad, sexo femenino), metabólicos (hemocromatosis, ocronosis, artropatía por presencia de cristales de pirofosfato cálcico dihidratado o de hidroxapatita), biomecánicos (sobrepeso u obesidad, traumatismos, desalineación, displasias, patología meniscal).

Es difícil conocer, aún en países desarrollados las cifras exactas de su ocurrencia debido a las diferentes definiciones de enfermedad ya sean radiográfica, sintomática o ambas. En publicaciones que abordan este tipo de estudios, la prevalencia de OA sintomática de caderas y rodillas en personas ≥ 45 años fue casi del 10% y 16%, respectivamente (Jordan, J. M. *et al.*, 2007; Jordan, J. M. *et al.*, 2009). En pacientes ≥ 70 años de edad, con radiología característica de OA en las manos y manifestaciones clínicas que alteraban frecuentemente la función, se demostró una prevalencia del 26,2% en las mujeres y del 13,4% en los hombres (Zhang, Y. E., 2002). Por lo tanto, a manera de ejemplo y según cálculos estimativos, en nuestro país la OA de cadera afectaría sintomáticamente a unas 900 mil personas, mientras que padecerían dolor en rodillas o manos por causa de la enfermedad 1,5 y 0,6 millones de pacientes respectivamente. Estas cifras podrían llegar a aumentar en las siguientes décadas.

2.2.2 Clasificación y diagnóstico de la OA

Clásicamente afecta las caderas, rodillas, manos, pies o la columna vertebral. Existen numerosas clasificaciones de esta entidad, pero es posible simplificarlas y mencionar aquellas que la diferencian en OA Primaria y Secundaria, Monoarticular o Generalizada (cuando compromete 3 o más de los sitios mencionados), Hipertrófica o Atrófica. Es posible encontrar gran cantidad de estudios destinados a definir las características de la OA, tanto para fines epidemiológicos como clínicos. Esto ha permitido confeccionar Criterios de Clasificación (“Diagnóstico”) para la OA en caderas, rodillas o manos (Altman, R. *et al.*, 1986; Altman, R. *et al.*, 1991; Altman, R. *et al.*, 1990). Evaluados en forma prospectiva y validados, son los más utilizados por la mayoría de los autores.

La radiología simple es el método de elección para el diagnóstico y evaluación del daño en OA. Aunque las clasificaciones que se obtienen por visión directa son las que mejor objetivan el grado de lesión, siendo la clasificación de Outerbridge la más utilizada internacionalmente (Outerbridge, R. E., 1961). Sin embargo, actualmente, nuevos métodos de diagnóstico por imágenes como lo son

la resonancia y la tomografía son motivo de amplia investigación (Burgkart, R. *et al.*, 2001; Abadie, E. *et al.*, 2004).

2.2.3 Tratamientos y evaluación de la respuesta terapéutica

Respecto a su tratamiento, los principales objetivos del mismo son reducir los síntomas, minimizar la posible discapacidad y limitar la progresión de la enfermedad. Estos objetivos se podrían alcanzar siguiendo un cierto ordenamiento, con una base constituida por aquellas medidas no farmacológicas, como son la educación del paciente (por ejemplo, disminución del peso corporal, planes de autocuidado, tomar conciencia de la enfermedad, mayor adherencia a los tratamientos), y la terapia física y terapia ocupacional. Todo lo mencionado deberá complementarse con un adecuado tratamiento farmacológico, sea éste sistémico o local (tópico o intraarticular).

Existen numerosas recomendaciones que sugieren aquellas mediciones que deberán realizarse para un seguimiento apropiado de los pacientes:

a) Subjetivas:

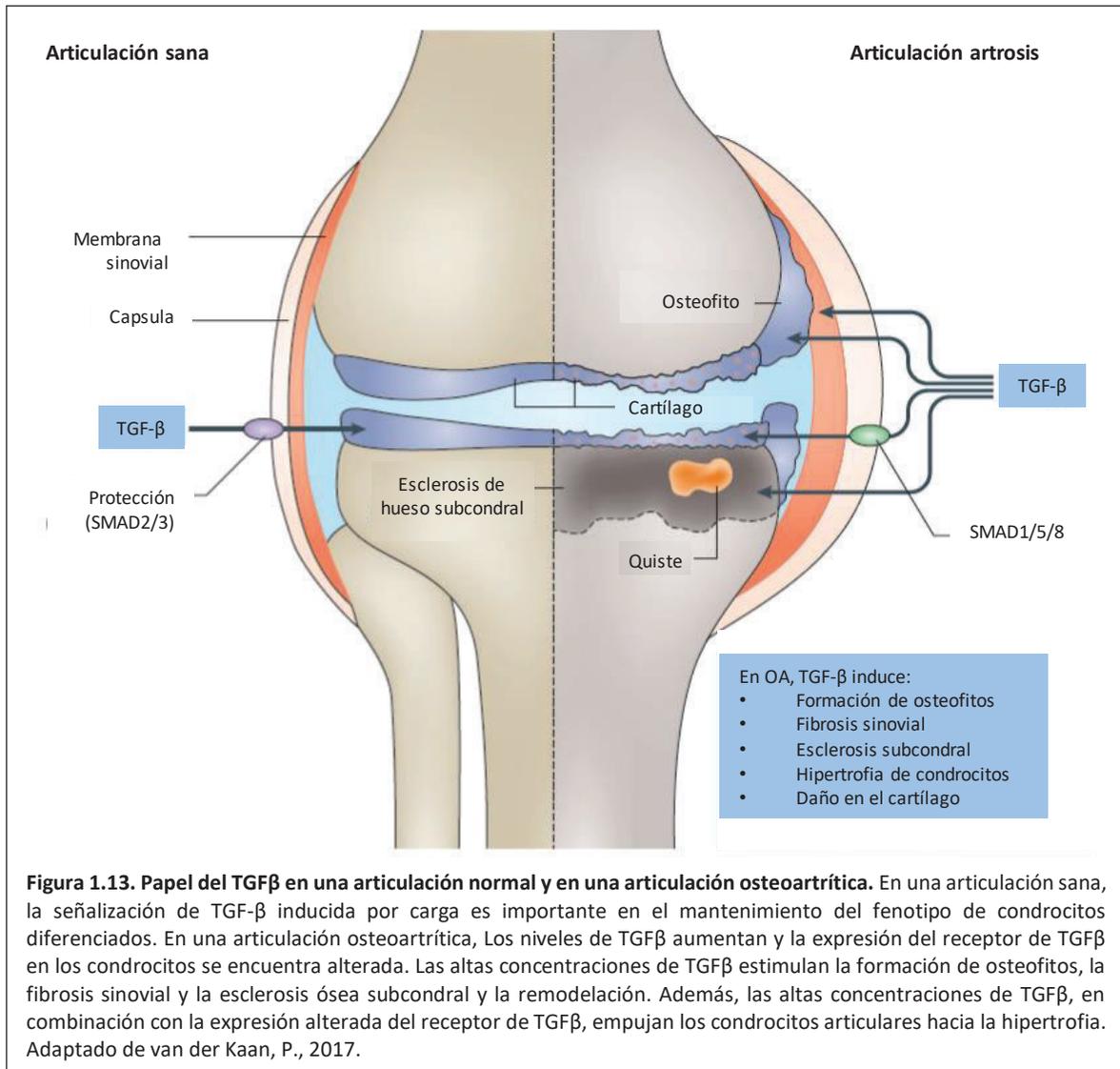
- Cuantificación del Dolor por Escala Visual Analógica (EVA) o el Cuestionario de dolor constante o intermitente (ICOAP)
- Rigidez en minutos o por EVA
- Cuestionarios que evalúan la Función de las manos (AUSCAN; FIHOA) o de las caderas-rodillas (WOMAC; WOMAC Ab)
- Calidad de Vida (cuestionario general: SF36 o cuestionario específico para OA de rodillas y caderas: OAKHQOL)]

b) Objetivas: basadas en el Examen Físico o en el diagnóstico por imágenes

Todas estas evaluaciones, ya sea empleadas en forma individual o en conjunto, se consideran imprescindibles (Zhang, W. *et al.*, 2007; Zhang, W. *et al.*, 2008; Hawker, G. A. *et al.*, 2008; Zhang, W. *et al.*, 2007; Bellamy, N. *et al.*, 2002; Dreiser, R. L. *et al.*, 2000; Rat, A. C. *et al.*, 2005; Rat, A. C. *et al.*, 2006; Rat, A. C. *et al.*, 2008).

2.2.4 TGF- β y OA

El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una citoquina que desempeña un papel importante tanto en las articulaciones normales como en las afectadas por la osteoartritis (OA), la enfermedad articular más común. En una articulación normal, el TGF- β activo solo está presente después de la carga articular y solo por un período corto. En contraste, se detectan niveles permanentes y altos de TGF- β activo en las articulaciones de OA. Debido a esta diferencia en los niveles y el período de exposición de las células de la articulación al TGF- β activo, es que la función del TGF- β es notablemente diferente en las articulaciones normales respecto de la que tiene en las de OA (van der Kraan, P. M., 2018) (figura 1.13).



2.2.4.1 Niveles de TGF-β en articulaciones sanas y articulaciones de OA

El cartílago humano sano contiene una gran cantidad de TGF-β que en condiciones normales no es fácilmente accesible para los condrocitos (Morales, T. I. *et al.*, 1991). La forma predominante de TGF-β en el cartílago articular es TGF-β1 (60% -85% del total), hallándose en grandes cantidades (68.5 ± 20.6 ng/mL) (Albro, M. B. *et al.*, 2013). Estudios han revelado niveles elevados de TGF-β activo en líquido sinovial de pacientes con OA (4 ng/mL) mientras que en un estudio comparativo fueron indetectables los niveles de TGF-β activo en individuos no OA. (Fava, R. *et al.*, 1989; Fang, P. K. *et al.*, 1999). A su vez, existe evidencia de que el TGF-β es proteolíticamente activado en el líquido sinovial y se han demostrado niveles elevados de proteasas en el líquido sinovial de pacientes OA (Zielinski, S. *et al.*, 2000). Estos resultados en conjunto indican claramente que los niveles activos de TGF-β son muy bajos o ausentes en articulaciones normales y elevados en enfermedades articulares como la OA.

2.2.4.2 Efecto del TGF- β en cartílago

Estudios abocados a la señalización de TGF- β , han demostrado que las vías SMAD2/3 y SMAD1/5/8 se activan de manera diferencial según la concentración de TGF- β presente. Por ejemplo, en los fibroblastos humanos, una concentración relativamente alta de TGF- β (>5ng/ml) estimula preferentemente la fosforilación de SMAD1/5/8, mientras que las concentraciones bajas estimulan predominantemente la señalización vía fosforilación SMAD2/3 (Remst, D. F. *et al.*, 2014). Un patrón similar se ha mostrado en otros tipos de células como las células endoteliales (Goumans, M. J. *et al.*, 2002). Esta observación indica que en una articulación normal con bajas concentraciones de TGF- β activo, la vía SMAD2/3 se activaría preferentemente, mientras que en una articulación con altas concentraciones se favorecería la ruta SMAD1/5/8. Este desbalance en las vías de señalización debido a las concentraciones de TGF- β sumado a la reducción en la expresión de ALK5 relacionada con la edad y el aumento de la expresión de ALK1, cambiarían el equilibrio hacia la degradación del cartílago, siendo responsables del origen y el desarrollo de la OA (figura 1.14) (van der Kraan, P. M., 2017).

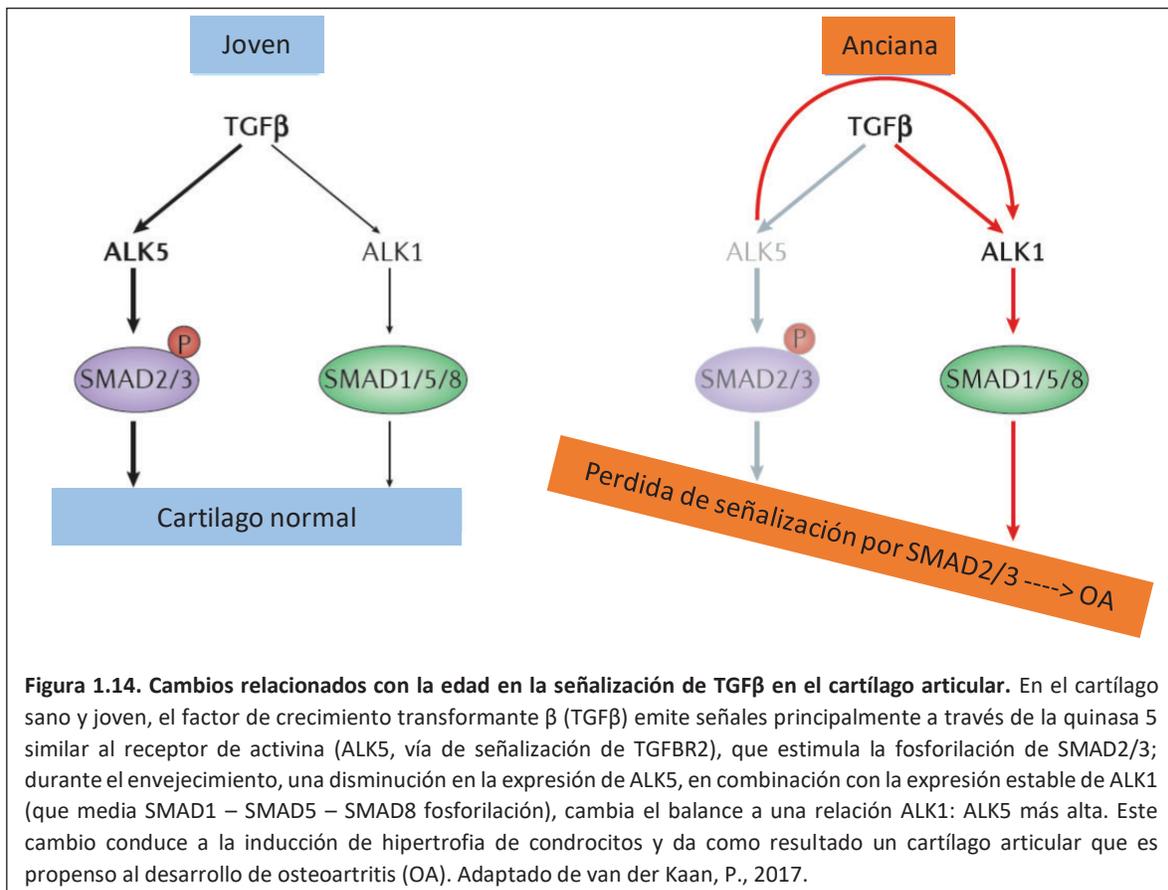


Figura 1.14. Cambios relacionados con la edad en la señalización de TGF β en el cartílago articular. En el cartílago sano y joven, el factor de crecimiento transformante β (TGF β) emite señales principalmente a través de la quinasa 5 similar al receptor de activina (ALK5, vía de señalización de TGFBR2), que estimula la fosforilación de SMAD2/3; durante el envejecimiento, una disminución en la expresión de ALK5, en combinación con la expresión estable de ALK1 (que media SMAD1 – SMAD5 – SMAD8 fosforilación), cambia el balance a una relación ALK1: ALK5 más alta. Este cambio conduce a la inducción de hipertrofia de condrocitos y da como resultado un cartílago articular que es propenso al desarrollo de osteoartritis (OA). Adaptado de van der Kaan, P., 2017.

Soportando estas teorías, se ha demostrado que la pérdida específica por parte de los condrocitos de Smad3, ALK5 o el receptor de TGF tipo II en ratones ha dado como resultado el desarrollo de OA a temprana edad (Wang, Q. *et al.*, 2017; Wu, Q. *et al.*, 2008; Yang, X. *et al.*, 2001; Serra, R. *et al.*, 1997). Estos resultados respaldaron hallazgos en humanos donde defectos en Smad3 finalizaron en el desarrollo de OA en individuos jóvenes (van der Laar, I. M. *et al.*, 2011). Poniéndose de manifiesto

la necesidad de una señalización activa de TGF- β a través de la vía de Smad3, para el mantenimiento del cartílago en buen estado.

A su vez, Madej y colaboradores demostraron que la función principal de la activación de TGF- β sería la prevención de la diferenciación hipertrófica de los condrocitos articulares. Observando que la expresión del colágeno tipo X, un marcador de hipertrofia, en ausencia de carga fue bloqueado mediante la adición de TGF- β exógeno o la realización de una carga. Sumado a esto, observaron que la señalización de TGF- β inducida por carga también aumentaba la expresión de ALK5 en los condrocitos mientras disminuía la expresión de ALK1. Siendo también la expresión de TGF- β 1, en su forma latente, estimulada por la carga. Todos estos resultados han dilucidado el mecanismo que muestra que la señalización de TGF- β inducida por carga es un sistema elegante que evita la hipertrofia de los condrocitos y mantiene el cartílago articular sano. (Madej, W. *et al.*, 2016)

2.2.4.3 Efecto del TGF- β en hueso

El hueso subcondral es uno de los tejidos que muestra alteraciones en las articulaciones de la OA. La remodelación acelerada, indicada por la formación de quistes y la esclerosis subcondral son características de las articulaciones con OA (Day, J. S. *et al.*, 2004; Coughlin, T. R. *et al.*, 2016; Funck-Brentano, T. *et al.*, 2015). Varios estudios indican que el TGF- β se encuentra involucrado en las alteraciones presentadas por el hueso subcondral durante el desarrollo de la OA. En humanos, se ha reportado una correlación entre el TGF- β total y la gravedad de la patología, para OA de cadera y el aumento del ARNm de los subtipos de TGF- β 1 y TGF- β 3 en osteoblastos en hueso subcondral de articulaciones de rodilla artrósica (Zgoda, M. *et al.*, 2005; Sakao, K. *et al.*, 2009). En animales, se observó que tanto en ratas como en ratones con OA (modelo de transección del ligamento cruzado anterior [ACLT]) mostraron inhibición de la resorción ósea subcondral, invasión vascular y liberación local de TGF- β activo (Hayami, T. *et al.*, 2004; Zhen, G. *et al.*, 2013). A su vez se observó en el modelo de ratón, que concentraciones elevadas de TGF- β activo indujeron la formación de agrupaciones de células madre mesenquimales nestina positivas en el hueso subcondral. También, se ha puesto de manifiesto en ratones, que la expresión elevada de TGF- β 1 en osteoblastos indujo OA, mientras que la inhibición de TGF- β dio lugar a un menor desarrollo de OA (Zhen, G. *et al.*, 2013). Por otro lado, el tratamiento de ratones y ratas con OA (modelo ACLT) con halofuginona, un inhibidor de TGF- β , mostró una disminución en el deterioro del hueso subcondral (Cui, Z. *et al.*, 2016). Además, en un modelo de OA espontánea en cobayos los cambios en el hueso subcondral fueron en paralelo con la expresión activa de TGF- β . Estos datos indican que los altos niveles activos de TGF- β contribuyen a los cambios patogénicos observados en el hueso subcondral en las articulaciones de la OA.

En OA no solo tiene lugar la remodelación ósea sino también la formación de hueso nuevo como resultado de la condrogénesis y la osificación osteocondral, la formación de osteofitos. Los osteofitos son una característica típica de la OA, no observándose en las articulaciones afectadas por la artritis reumatoidea. Los osteofitos son crecimientos óseos que se originan a partir de células progenitoras que se ubican en el periostio, la línea fronteriza del cartílago y el hueso (van der Kraan, P. M. *et al.*, 2007).

Se ha observado, que las inyecciones de grandes cantidades de TGF- β 1 o la sobreexpresión mediante adenovirus de TGF- β 1 en las articulaciones de la rodilla de ratones inducen la formación de osteofitos con estructura y localización similares a las de los osteofitos encontrados en modelos

de OA (van Beuningen, H. M. *et al.*, 1994; Bakker, A. C. *et al.*, 2001). La inhibición de la actividad de TGF- β , ya sea bloqueando la unión del receptor mediante el uso del receptor de tipo II soluble o bloqueando la señalización intracelular usando Smad7, disminuyó significativamente la formación de osteofitos en ratones con OA (Scharstuhl, A. *et al.*, 2002; Scharstuhl, A. *et al.*, 2003).

Estos resultados indican que, al menos en modelos experimentales, el TGF- β es el principal impulsor de la formación de osteofitos. Los niveles elevados de TGF- β activo, ausentes en las articulaciones normales, activan las células progenitoras que residen en los tejidos articulares, como el periostio, para desencadenar la condrogénesis y finalizar con la producción de hueso nuevo.

2.2.4.4 Células madre mesenquimales (MSC) y OA

La investigación en modelos experimentales muestra que las MSC derivadas de membrana sinovial podrían ser los principales impulsores de la reparación del cartílago en la edad adulta. La alta capacidad proliferativa de las MSC en cultivo y sus capacidades condrogénicas y osteogénicas han puesto a estas células como principales candidatas para el desarrollo de terapias celulares para la OA. Se ha acumulado una gran cantidad de publicaciones sobre cultivo y expansión de MSC, las cuales se encuentran en fases clínicas para el tratamiento de la OA (Pers, Y. M. *et al.*, 2016; Yubo, M. *et al.*, 2017), aunque la combinación de gastos y eficacia limitada a largo plazo todavía presentan un obstáculo importante para la adopción de estas terapias.

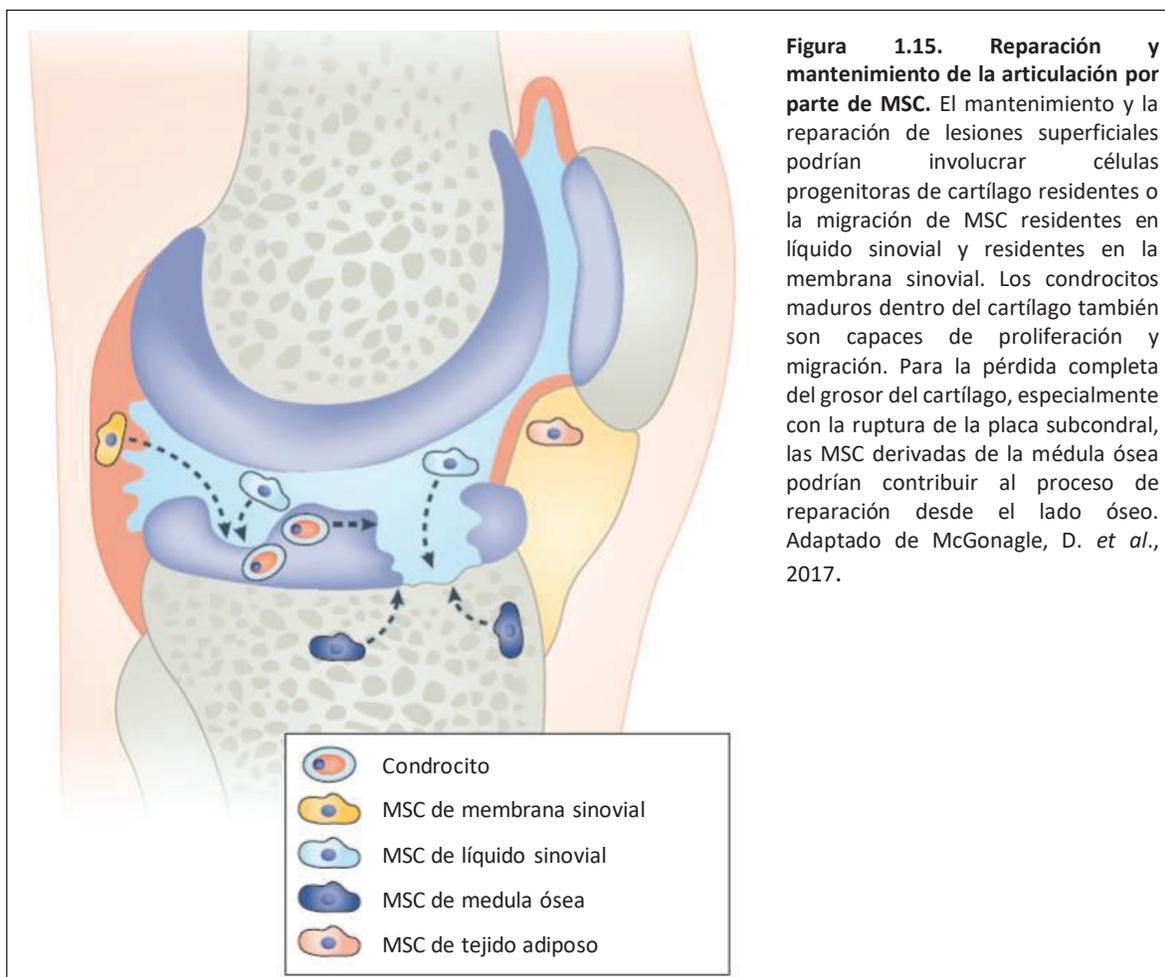
Se encontró que las MSC residentes en líquido sinovial existen a una frecuencia de ~ 40 células por millón de células mononucleares en el líquido sinovial de pacientes con OA, en comparación con ~ 1 – 2 células por millón en líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea (Jones, E. A. *et al.*, 2004). Posteriormente, se encontró que la frecuencia de MSC residentes en líquido sinovial aumentó en pacientes con OA precoz de rodilla con defectos de cartílago concomitantes en comparación con individuos con dolor de rodilla y ausencia de tales lesiones (Jones, E. A. *et al.*, 2008). A su vez, las MSC también están presentes en las articulaciones radiográficamente normales (Baboolal, T. G. *et al.*, 2014), y en el líquido sinovial de individuos sanos (Harris, Q. *et al.*, 2013).

El número de MSC residentes en líquido sinovial aumenta en respuesta al daño del ligamento y el menisco (Sekiya, I. *et al.*, 2012; Morito, T. *et al.*, 2008; Matsukura, Y. *et al.*, 2014) y también se ha informado de un aumento en el número de MSC en el cartílago de la zona superficial (Fellows, C. R. *et al.*, 2017) y el hueso subcondral (Campbell, T. M. *et al.*, 2016) de pacientes con OA. En conjunto, estos resultados sugieren un potencial de reparación natural, aunque inefectivo. Estudios independientes que involucran la administración intraarticular de MSC con cultivo expandido en el líquido sinovial han demostrado hasta ahora el injerto exitoso de estas células en los ligamentos dañados (Morito, T. *et al.*, 2008), el menisco dañado (Murphy, J. M. *et al.*, 2003) y los defectos del cartílago (Wood, J. A. *et al.*, 2012; Baboolal, T. G. *et al.*, 2016), lo que proporciona una prueba de principio de que las MSC residentes en las articulaciones podrían contribuir a la reparación de estructuras articulares accesibles.

El perfil genético de las MSC derivadas de líquido sinovial cultivadas y las comparaciones con las MSC residentes de membrana sinovial y de la médula ósea sugieren que las MSC residentes de líquido sinovial probablemente se originan en la membrana sinovial (Sekiya, I. *et al.*, 2012; Baboolal, T. G. *et al.*, 2014). Dado el tamaño de las articulaciones sinoviales humanas, la reubicación de las

MSC residentes de la membrana sinovial en el compartimento de fluido proporciona un mecanismo para el movimiento "de largo alcance" para acceder al cartílago lesionado y otros tejidos.

La identificación de poblaciones de MSC en múltiples tejidos dentro de la articulación, incluida la membrana sinovial, el tejido adiposo de la articulación, el líquido sinovial y el cartílago de la zona superficial, que ocupan el cartílago o están cerca de él, cuestiona la idea de que las MSC residentes en la médula ósea son absolutamente necesarias para la reparación del cartílago, especialmente para lesiones tempranas. Numerosos estudios no han podido observar las MSC circulatorias en las articulaciones sanas (Kuznetsov, S. A. *et al.*, 2001) o postrauma (Tan, H. B. *et al.*, 2015), y solo se ha observado un injerto limitado de MSC derivadas de la médula ósea en las lesiones de la superficie articular en modelos de ratón (Sergijenko, A. *et al.*, 2016), lo que brinda poco apoyo a la idea del papel biológico de las MSC de médula ósea (mediado por la circulación sistémica) en la reparación del cartílago (figura 1.15). Es en base a esto y a su factibilidad de obtención es que en esta tesis se optó por aislar MSC de líquido sinovial, esperando obtener información representativa de lo que está ocurriendo con estas células en la articulación.



2.2.4.5 Células madre mesenquimales (MSC), TGF- β y OA

El papel del TGF- β en la articulación normal y en la OA es sorprendentemente diferente. En una articulación normal, el TGF- β desempeña un papel importante y protector en el mantenimiento del condrocito diferenciado, mientras que en una articulación de OA, el TGF- β tiene una acción perjudicial debido a su presencia continua en niveles elevados. Esta acción cambiante del TGF- β propone a este como un candidato para la terapia de la OA. En general, la OA es un proceso focal, que se limita a una o una cantidad definida de articulaciones e incluso en una articulación específica, el proceso de la OA puede estar en etapas diferentes dentro de una misma articulación. Es por esto, que la inhibición sistémica de TGF- β tiene el peligro de afectar negativamente a las articulaciones normales, mientras que la adición de TGF- β extra activo puede resultar en efectos negativos de TGF- β como se describió anteriormente. Solo la inhibición local en articulaciones con OA severa parece ser una opción, aunque debe considerarse que el TGF- β también tiene un papel en la reparación del cartílago como estímulo de la condrogénesis de las células precursoras. Teniendo esto en cuenta, es que se hizo necesario profundizar aún más el estudio de la cascada de señalización de TGF- β en MSC de pacientes con y sin OA, con el fin de desarrollar terapias de tratamiento más efectivos de esta enfermedad.

Objetivos generales

- Ampliar el conocimiento de la cascada de señalización de TGF- β en leucocitos humanos mediante el estudio de TGFBR2, sus variantes de *splicing* e isoformas, que permita contribuir al desarrollo de nuevos biomarcadores y de estrategias objetivas de diagnóstico, pronóstico y actividad de la artritis reumatoidea.
- Estudiar en células madre mesenquimales de líquido sinovial (LS-MS) de pacientes con osteoartritis, la relación entre la cascada de señalización de TGF- β y su potencial regenerativo, con el fin de identificar moléculas biomarcadoras que permitan desarrollar métodos de diagnóstico, pronóstico y evaluación de la enfermedad más certeros, así como como individualizar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad.

Objetivos específicos capítulo 1: TGFBR2 y artritis reumatoidea

- Estudiar la relación entre la actividad de la AR (DAS28-ESD) y los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* TGFBR2A y TGFBR2B, en monocitos purificados mediante inmunoseparación magnética.
- Simplificar el método anterior utilizando células mononucleares de pacientes con AR.
- Evaluar, como posible biomarcador de actividad de la enfermedad, al porcentaje de neutrófilos de sangre periférica que expresan la proteína TGFBR2-SE en pacientes con AR.

Objetivos específicos capítulo 2: TGFBR2 y osteoartritis

- Aislar y caracterizar LS-MS aisladas a partir de líquido sinovial de pacientes OA, y de lavado articular de individuos No-OA.
- Evaluar los niveles de ARNm de las distintas variantes de *splicing* de TGFBR2 en LS-MS.
- Estudiar si existe relación entre esas variantes de *splicing*, y el potencial de diferenciación osteogénico y condrogénico de LS-MS de pacientes con OA e individuos sin OA.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión del receptor TGFBR2-SE y su proteína de fusión TGFBR2-SE/Fc sobre el potencial de diferenciación osteogénico y condrogénico de LS-MS.

Materiales y métodos

1. Materiales

1.1 Cepa bacteriana y plásmidos

Para la amplificación de plásmidos se empleó la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* (genotipo: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]). Los genes enumerados son alelos mutantes. Los genes del episoma F' son de tipo salvaje).

Como vector para el clonado de productos de PCR se empleó el plásmido pGEM®-T Easy Vector (Promega Corporation, WI, USA).

Para la generación de los vectores lentivirales se utilizaron los siguientes plásmidos:

- pRSV-Rev (Dull, T. *et al.* 1998): plásmido que expresa el ADNc de rev, gen regulador del HIV-1, en el cual el segundo y tercer exón de rev, unidos, se encuentran bajo el control transcripcional del promotor U3 de RSV. Además, lleva el gen de resistencia a ampicilina para su propagación y selección en bacterias.

- pMDLg/pRRE (Dull, T. *et al.* 1998): plásmido de expresión bajo el control del promotor del CMV que contiene las secuencias que codifican para gag y pol, genes estructurales comunes de retrovirus, y la secuencia que contiene RRE (motivo de ARN, elemento de respuesta a Rev) del HIV-1. Lleva, además, el gen de resistencia a ampicilina para su propagación y selección en bacterias.

- pCMV-VSV-G (Stewart, S. A. *et al.* 2003): plásmido que codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular, VSV-G (por sus siglas en inglés, G glycoprotein of the vesicular stomatitis virus), bajo el control del promotor del CMV. VSV-G media la entrada viral a la célula. Como no necesita un receptor celular de superficie, VSV-G puede usarse como una proteína de envoltura viral sustituta. El plásmido lleva, además, el gen de resistencia a ampicilina, para su propagación y selección en bacterias.

- pRRL-SIN18-CMV-pPGK.GFP-WPRE (Zufferey, R. *et al.*, 1998): plásmido de transferencia lentiviral (gentilmente cedido por el Prof. Luigi Naldini, Milán, Italia).

Nombre	ATCC N°	Descripción	Medio de cultivo
293T	CRL-11268	Línea celular derivada de células humanas embrionarias de riñón inmortalizadas con el antígeno T de SV40.	DMEM-SFB10%
A549	CCL-185	Línea celular derivada de carcinoma de pulmón humano.	DMEM-SFB10%
hASC	-	Cultivo primario de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano.	DMEM-SFB10%
LS-MSC OA	-	Cultivo primario de células madre mesenquimales derivadas de líquido sinovial humano.	DMEM-SFB10%
LS-MSC Postrauma	-	Cultivo primario de células madre mesenquimales derivadas de lavado articular postrauma humano.	DMEM-SFB10%

1.2 Líneas celulares y cultivos primarios

Las líneas celulares y cultivos primarios utilizados fueron crecidos a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂. En todos los casos se trabajó con células libres de micoplasma, determinado mediante tinción con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y posterior microscopía de fluorescencia.

1.3 Enzimas

Todas las enzimas empleadas en los procedimientos de biología molecular fueron adquiridas de Promega (Promega, WI, USA), New England Biolabs (NEB, Bad Schwalbach, Alemania) o de Roche (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

1.4 Citoquinas/ Anticuerpos

Las citoquinas fueron reconstituidas según las instrucciones del fabricante, separadas en alícuotas y conservadas a -20 °C hasta su uso. Una vez descongeladas se conservaron a 4 °C por cortos períodos de tiempo.

Citoquinas/ Anticuerpos	Uso	Dilución	Compañía
TGF-β3	Diferenciación condrogénica		PeptoTech Mexico
Anti-CD90 PE	Marcación células mesenquimales	1μ cada 10 ⁵	BD biosciences, USA
Anti-CD105 PE	Marcación células mesenquimales	1μ cada 10 ⁵	BD biosciences, USA
Anti-CD73 PE	Marcación células mesenquimales	1μ cada 10 ⁵	BD biosciences, USA
Anti-CD45 PE	Marcación células mesenquimales	1μ cada 10 ⁵	BD biosciences, USA
Anti-CD34 PE	Marcación células mesenquimales	1μ cada 10 ⁵	BD biosciences, USA
Anti-TGFBR2-SE ATTO647N	Marcación células mesenquimales	1μ cada 10 ⁶	Rhea Biotech, Brasil
Anti-CD14 APC	Marcación macrófagos	1μ cada 10 ⁵	BD biosciences, USA
Anticuerpo monoclonal anti CD14 humano conjugado a partículas magnéticas	Selección positiva de subpoblaciones sanguíneas	20 μl cada 10 ⁷ células totales	Miltenyi Biotec
Control isotipo IgG ratón PE	Marcación control	1μ cada 10 ⁵	BD biosciences, USA

2. Métodos

2.1 Procedimientos microbiológicos

2.1.1 Preparación de bacterias competentes químicas

Las bacterias competentes químicas se prepararon como se describe en Maniatis, T. *et al.* (Maniatis, T. *et al.*, 1982), con algunas modificaciones. Brevemente, se partió de una colonia de bacterias XL1-Blue en placa de LB sólido. La colonia se inoculó en 5 ml de medio LB y se cultivó durante 16 horas a 37 °C con agitación. Un mililitro de este cultivo se utilizó para inocular 50 ml de medio LB. Este nuevo cultivo se creció a 37 °C y 225 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de entre 0.45 y 0.55. Posteriormente, se enfriaron las bacterias 15-30 minutos en hielo y, luego, se centrifugaron 8 minutos a 3000 rpm y 4 °C. Una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendió delicadamente el pellet que contenía las bacterias en 5 ml de medio LB y 5 ml de TSS-2X y se incubaron otros 15-30 minutos en hielo. Las bacterias competentes químicas obtenidas se fraccionaron en alícuotas de 200 µl, se congelaron en N₂ líquido y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

2.1.2 Transformación de bacterias competentes químicas

La transformación de bacterias competentes químicas se realizó como se describe en Maniatis, T. *et al.* (Maniatis, T. *et al.*, 1982), con algunas modificaciones. Brevemente, se descongelaron 50 µl de bacterias competentes químicas durante 10 minutos en baño de agua-hielo. Luego, se les agregaron 5-20 ng de la mezcla de ligación o plásmido a amplificar y se continuó con la incubación en hielo durante 30 minutos. A continuación, se les realizó el shock térmico incubándolas 90 segundos a 42 °C y, luego, transfiriéndolas rápidamente a hielo durante 2 minutos. Posteriormente se les agregaron 200 µl de LB sin antibiótico y se las cultivó durante 30 minutos a 37 °C con agitación. Una vez recuperado el cultivo bacteriano se lo sembró en placas con medio LB sólido en presencia de ampicilina (100 mg·ml⁻¹) y se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

2.2 Técnicas de biología molecular

2.2.1 Extracción de ARN

El ARN fue aislado a partir de 10⁵-10⁷ células usando el kit comercial SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, USA), siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El ARN purificado se resuspendió en 50 µl de buffer de elución o de agua libre de nucleasas, según la recomendación del fabricante del kit, se cuantificó usando el SynergyTM (Bio Tek, Vermont, Estados Unidos) y se conservó a -80 °C hasta su uso.

2.2.2 Generación de ADN complementario (ADNc)

Las reacciones de retrotranscripción se realizaron en un volumen final de 25 µl compuesto de 1.5 µg de ARN, 0.02 µg·µl⁻¹ de *primers* OligodT15 (Biodynamics) y 200 U de transcriptasa reversa de M-MLV (Promega, WI, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADNc generado se conservó a -80 °C hasta su uso.

2.2.3 RT-PCR y RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µl compuesto de 0.5 µM *primers* directo y reverso, 0.2 mM dNTPs, 2 µl de molde (ADNc sin diluir o en diluciones 1/5 y 1/10) y 0.25 U de GoTaq (Promega, WI, USA). Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 5 minutos a 95 °C; 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto a 62 °C y 1 minuto a 72 °C y 1 ciclo de 10 minutos a 72 °C.

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron usando un equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, California, USA). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µl compuesto de 2 µl de ADNc, Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX) 1X (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), y 300 nM de *primers* directo y reverso. En cada ensayo las muestras se analizaron por triplicado. Para la normalización se amplificó el gen constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 15 minutos a 95 °C y 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C y 30 segundos a 62 °C. Luego, se realizó una curva de disociación para evaluar la presencia de productos de amplificación inespecíficos.

Las secuencias de los *primers* usados fueron:

- variantes de *splicing* de TGFBR2

P1: 5' CTGTAATAGGACTGCCCATC 3', P2: 5' TCTCTAGTGTTATGTTCTCGTC 3', P3: 5' GCACGTTTCAGAAAGTCGGTTAA 3', P4: 5' GCACTTTGGAGAAGCAGGATT 3'.

Para la amplificación específica de las distintas variantes de *splicing* de TGFBR2 se utilizaron distintas combinaciones de estos *primers*. Para TGFBR2A se usaron los *primers* P2 y P3, para TGFBR2B P1 y P2 y para TGFBR2-SE los *primers* P3 y P4.

- GAPDH (211 pb) (Dewey, R. A. *et al.*, 2006)

F: 5' GTCAGTGGTGGACCTGACC 3', R: 5' TGAGCTTGACAAAGTGGTCG 3'

2.2.4 Preparación de ADN plasmídico en gran escala (maxipreparación)

Para la transfección de células de humanas se utilizaron plásmidos de alta pureza que se obtuvieron con el kit comercial QIAGEN Plasmid Maxi Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.5 Obtención y cuantificación de proteínas

Para disminuir la degradación de proteínas los sobrenadantes celulares provenían de cultivos realizados en presencia de inhibidores de proteasas (PIC para usar en medio de cultivo celular, Sigma-Aldrich, MO, USA). El PIC se usó al 0.25 %. Las muestras proteicas se conservaron a -80 °C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas presentes en el medio de cultivo se realizó mediante el método de Bradford, realizando una curva estándar con BSA. Tanto los estándares para la construcción de la

curva como las muestras a cuantificar se midieron a 595 nm usando un espectrofotómetro BioPhotometer (Eppendorf, Alemania).

2.3 Procedimientos con cultivos celulares eucariotas

2.3.1 Aislamiento de leucocitos de sangre periférica humana

2.3.1.1 Separación de células sanguíneas

A partir de sangre periférica anticoagulada con 7,2 mg de EDTA cada 4ml (Vacutainer®, BD, NJ, USA) se realizó una centrifugación por gradiente con Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, USA), luego de la que se obtuvieron dos fracciones celulares; una conteniendo granulocitos y eritrocitos y, la otra, células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los granulocitos puros, se obtuvieron lisando eritrocitos con una solución de NH₄Cl 0,83 % p/v, KHCO₃ 0,1 % p/v y EDTA 0,009 %p/v. Granulocitos y PBMC fueron cuantificados en cámara de Neubauer por medio del método de exclusión de azul de tripano. Los granulocitos y las PBMCs se utilizaron en el día para los procedimientos de marcado superficial e intracitoplasmático, y se conservaron a -80 °C en buffer de lisis para extracción de ARN hasta su uso.

2.3.1.2 Fijación, permeabilización y marcación intracitoplasmática

Para la determinación intracitoplasmática de TGFBR2-SE se utilizó el Kit Cytofix/ Cytoperm® de BD (BD, NJ, USA), desarrollando el protocolo indicado para células en suspensión. Se separaron fracciones de 1x10⁶ células, Granulocitos y PBMCs, para ser marcadas intracitoplasmáticamente.

Para la detección intracitoplasmática se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-TGFBR2-SE unido al fluorocromo ATTO647N generado en ratón (0,5 µg/100 µl solución de permeabilización, REA biotech, Brasil).

2.3.1.3 Inmunoseparación magnética de subpoblaciones de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares, obtenidas luego del gradiente con Ficoll, fueron purificadas mediante la utilización de anticuerpos monoclonales anti-CD14 conjugados a partículas magnéticas (BD, NJ, USA). La separación magnética se realizó utilizando un separador BD IMag® (BD, NJ, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células viables purificadas fueron cuantificadas en cámara de Neubauer por medio del método de exclusión de azul de tripano. La pureza fue determinada mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD14 conjugados al fluorocromo APC y su correspondiente control de isotipo (BD, NJ, USA) y por citometría de flujo con un equipo FACSCalibur™ (BD, NJ, USA). Las células purificadas se conservaron a -80 °C, en buffer de lisis para extracción de ARN hasta su uso.

2.3.2 Aislamiento de células mesenquimales (MSC)

2.3.2.1 Aislamiento de células mesenquimales estromales de tejido adiposo (ASC)

Muestras de tejido adiposo subcutáneo fueron obtenidas de donantes sanos sometidos a procedimientos quirúrgicos electivos (edad 30-40 años) en el Departamento de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva (Hospital Italiano, La Plata, Argentina). El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética local y por el Ministerio de Salud (Buenos Aires, Argentina). Previo a la cirugía, los pacientes acordaron donar el tejido adiposo mediante la firma voluntaria de un consentimiento informado.

Se aislaron células ASC de aspirados de liposucción utilizando colagenasa al 0,1% (tipo I, Sigma) y tripsina 0,25% (Sigma), como buffer de digestión, siguiendo los protocolos descritos por Zhu y colaboradores (Zhu Y, *et al.* 2008). Las células se sembraron en medio de cultivo DMEM (Gibco, Life Technologies, USA), conteniendo 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Life Technologies, USA), y 1% de glutamina (Gibco, Life Technologies, EE.UU) a una densidad de 2 células nucleadas/cm². La complementación del suero se realizó con 10% SFB. Las células adherentes se dividieron al llegar a un 80% de confluencia.

2.3.2.2 Aislamiento de células mesenquimales de líquido sinovial (LS-MSC OA) y lavado articular postrauma (LS-MSC No-OA)

Muestras de líquido sinovial de pacientes con artrosis y lavado articular de individuos no OA, se obtuvieron siguiendo criterios de inclusión previamente establecidos, en la Clínica Privada Chascomús a cargo del Dr. Sebastián Orłowski. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética local y por el Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires. Antes de la punción de líquido sinovial (OA) o artroscopia (No-OA), los pacientes acordaron donar el líquido sinovial o el lavado respectivamente mediante la firma de un consentimiento informado, de manera voluntaria.

Se aislaron células MSC de aspirados de rodilla, siguiendo el protocolo establecido por Jones y colaboradores con modificaciones menores. Las células se sembraron en medio de cultivo DMEM (Gibco, Life Technologies, USA) conteniendo 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, Life Technologies, USA), y 1% de glutamina (Gibco, Life Technologies, USA) a una densidad de 2 células nucleadas/cm². La complementación del suero se realizó con 10% SFB (Jones, E. *et al.*, 2004).

Las células adherentes se dividieron al llegar a un 80% de confluencia. Los cultivos hasta pasaje 7 se usaron para experimentos adicionales.

Para la caracterización de las mismas se utilizaron anticuerpos unidos al fluorocromo PE (*Phycoerythrin*) anti-CD90, anti-CD105, anti-CD73 y anti-CD45 (BD, NJ, USA), realizando la detección en un equipo FACSCalibur™ (BD, NJ, USA).

2.3.2.3 Diferenciación de MSC hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico

La capacidad de diferenciación multilinaje de ASCs se evaluó incubando a las células siguiendo los protocolos de diferenciación adipogénico y osteogénico, descritos por Zuk y colaboradores (Zuk P, *et al.* 2001) y el protocolo de Sampaio de Mara y colaboradores para el caso del linaje condrogénico (Mara, C. S. *et al.*, 2011), con modificaciones menores.

Para comprobar el potencial adipogénico, osteogénico y condrogénico de las células, se sembraron 50.000 células en placas de 24 pocillos. Para la adipogénesis, el método constó de cuatro ciclos de tratamiento, que consistieron en 72 hs de exposición de las células a medio de inducción que consistía en DMEM (Gibco), 10% de FBS, 1% de penicilina / estreptomina (Gibco) y glutamina 1% (Gibco), 500M de 1-metil-3-isobutilxantina (IBMX, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), 100M de Indometacina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), 10 μ M insulina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.) y Dexametasona 1M. Luego de esto las células se incubaron durante 24 hs en medio de mantenimiento que consistió en DMEM, 10% FBS, 1% de penicilina / estreptomina (Gibco), 1% de solución de glutamina (Gibco), e Insulina 10 μ M. La acumulación de lípidos se evaluó mediante tinción con Oil Red O.

Para la diferenciación osteogénica, las células se cultivaron durante 21 días en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 1% de penicilina/estreptomina (Gibco) y glutamina al 1% (Gibco), 50 μ M L-ascorbato-2-fosfato, 10mM de b-glicerofosfato y 0.1 μ M de Dexametasona (Sigma, St. Louis, MO, USA). El medio se cambió dos veces por semana. La deposición de calcio se evaluó 3 semanas después de la inducción a través de tinción con Alizarin Red S. Mientras que para la diferenciación condrogénica, las células se cultivaron durante 21 días en medio DMEM suplementado con 1% FBS, 1% de penicilina/estreptomina (Gibco) y glutamina al 1% (Gibco), 25 μ g/ml de L-ascorbato-2-fosfato, 10 μ g/ml de Insulina, 5,5 μ g/ml de Transferrina, 5 ng/ml de Ácido Selénico, 25 ng/ml de TGF- β 3, 40 μ g/ml L-Prolina y 0.1 μ M de Dexametasona (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). Este medio se cambió dos veces por semana.

La deposición de calcio se evaluó 3 semanas después de la inducción a través de tinción con Alizarin Red S. La cuantificación del Alizarin Red se realizó extrayendo el colorante con 300 μ l de ácido acético 10% v/v en agua destilada y se midió la absorbancia a 405 nm, usando un equipo Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek Instruments, Inc., USA) (Yu, F. *et al.*, 2016). Los resultados obtenidos para cada cultivo primario (por triplicados) fueron normalizados restando la absorbancia del mismo tipo celular teñido con Alizarin Red sin diferenciar y dividiendo por la proteína total extraída de un pocillo diferenciado. En todos los casos, los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar (SE).

La cuantificación del Alcian Blue se realizó siguiendo el protocolo de Lunstrum y colaboradores, extrayendo el colorante con 300 μ l de SDS 1%v/v en agua destilada. Luego se sembraron 100 μ l correspondientes a cada pocillo en placas de 96 pocillos y se midió la DO a 605 nm usando un equipo Synergy H1 Hybrid Reader (BioTek Instruments Inc., USA) (Lunstrum, G. P. *et al.*, 1999). Los resultados obtenidos para cada cultivo (por simplificados) fueron normalizados respecto del mismo tipo celular teñido con Alcian blue sin diferenciar.

2.3.3 Producción de vectores lentivirales

Los vectores lentivirales se generaron mediante transfección de células 293T con 8 µg del plásmido de transferencia junto a 12 µg del plásmido pMDLg/pRRE, 2 µg de pCMV-VSVG y 5 µg de pRSV-REV, utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio (Schambach, A. *et al.* 2006). Brevemente, se cultivaron 5×10^6 células 293T por placa de cultivo de 10 cm de diámetro en presencia de DMEM suplementado. Luego de la incubación durante 6 horas a 37 °C, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco y 25 µM de cloroquina, para disminuir la degradación lisosomal de los plásmidos transfectados. Por otra parte, se preparó una mezcla compuesta por los 4 plásmidos antes mencionados y 50 µl de CaCl₂ 2 M, en un volumen final de 500 µl. Esta mezcla fue agregada a un tubo que contenía 500 µl de HBS 2X y, rápidamente, se agitó durante 15 segundos utilizando un vórtex. La mezcla de ADN con fosfato de calcio se agregó, gota a gota, sobre la monocapa de células 293T. Las células se incubaron durante 16 horas a 37 °C, luego de lo cual se lavaron y se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco. El sobrenadante celular, que contenía las partículas del vector lentiviral, se cosechó tres veces reemplazándolo por medio de cultivo fresco cada vez, con una periodicidad de ocho horas. Los sobrenadantes con las partículas del vector lentiviral se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm y se purificaron mediante la utilización de un filtro con diámetro de poro de 0.22 µm. Los sobrenadantes con las partículas lentivirales se fraccionaron en alícuotas y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

2.3.4 Titulación de los sobrenadantes virales

Para la determinación de los títulos virales se sembraron 10^5 células A549 por pocillo en una placa de 6 pocillos. Luego de incubar las células durante 6 horas a 37 °C, se agregaron distintas diluciones del sobrenadante con las partículas virales y 8 µg.ml⁻¹ de polibreno. Tres días después, las células se cosecharon y el porcentaje de células que expresaban eGFP se evaluó mediante citometría de flujo con un equipo BD FACSCalibur™ (BD, NJ, USA). Con los valores obtenidos se calcularon los títulos virales correspondientes, expresados en unidades de transducción (UT).ml⁻¹. Para ello, se multiplicó el número de células sembradas por pocillo por el factor de dilución y por el porcentaje de células que expresaban eGFP y, luego, se dividió por el volumen en el que se sembraron las células:

$$\text{Título viral} \left(\frac{UT}{ml} \right) = n^{\circ} \text{células} \times \text{factor de dilución} \times \% \text{células eGFP} / \text{volumen}$$

Los títulos de los vectores lentivirales obtenidos fueron del orden de 10^6 - 10^8 UT.ml⁻¹.

2.3.5 Transducción de MSC con vectores lentivirales

Células MSC en pasaje 3 fueron transducidas con los vectores lentivirales a una multiplicidad de infección (MOI) de 200 unidades de transducción (UT) por célula, en presencia de 8 µg.ml⁻¹ de polibreno, durante 72 hs. La eficiencia de la transducción se determinó mediante citometría de flujo, midiendo el porcentaje de células que expresaban eGFP, con un equipo FACSCalibur™ (BD, NJ, USA). Las células fueron posteriormente expandidas.

2.3.6 Citometría de flujo

Para el análisis por citometría de flujo se emplearon, como mínimo, 5×10^4 células viables cuantificadas en una cámara de Neubauer por el método de exclusión de azul de tripano. Las células se resuspendieron en 100 μ l de solución de fijado. Las medidas se hicieron con un equipo FACSCalibur (BD, NJ, USA) y el análisis de los datos obtenidos con el programa FlowJo (FlowJo LLC, USA).

2.4 Estadística

El análisis estadístico de los datos provenientes de las RT-qPCR se hizo empleando el software InfoStat (Di Rienzo, J. A. *et al.*, 2010). Los contrastes de medias se realizaron mediante el test de Student, cuando se contrastaron dos muestras; y mediante ANOVA de una vía seguido por el test de Tukey, cuando el contraste fue entre tres o más muestras. Para realizar estos tests se utilizó el *software* Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

-Capítulo 1-
TGFBR2 y artritis reumatoidea

1. Validación de correlaciones entre los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* TGFBR2A y TGFBR2B en monocitos y determinaciones clínicas de la AR.

Con el fin de verificar si los monocitos purificados por un método más específico y por consiguiente más efectivo que la adherencia al plástico (cohorte 1; Carrea, A. Tesis doctoral 2015), en el desarrollo de esta tesis, se aislaron monocitos por medio de inmunoseparación magnética en un panel adicional de 8 pacientes con AR (cohorte 2). Se obtuvo información sobre: edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad, enfermedades concomitantes, medicaciones para la AR y medicaciones concomitantes. Se les determinó el número de articulaciones doloridas, número de articulaciones inflamadas, lesiones radiológicas, densidad mineral ósea de columna lumbar y cuello de fémur y se midió la velocidad de eritrosedimentación (ESD) a cada uno de los voluntarios. Además se obtuvieron datos de DAS28-ESD.

Los datos y determinaciones clínicas y bioquímicas de los voluntarios se resumen en la tabla 2.1.

Características	RA Cohorte 2 (n=8)
Demográficos	
Edad (Años)	48.4 (30-64)
Género (F/M)	8/0
Duración de la enfermedad (Años)	5.47 (0,5-15)
Determinaciones clínicas	
Número de articulaciones doloridas (0-28)	9.5 [0-24]
Número de articulaciones tumefactas (0-28)	8.37 [0-19]
DAS28-ESD	5.3 [3.27-7.21]
HAQ-DI	1.16 [0.25-2.8]
VAS dolor paciente (mm)	42.6 [8-87]
VAS actividad paciente (mm)	34 [4-83]
VAS médico (mm)	32.5 [2-83]
Determinaciones bioquímicas	
ESD (mm/hr)	42.6 [12-70]
Tratamiento con drogas	
NSAIDs	7/8
DMARDs	5/8

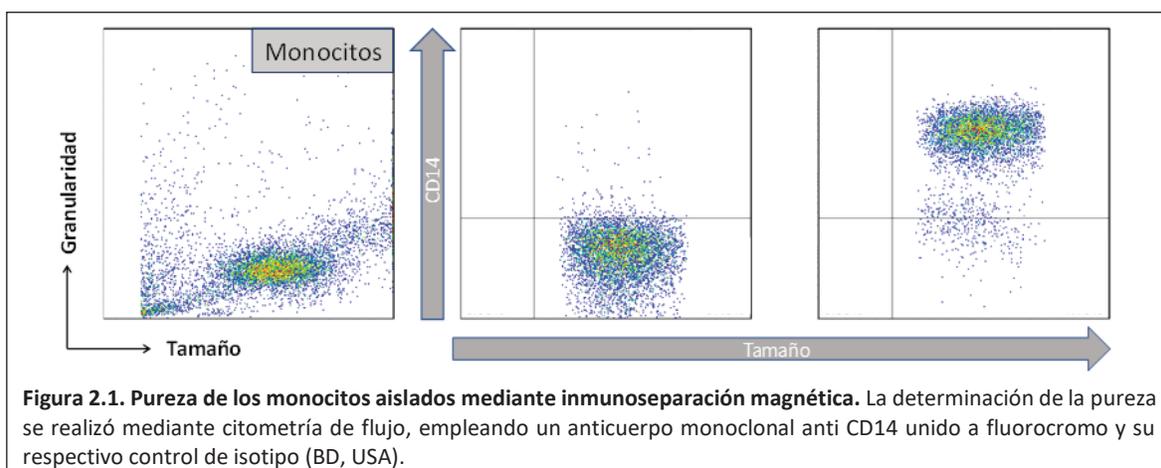
Tabla 2.1. Datos y determinaciones clínicas y bioquímicas de los voluntarios de la cohorte 2. Los valores corresponden a medias y, entre paréntesis, mínimos y máximos. F: femenino; M: masculino; ESD: eritrosedimentación; NSAID: por sus siglas en inglés, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; DMARD: por sus siglas en inglés, Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs.

La purificación inicial se basó en la separación de las células mononucleares de los granulocitos y eritrocitos mediante gradiente con Ficoll-Paque™. A partir de la fracción de células mononucleares se obtuvieron monocitos por medio de inmunoseparación magnética utilizando anticuerpos anti-CD14. Esta subpoblación se purificó empleando un separador magnético BD IMag®, como se describe en la sección 2.3.1.3 de materiales y métodos. La pureza de las subpoblaciones de monocitos CD14 aisladas, fue determinada por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-CD14 unido al fluorocromo APC, la misma varió entre 84% y 98% (Tabla 2.2).

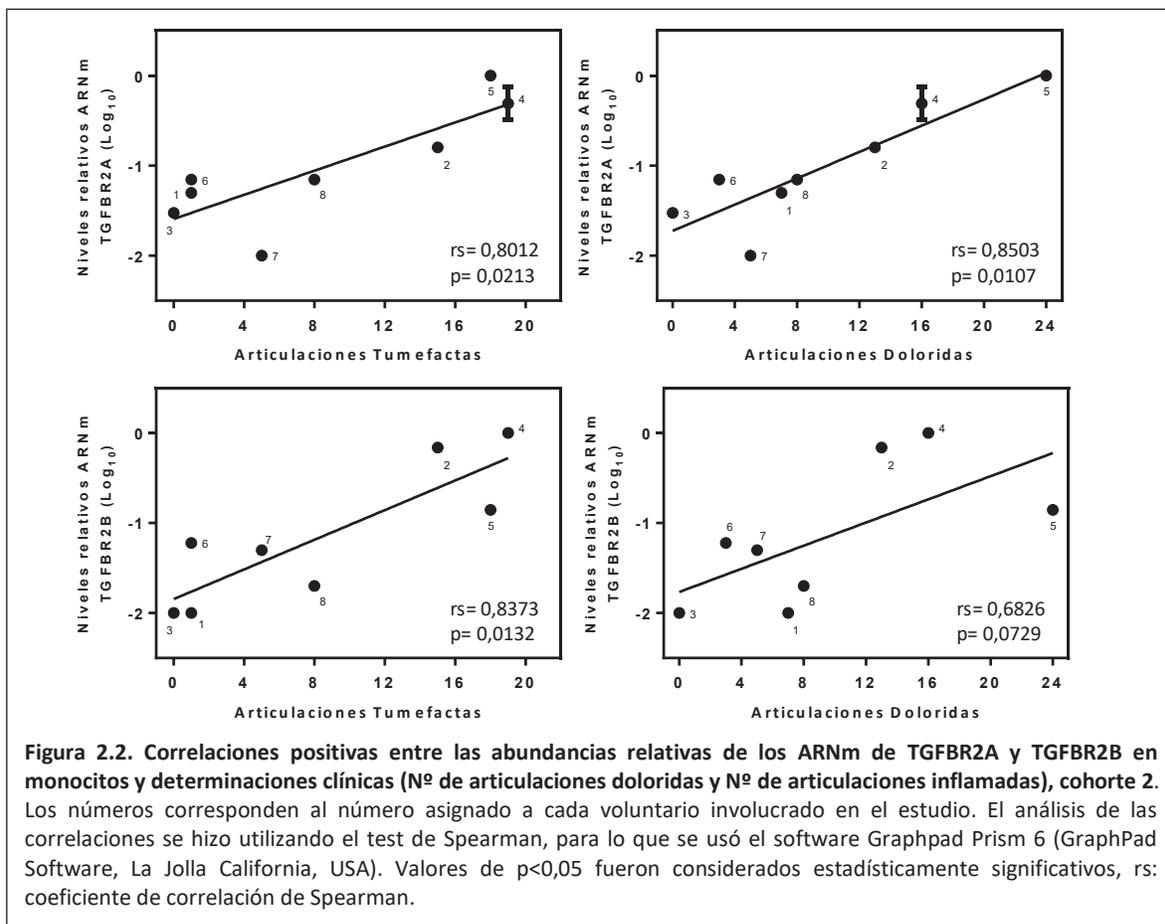
Nº y sexo voluntarios	Pureza Monocitos (%)
01/F	85
02/F	84
03/F	98
05/F	93
06/F	96
07/F	90
08/F	78
09/F	87

Tabla 2.2. Pureza de monocitos, aislados a partir de sangre periférica de voluntarios con AR cohorte 2, determinada por citometría de flujo. Los números de los voluntarios corresponden a los que les fueron asignaron en el estudio. F: femenino; M: masculino.

En la figura 2.1 se muestran diagramas de citometría de flujo representativos de la pureza de estas subpoblaciones leucocitarias.



Al igual que lo observado anteriormente en el laboratorio con un método de aislamiento menos específico como lo es la adherencia al plástico, se pudo observar que en pacientes con AR los niveles de ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B en monocitos aislados por inmunoseparación magnética se correlacionan positivamente, y de manera significativa, con el número de articulaciones doloridas y con el número de articulaciones inflamadas (figura 2.2).

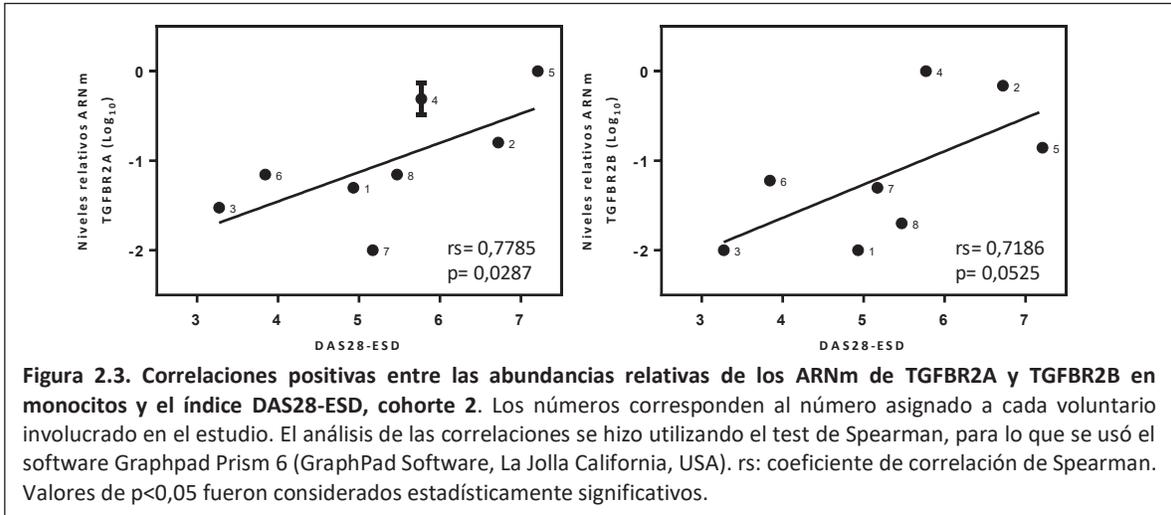


Como ya se ha mencionado, DAS28-ESD es un índice que se emplea rutinariamente para determinar la actividad de la AR e incluye al número de articulaciones doloridas (NAD), al número de articulaciones inflamadas (NAI) —ambas determinadas sobre un total de 28 articulaciones definidas— y a la ESD.

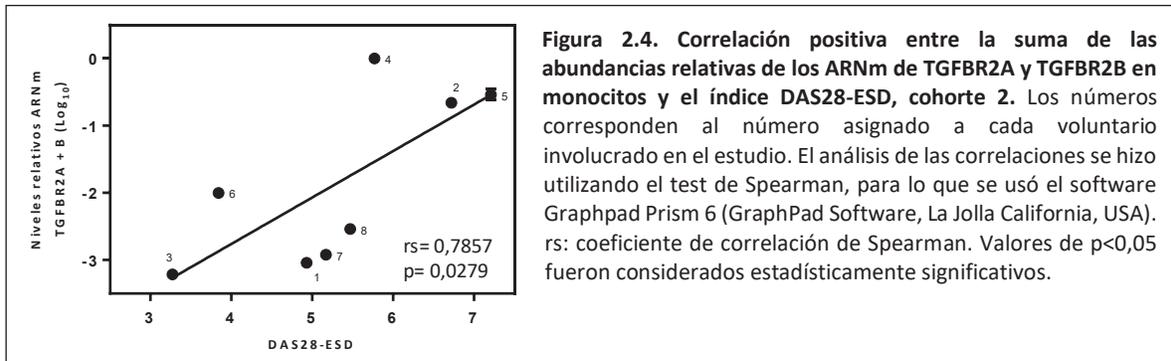
$$DAS28 = 0,56^2\sqrt{NAD} + 0,28^2\sqrt{NAI} + 0,70(\ln ESD)$$

Es de esperar que, si las correlaciones entre los niveles de los ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B en monocitos y el número de articulaciones doloridas e inflamadas son estadísticamente significativas, también lo sean aquellas entre los mismos ARNm y el índice DAS28-ESD, ya que estas dos determinaciones clínicas están contenidas en la definición de DAS28. Es importante resaltar que, si bien la ESD también está contenida en el índice DAS28-ESD, se trata de una variable inespecífica que puede verse afectada por otros factores además de la inflamación. Por esa razón, la ESD se utiliza generalmente en conjunto con otras determinaciones de la enfermedad.

Al igual que en los monocitos de la cohorte 1, se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre DAS28-ESD y el nivel de ARNm de ambos, TGFBR2A y TGFBR2B (figura 2.3). Sin embargo, en este nuevo análisis, la correlación entre DAS28-ESD y la abundancia de ARNm de TGFBR2B fue estadísticamente no significativa, a diferencia de lo observado para la primera cohorte donde esta correlación era la más fuerte y estadísticamente significativa.



Similar a lo observado para la cohorte 1, cuando se representaron gráficamente la suma de los niveles relativos de ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B respecto del índice DAS28-ESD (figura 2.4), se encontró una correlación positiva más fuerte y estadísticamente más significativa, que el análisis individual para cada uno de los genes.



Assumiendo comparativos ambos métodos de purificación, se procedió a analizar las correlaciones obtenidas para la abundancia de los ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B incluyendo ambas cohortes, observándose correlaciones estadísticamente significativas para ambos genes (figura 2.5) respecto del índice DAS28-ESD. Siendo la correlación TGFBR2A/DAS28-ESD la más fuerte y estadísticamente significativa.

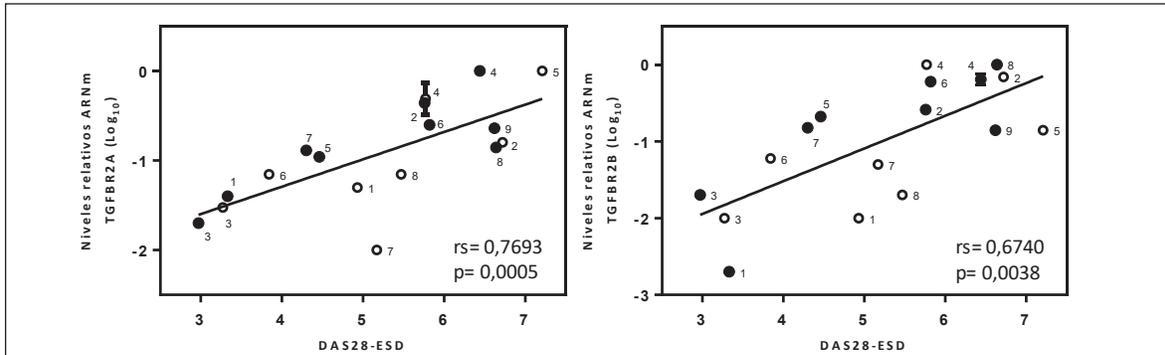


Figura 2.5. Correlaciones positivas entre la suma de las abundancias relativas los ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B en monocitos y el índice DAS28-ESD, cohorte 1 y 2. Los números corresponden al número asignado a cada voluntario involucrado en el estudio. Círculos llenos: cohorte 1; círculos vacíos: cohorte 2. El análisis de las correlaciones se hizo utilizando el test de Spearman, para lo que se usó el software Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). rs: coeficiente de correlación de Spearman. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Finalmente, se realizó nuevamente el análisis de la correlación más fuerte obtenida para la primera cohorte, aquella que evaluaba la suma de los niveles relativos de ARNm de los genes TGFBR2A y TGFBR2B respecto del DAS28-ESD de cada paciente, incluyendo ahora el total de pacientes (cohorte 1 y 2, $N=17$). Observándose nuevamente una correlación fuerte y estadísticamente significativa ($p=0,0007$) (figura 2.6).

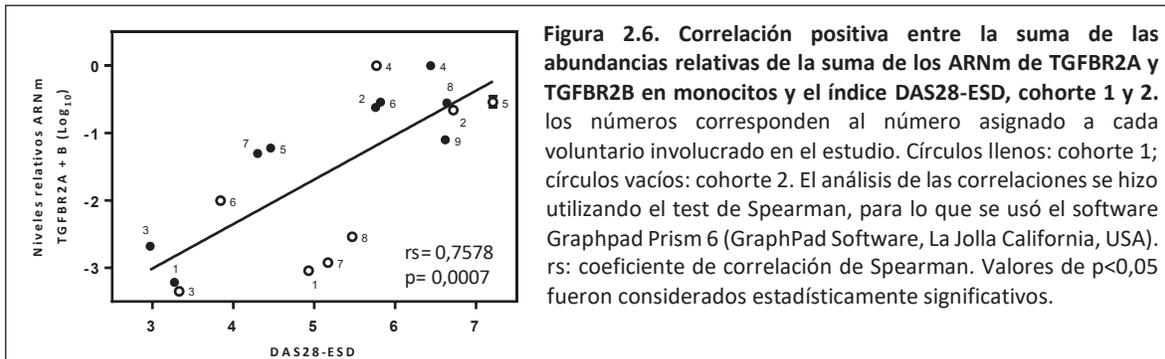


Figura 2.6. Correlación positiva entre la suma de las abundancias relativas de la suma de los ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B en monocitos y el índice DAS28-ESD, cohorte 1 y 2. los números corresponden al número asignado a cada voluntario involucrado en el estudio. Círculos llenos: cohorte 1; círculos vacíos: cohorte 2. El análisis de las correlaciones se hizo utilizando el test de Spearman, para lo que se usó el software Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). rs: coeficiente de correlación de Spearman. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

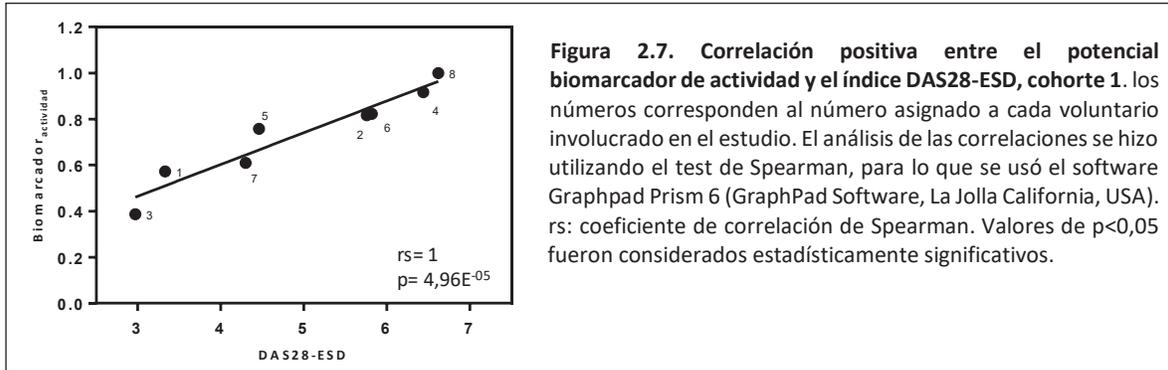
Este resultado indicaría que ambos métodos de purificación de monocitos a partir de sangre periférica, adherencia al plástico (cohorte 1, $N=9$) e inmunoseparación magnética (cohorte 2, $N=8$) proporcionan resultados comparables.

2. Análisis de un potencial biomarcador de actividad de la AR en células mononucleares y simplificación del método de purificación celular.

Del re análisis de los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* del TGFBR2 en linfocitos y monocitos obtenidos previamente en el laboratorio (Cohorte 1; Carrea, A. Tesis doctoral 2015), se observó que en una cohorte de 8 pacientes con AR, la relación entre los niveles de ARNm de TGFBR2-SE ($\Delta Ct_{TGFBR2-SE}$) respecto de la suma de los niveles de ARNm de TGFBR2A ($\Delta Ct_{TGFBR2A}$) y TGFBR2B ($\Delta Ct_{TGFBR2B}$) correlacionaron positivamente, y de manera significativa, con los valores del índice DAS28-ESD (figura 2.7).

*Biomarcador*_{actividad}

$$= \frac{(\Delta Ct_{TGFB2Se\ monocitos} + \Delta Ct_{TGFB2Se\ linfocitos})}{(\Delta Ct_{TGFB2A\ monocitos} + \Delta Ct_{TGFB2A\ linfocitos} + (\Delta Ct_{TGFB2B\ monocitos} + \Delta Ct_{TGFB2B\ linfocitos})}$$



La pureza de estas dos poblaciones de células mononucleares separadas mediante gradiente de Ficoll y posterior adherencia al plástico, se determinó por citometría de flujo. La misma varió entre 52 % y 87 % para linfocitos y entre 36 % y 89 % para monocitos (Tabla 2.3).

Nº y sexo voluntario	Pureza Linfocitos (%)	Pureza Monocitos (%)
03/F	51.77	58.63
05/F	71.49	87
08/F	73.59	35.84
12/F	74.37	67.48
14/F	83.80	89.35
17/F	86.88	81.77
06/M	78.96	43.31
09/M	73.19	82.24

Tabla 2.3. Pureza de monocitos y linfocitos, aislados a partir de sangre periférica de voluntarios con AR cohorte 1, determinada por citometría de flujo. Los números de los voluntarios corresponden a los que les fueron asignaron en el estudio. F: femenino; M: masculino.

Fue en base a estos resultados tan variables de pureza y a la necesidad de buscar simpleza a la hora de brindar un potencial biomarcador, que se planteó simplificar la purificación y nuevamente desafiar los resultados frente al índice DAS28-ESD. Para lo mismo se analizó una cohorte de 9 pacientes (tabla 2.4) sin realizar el procedimiento de separación de PBMCs por adherencia al plástico, utilizándose la fracción de células mononucleares obtenidas del gradiente de ficoll para el aislamiento del ARNm y la consiguiente generación de su ADNc y la medida de las abundancias mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

De esta manera, se simplificó la ecuación de nuestro potencial biomarcador de actividad:

$$Biomarcador_{actividad} = \frac{\Delta Ct_{TGFB2Se\ PBMCs}}{\Delta Ct_{TGFB2A\ PBMCs} + \Delta Ct_{TGFB2B\ PBMCs}}$$

Características	RA Cohorte 4 (n=9)
Demográficos	
Edad (Años)	50,2 (27-69)
Género (F/M)	8/1
Duración de la enfermedad (Años)	6 (1-29)
Determinaciones clínicas	
Número de articulaciones doloridas (0-28)	5,88 [0-18]
Número de articulaciones tumefactas (0-28)	3,11 [0-10]
DAS28-ESD	3,55 [2,77-6,27]
Determinaciones bioquímicas	
ESD (mm/hr)	26.8 [10-51]
Tratamiento con drogas	
NSAIDs	2/9
DMARDs	0/9

Tabla 2.4. Datos y determinaciones clínicas y bioquímicas de los voluntarios de la cohorte 4. Los valores corresponden a medias y, entre paréntesis, mínimos y máximos. F: femenino; M: masculino; ESD: eritrosedimentación; NSAID: por sus siglas en inglés, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; DMARD: por sus siglas en inglés, Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs.

Luego de la simplificación del método, el biomarcador de actividad correlacionó positivamente con el DAS28-ESD (figura 2.8), siendo la misma estadísticamente significativa. Esto demuestra que el biomarcador continúa comportándose como tal, añadiéndole el beneficio de un método de obtención de células a analizar mucho más simple. A su vez, este análisis demanda la evaluación de un mayor número de muestras, debido al incremento en la variabilidad de la correlación planteada, atribuible a la ausencia de un procedimiento de activación de las células mononucleares como lo es el pasaje por plástico (utilizado en la primera cohorte).

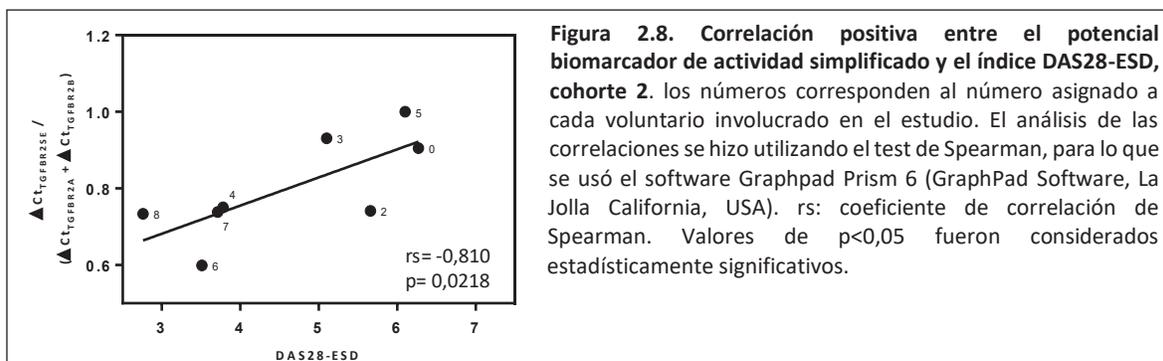


Figura 2.8. Correlación positiva entre el potencial biomarcador de actividad simplificado y el índice DAS28-ESD, cohorte 2. los números corresponden al número asignado a cada voluntario involucrado en el estudio. El análisis de las correlaciones se hizo utilizando el test de Spearman, para lo que se usó el software Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). rs: coeficiente de correlación de Spearman. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

3. Evaluación del porcentaje de neutrófilos TGFBR2-SE positivos como biomarcador de actividad de artritis reumatoidea

Con el fin de profundizar los resultados iniciales obtenidos en el laboratorio, en los que se observó que los niveles de ARNm de TGFBR2-SE en neutrófilos correlacionaron con el grado de actividad de AR medido por DAS28-ESD (Carrea, A. Tesis doctoral 2015), se decidió evaluar si los niveles de la proteína TGFBR2-SE intracitoplasmática en neutrófilos de pacientes con AR también correlacionan con el grado de actividad de la enfermedad.

Los criterios para la inclusión de los pacientes en este estudio fueron que los voluntarios estén dispuestos a otorgar consentimiento informado previo, que sean mayores de 18 años y que reúnan los criterios ARA 1987 (Arnett, F. C. *et al.*, 1987). Los criterios de exclusión fueron enfermedades y

medicación concomitantes que pudieran generar sesgo en la interpretación de los resultados, tales como uso de drogas biológicas.

Se obtuvo información sobre: edad, sexo, tiempo de evolución de la enfermedad, enfermedades concomitantes, medicaciones para la AR y medicaciones concomitantes. A los voluntarios se les determinó el número de articulaciones doloridas, número de articulaciones inflamadas, lesiones radiológicas, densidad mineral ósea de columna lumbar y cuello de fémur concomitantes y se les realizó la medida de la velocidad de eritrosedimentación (ESD). Además de obtuvieron datos de DAS28-ESD. Los datos y determinaciones clínicas y bioquímicas de los voluntarios se resumen en la tabla 2.5.

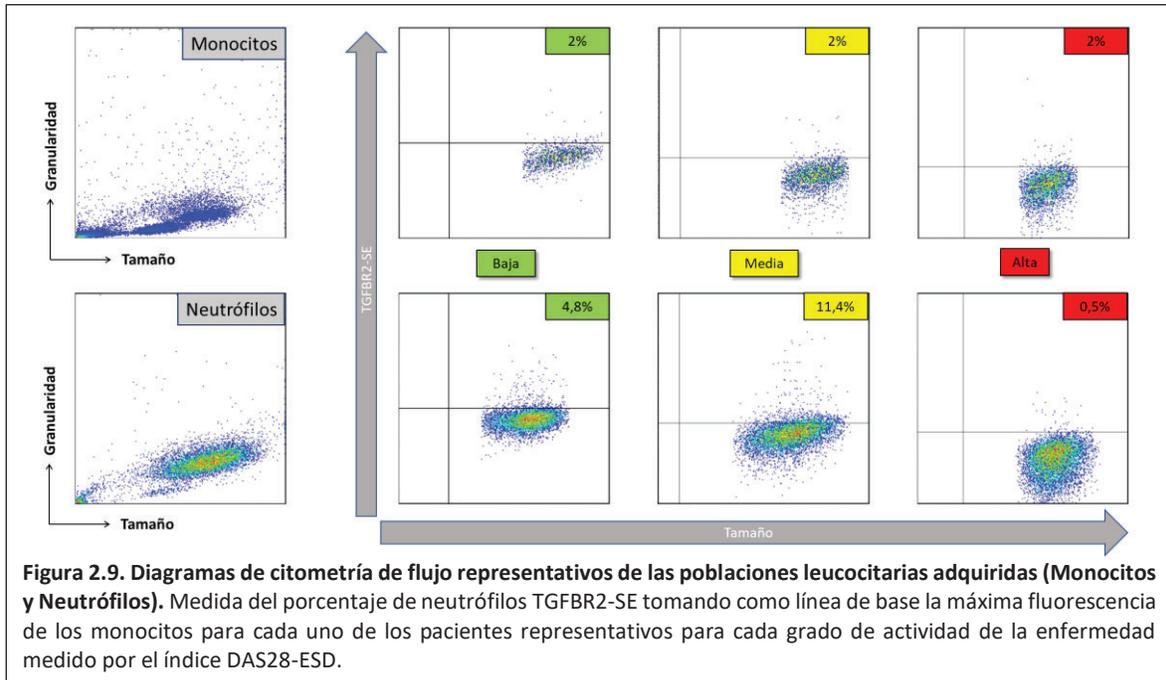
Características	RA (n=19)
Demográficos	
Edad (Años)	55,1 (22-80)
Género (F/M)	15/4
Duración de la enfermedad (Años)	6,55 (1,5-27)
Determinaciones clínicas	
Número de articulaciones doloridas (0-28)	6,26 [0-19]
Número de articulaciones tumefactas (0-28)	5,1 [0-13]
DAS28-ESD	4 [2,76-6,95]
Determinaciones bioquímicas	
ESD (mm/hr)	42.6 [12-70]
Tratamiento con drogas	
NSAIDs	14/19
DMARDs	16/19

Tabla 2.5. Datos y determinaciones clínicas y bioquímicas de los voluntarios. Los valores corresponden a medias y, entre paréntesis, mínimos y máximos. VS: voluntarios sanos; F: femenino; M: masculino; ESD: eritrosedimentación; NSAID: por sus siglas en inglés, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; DMARD: por sus siglas en inglés, Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs; ND: no determinado.

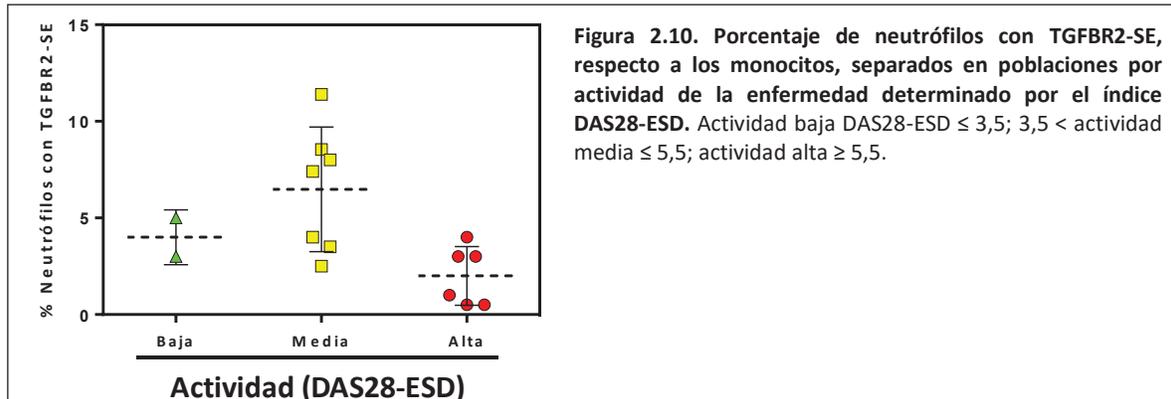
Se extrajo sangre periférica por flebotomía de 19 pacientes con AR (ACR/EULAR 2010) con distintos grados de actividad de la enfermedad determinados por el índice DAS28-ESD con tres parámetros. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Instituto Médico CER y luego de la firma de consentimiento informado.

Con el propósito de evaluar la posibilidad de desarrollar un método que contribuya con parámetros objetivos a la medida de actividad de AR, se calculó el porcentaje de neutrófilos TGFBR2-SE positivos. Para lo cual neutrófilos y células mononucleares (monocitos y linfocitos) fueron purificados mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque™. Para determinar el porcentaje de células expresando la proteína TGFBR2-SE, 1×10^6 neutrófilos o células mononucleares fueron fijadas y permeabilizadas utilizando el kit Cytofix/ Cytoperm (BD, NJ, USA) e incubadas con el anticuerpo monoclonal anti-TGFBR2-SE conjugado con el fluorocromo ATTO647N. El porcentaje de neutrófilos expresando la proteína TGFBR2-SE fue cuantificado mediante inmunofluorescencia por citometría de flujo en un analizador celular FACSCalibur, tomando como valor de referencia basal la máxima fluorescencia obtenida en la población de células mononucleares de cada paciente.

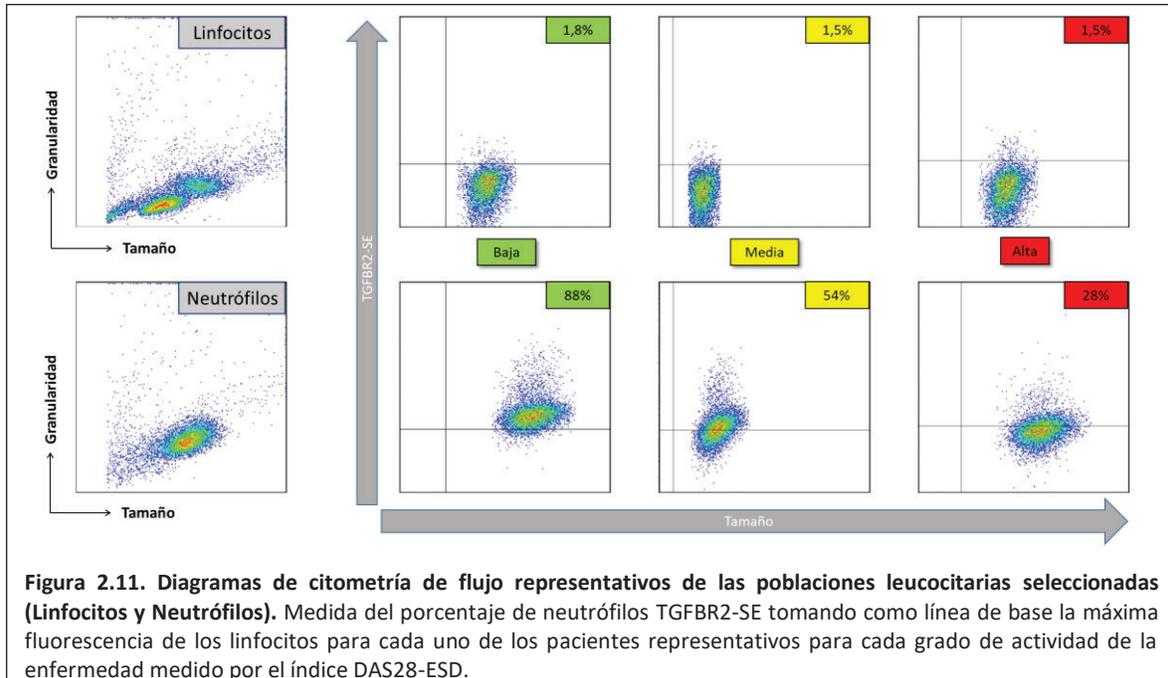
En la figura 2.9 se muestran *dotplots* de citometrías de flujo representativos de pacientes con baja, media y alta actividad del análisis llevado a cabo tomando como valor de referencia basal la máxima fluorescencia obtenida en la población monocítica de cada paciente.



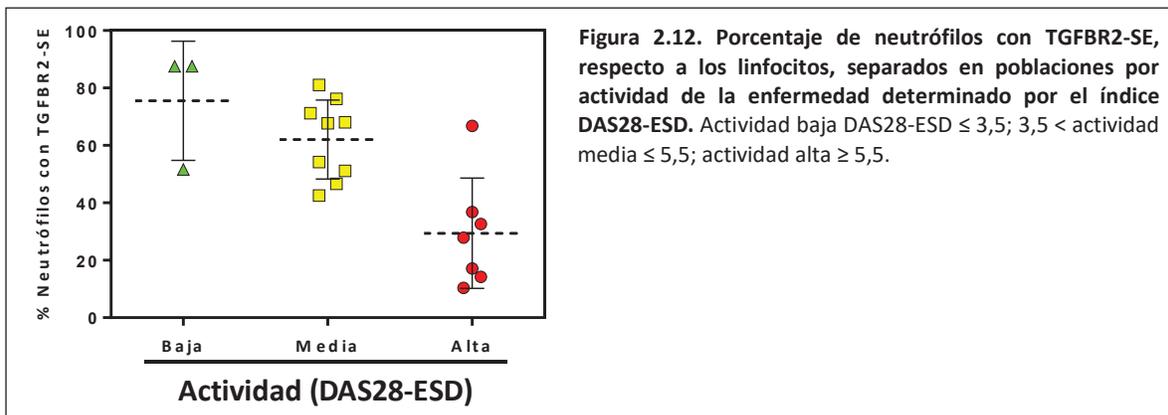
A partir de esta metodología, no se observó relación alguna entre los porcentajes de neutrófilos TGFBR2-SE positivos de pacientes con AR y los tres grupos en que se clasifica la enfermedad según DAS28-ESD (figura 2.10).



A continuación, se procedió al análisis tomando como valor de referencia basal la máxima fluorescencia obtenida en la población linfocitaria de cada paciente. En la figura 2.11 se muestran *dotplots* de citometrías de flujo representativas de pacientes con baja, media y alta actividad.



Se observó que los porcentajes de neutrófilos TGFBR2-SE positivos de pacientes con AR se distribuían, con gran similitud, en los tres grupos en que se clasifica la enfermedad según DAS28-ESD (figura 2.12). Siendo el grupo con actividad baja el que presenta mayor porcentaje de neutrófilos TGFBR2-SE positivos y este porcentaje disminuye conforme aumenta la actividad de la enfermedad.



A partir de esta relación, se decidió analizar la potencial correlación entre el porcentaje de neutrófilos TGFBR2-SE y parámetros clínicos y bioquímicos de la enfermedad para cada uno de los voluntarios. De este modo, se pudo observar que en pacientes con AR los porcentajes de neutrófilos TGFBR2-SE positivos se correlacionan positivamente, y de manera significativa, con el número de

articulaciones doloridas y con el número de articulaciones tumefactas, no así con la ESD (figura 2.13). Siendo la primera la correlación más fuerte y más significativa estadísticamente.

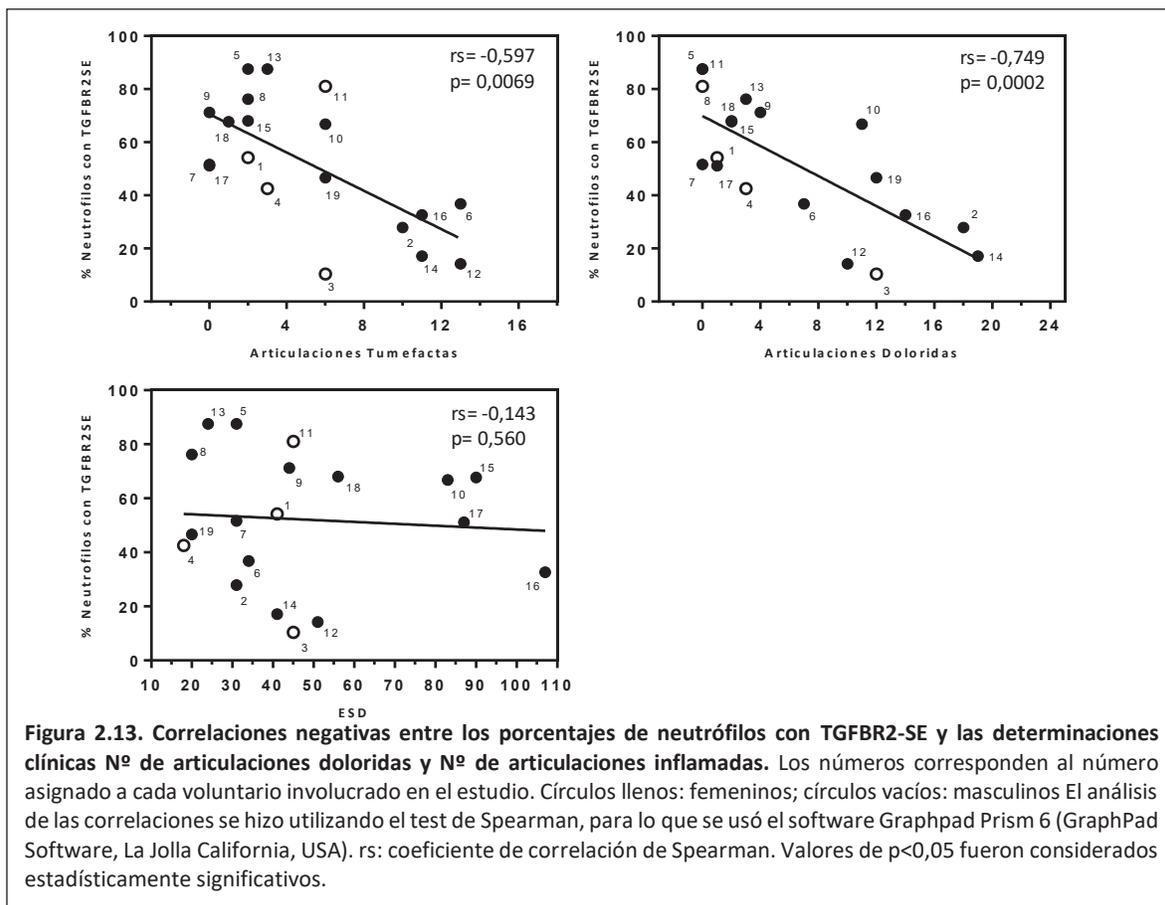


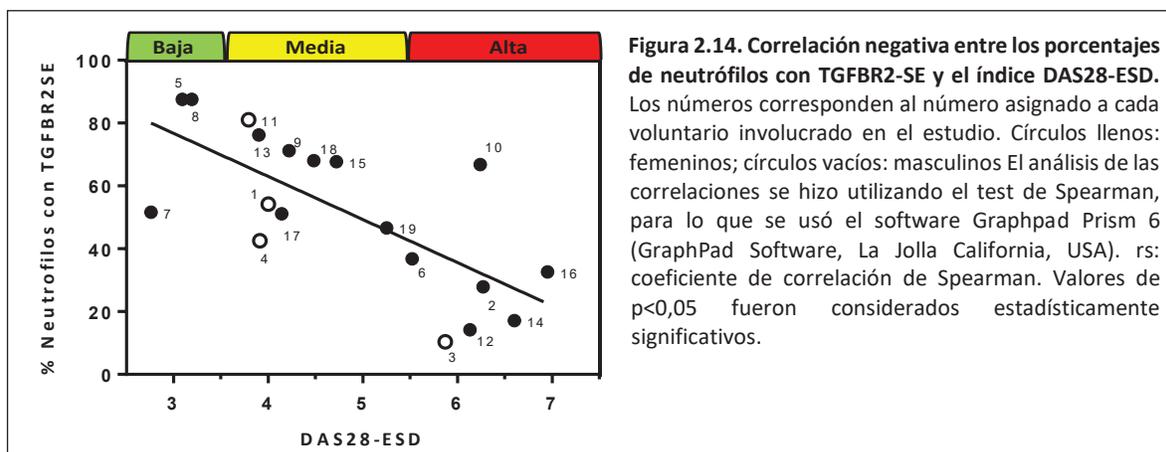
Figura 2.13. Correlaciones negativas entre los porcentajes de neutrófilos con TGFBR2-SE y las determinaciones clínicas Nº de articulaciones doloridas y Nº de articulaciones inflamadas. Los números corresponden al número asignado a cada voluntario involucrado en el estudio. Círculos llenos: femeninos; círculos vacíos: masculinos El análisis de las correlaciones se hizo utilizando el test de Spearman, para lo que se usó el software Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). rs: coeficiente de correlación de Spearman. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Basados en estas correlaciones, se desafió nuestro potencial biomarcador de actividad (porcentaje de neutrófilos TGFBR2-SE positivos) respecto al índice DAS28-ESD de cada paciente (tabla 2.6).

Actividad AR	Valor DAS28-ESD	Nº Paciente
Baja	≤3,5	5 (3,19)
		7 (2,76)
		8 (3,09)
Media	<3,5 y <5,5	1 (4)
		4 (3,91)
		9 (4,22)
		11 (3,79)
		13 (3,9)
		15 (4,72)
		17 (4,14)
18 (4,48)		
Alta	<5,5	19 (5,25)
		2 (6,27)
		3 (5,87)
		6 (5,52)
		10 (6,24)
		12 (6,13)
		14 (6,6)
16 (6,95)		

Tabla 2.6. Criterios de clasificación de la actividad de la AR según DAS28-ESD. Se incluyen los pacientes involucrados en el estudio en la categoría correspondiente de la AR según su valor de DAS28-ESD.

Este análisis arrojó una correlación negativa fuerte y altamente significativa estadísticamente, soportada en las correlaciones obtenidas anteriormente entre los porcentajes de neutrófilos TGFBR2-SE y el número de articulaciones doloridas e inflamadas, ya que estas dos determinaciones clínicas están contenidas en la definición de DAS28-ESD, siendo ambas las de mayor peso dentro del índice. Esta correlación pondría de manifiesto una potencial relación entre los porcentajes de neutrófilos TGFBR2-SE y la actividad de los pacientes, observándose una menor proporción de esta población a grados altos de actividad de la AR (figura 2.14).



Como consecuencia de la complejidad de la patogénesis de la AR y de la heterogeneidad en las manifestaciones y severidad de la enfermedad, existe una gran variabilidad en la respuesta que los pacientes tienen frente a los tratamientos. El biomarcador ideal de la respuesta al tratamiento debería presentar gran disponibilidad, ser fácilmente evaluado, preciso, reproducible y económico. La evaluación de la asociación entre la expresión de genes y la actividad de la enfermedad podría ser útil para el monitoreo de la actividad de la enfermedad y para determinar la efectividad de tratamientos, por ejemplo, con metotrexato (MTX) (Halilova, K. I. *et al.*, 2012), la droga más utilizada cuando se habla de tratamiento de la AR. En un estudio realizado por Constantin y colaboradores, se observó un aumento significativo en la expresión génica de IL-4 e IL-10 en PBMC de pacientes con AR, comparada con la de controles sanos, luego de la exposición *in vitro* a MTX, mientras que la expresión génica de IL-2 y IFN- γ disminuyó significativamente (Constantin, A. *et al.*, 1998). Otro trabajo mostró un aumento en la liberación de IL-1 β por PBMC de pacientes con AR que habían presentado una buena respuesta a MTX (Seitz, M. *et al.*, 2003). También ha sido demostrado que la terapia con MTX produce un aumento en la expresión de 11 genes y la disminución en la expresión de otros 26 genes (Galligan, C. L. *et al.*, 2007). Con respecto a las terapias biológicas contra la AR, existe una característica sistemática común a todas ellas que es la presencia de un grupo considerable de pacientes que no muestran una mejoría clínica significativa. Por lo tanto, uno de los principales objetivos en este campo de investigación es la identificación de biomarcadores que puedan servir de guía en la elección de la terapia más adecuada para cada paciente. Esto no sólo beneficiaría al paciente, sino que también reduciría considerablemente la carga socioeconómica de las enfermedades reumáticas (Julià, A. *et al.*, 2009). En este sentido, en un estudio se encontró que el aumento en la expresión del gen ARG1 en células de sangre periférica de pacientes con AR se asocia significativamente con una peor respuesta al tratamiento con Rituximab, un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido contra CD20. También se observó que la sobreexpresión del gen TRAF1 está asociada con una respuesta favorable al tratamiento con Rituximab. Por otro lado, el aumento en la expresión de TLR4 encontrado en células T CD4⁺ de pacientes con buena respuesta a Rituximab podría sugerir un rol de la activación directa de células T CD4⁺ en la AR (Julià, A. *et al.*, 2009). Otro estudio realizado en pacientes con AR tratados con el mismo agente biológico mostró efectos únicos en los perfiles globales de expresión génica en el tejido sinovial de estos pacientes. Los genes regulados negativamente por la terapia con Rituximab fueron genes de inmunoglobulinas y genes involucrados en quimiotaxis y activación de leucocitos, mientras que los genes regulados positivamente por esta terapia incluyen transcritos relacionados con el desarrollo celular, con la señalización de TGF- β y con la cicatrización de heridas. Estas observaciones fueron confirmadas, a nivel de ARNm y proteína, mediante ensayos de RT-qPCR e inmunohistoquímica (Gutierrez-Roelens, I. *et al.*, 2011). En otro trabajo más reciente se evaluaron indicadores genéticos de respuesta a los modificadores biológicos de TNF- α . En el estudio, que incluyó 2706 pacientes con AR tratados con una de tres drogas anti-TNF (Etanercept, Infliximab o Adalimumab), el resultado más significativo se restringió a los pacientes tratados con Etanercept. Los resultados sugieren que la expresión de CD84, un gen relativo a la inmunidad, podría ser biomarcador de la respuesta al tratamiento con Etanercept en individuos de ascendencia europea. Los datos predicen que la expresión de CD84 estaría asociada positivamente con la respuesta al tratamiento, es decir, una mayor expresión de CD84 se asocia con una mejor respuesta al tratamiento con Etanercept (Cui, J. *et al.*, 2013). Estos estudios sentarían las bases para el desarrollo de paneles de expresión de genes que podrían ser usados por los médicos clínicos en un futuro no tan lejano (Halilova, K. I. *et al.*, 2012).

En esta tesis, se amplió y documentó que, la evaluación mediante RT-qPCR de los niveles de ARNm de dos de las variantes de *splicing* del TGFBR2 (TGFBR2A y TGFBR2B) en monocitos se correlaciona fuertemente con la actividad de la enfermedad de la AR medida por medio del índice DAS28-ESD. Este descubrimiento aporta nueva información, ampliando el conocimiento preexistente sobre la relación entre la cascada de señalización de TGF- β y el linaje de monocitos / macrófagos en la AR. Así como también se describió por primera vez un potencial biomarcador de actividad que involucra los niveles de ARNm de las tres variantes de *splicing* del receptor II de TGF- β (TGFBR2A, TGFBR2B y TGFBR2-SE) en células mononucleares.

El TGF- β es un potente factor quimiotáctico para los leucocitos, que promueve la adhesión de monocitos y, posiblemente, produce una infiltración inflamatoria excesiva en sitios de inflamación crónica con el potencial de daño tisular mediado por los mismos (Wahl, S. M. *et al.*, 1993). En la AR, el TGF- β 1 está regulado positivamente en la mayoría de los componentes celulares del sinovio, incluidos los macrófagos intersticiales, las células endoteliales y las células de la membrana sinovial. Además, los niveles séricos de TGF- β 1 elevados en la AR se correlacionan con mayor daño articular, los cuales reflejarían el desarrollo de la inflamación autoinmune (Mieliauskaite, D. *et al.*, 2009).

La información que vincula el aumento de los niveles de receptor de tipo 2 de TGF- β y RA es escasa en la literatura. Pocos estudios han demostrado una relación entre la abundancia de ARNm de AR y TGFBR2. En un estudio en humanos, se encontró que los niveles de ARNm de TGFBR2 estaban aumentados en fibroblastos de membrana sinovial de pacientes con AR (Bira, Y. *et al.*, 2005). De manera similar, estudios de tejidos de biopsia de membrana sinovial de pacientes con AR, por hibridación *in situ*, revelaron señales marcadamente aumentadas para el ARNm de TGFBR2 en tejidos con un proceso inflamatorio activo, en comparación con tejidos con una inflamación menos activa (Taketazu, F. *et al.*, 1994). En la misma línea de evidencia, aquí informamos que los niveles de ARNm de TGFBR2 en monocitos y PBMCs de sangre periférica también pueden reflejar la actividad inflamatoria de la AR.

Los macrófagos sinoviales, principalmente derivados de monocitos circulantes, desempeñan un papel destacado en la AR (Kennedy, A. *et al.*, 2011). Se ha documentado que el daño radiológico y el dolor articular, junto con la inflamación, se correlacionan con un mayor número de macrófagos en la membrana sinovial inflamada y en el *pannus* del tejido vascular inflamatorio que en las articulaciones normales (Mulherin, D. *et al.*, 1996; Tak, P. P. *et al.*, 1997). Por lo tanto, el número de macrófagos en la membrana sinovial se puede usar como biomarcador para la gravedad de la enfermedad, así como un factor predictivo de la capacidad de respuesta a la terapia con antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs por sus siglas en inglés, disease-modifying antirheumatic drugs) (Gerlag, D. M. y Tak, P. P., 2008).

Estudios realizados en ratones transgénicos que carecían de señalización de TGFBR2 por parte de los macrófagos, mostraron tener inhibida la polarización de estos últimos a un estado M2 antiinflamatorio, sugiriendo que la modulación de la vía de señalización de TGF- β puede ser un método para regular médicamente la polarización de los macrófagos (Gong, D. *et al.*, 2012). Aunque los macrófagos del tejido sinovial de la RA o del líquido sinovial pueden exhibir fenotipos proinflamatorios y antiinflamatorios, no se han clasificado como macrófagos M1 (alta secreción de citoquinas proinflamatorias) y macrófagos M2 (resolución de la inflamación) (Kennedy, A. *et al.*, 2011). Por lo tanto, se requieren estudios adicionales para evaluar si la polarización de M1 / M2 en

el tejido sinovial podría estar relacionada o no con la mayor abundancia de ARNm de las variantes de *splicing* del TGFBR2 en monocitos circulantes de pacientes con AR con mayor actividad de enfermedades.

Los monocitos se pueden aislar por adherencia al plástico o por selección positiva de células CD14 mediante inmunoseparación magnética. Se sabe que diferentes métodos de aislamiento afectan la producción de citoquinas en células dendríticas derivadas de monocitos (Elkord, E. *et al.*, 2005), aun así, se decidió evaluar mediante un método que produce un alto rendimiento de células puras, como lo es la inmunoseparación magnética, con el fin de mejorar los rendimientos obtenidos previamente para la cohorte 1, en una nueva cohorte (cohorte 2). Mas allá de buscar simpleza a la hora de estudiar biomarcadores, en búsqueda de que un futuro *test* pueda realizarse en hospitales y laboratorios bioquímicos, en este apartado de la tesis buscamos dar mayor especificidad a los resultados presentados por Carrea (Carrea, A., Tesis doctoral 2015). Considerando que, la inmunoseparación magnética podría tener un impacto en las determinaciones de RT-qPCR. Aquí, informamos que la correlación entre el ARNm de las variantes de *splicing* TGFBR2 y DAS28-ESD sigue siendo similar, independientemente del método utilizado para aislar monocitos. Cabe destacar que en la cohorte 1, varios pacientes presentaron niveles menores al 50% de pureza de monocitos, lo que, sumado a los resultados para la cohorte 2 y en búsqueda de un test simple, invitaría a analizar si los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* TGFBR2A y TGFBR2B continúan mostrando una correlación respecto del DAS28-ESD en ausencia de separación de las PBMC, o si el pasaje por plástico o inmunoseparación magnética genera la activación de las mismas y ésta es necesaria para el reflejo de la actividad en estos niveles.

Por otro lado, del reanálisis de los niveles de mensajeros de las tres variantes de *splicing* del receptor II de TGF- β obtenidos para los pacientes de la cohorte 1, se desprendió el biomarcador de actividad descrito en esta tesis y dio origen a la patente PCT WO2018:087416A2 "Method for determining the activity of autoimmunity disease and kit". Basados principalmente en el bajo porcentaje de purificación obtenido para varios de los pacientes, siendo este menor al 50% y en búsqueda de simplificar considerablemente la metodología, es que se propuso el estudio de una nueva cohorte (cohorte 3) evitando la separación por plástico, con el desarrollo de un kit como horizonte. Del análisis de la cohorte 3 se pudo confirmar la tendencia observada para la primera cohorte, detectándose una mayor variabilidad. Esta puede ser explicada por la ausencia de pasaje por cultivo de las células mononucleares y la consecuente adherencia al plástico por parte de los monocitos, acciones que activan la expresión de ciertos genes (Elkord, E. *et al.*, 2005). En esta tesis se observa el resultado obtenido para 10 pacientes, pero se encuentra planeado el análisis de 30 pacientes más con el fin de confirmar este potencial biomarcador.

Los índices actuales de actividad de la enfermedad de la AR son comúnmente una combinación de mediciones de laboratorio, evaluación médica de los síntomas y mediciones informadas por el paciente. Tanto los informes del médico como del paciente son componentes críticos de la evaluación y el manejo del paciente, pero pueden confundirse con una enfermedad comórbida y un daño articular fijo, como resultado de una enfermedad de larga duración, además de la variabilidad intra e inter-observador (Marhadour, T. *et al.*, 2010; Uhlig, T. *et al.*, 2009; Ranzolin, A. *et al.*, 2009).

Por lo tanto, varios laboratorios de todo el mundo están haciendo esfuerzos para encontrar biomarcadores de inflamación objetivos para evaluar la actividad de la enfermedad de la AR. En este sentido, en 2013 Centola y sus colaboradores desarrollaron un análisis de sangre de la actividad de la enfermedad de biomarcadores que combina las concentraciones séricas de 12 biomarcadores (Centola, M. *et al.*, 2013). En este contexto, nuestro trabajo proporciona evidencia inicial de la implicación de los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* del receptor 2 de TGF- β (TGFBR2) en los leucocitos de la AR, este enfoque podría ser útil como biomarcador de la actividad de la enfermedad y sugiere analizar en profundidad y un mayor número de pacientes en estudios posteriores. A su vez, sería interesante la realización de estudios longitudinales, donde podrían evaluarse aquellos pacientes donde sus niveles de ARNm de TGFBR2A, TGFBR2B y TGFBR2-SE no se ajustan a la correlación encontrada, de manera de estudiar nuestro potencial biomarcador como biomarcador de pronóstico. También podría pensarse en estudios longitudinales pre y post tratamiento con biológicos, radicados en la necesidad de biomarcadores de pronóstico y respuesta a los mismos, considerando como criterio de exclusión aquellas drogas que se encuentren reportadas como modificadores de la cascada de TGF- β .

Uno de los apartados de la presente tesis se aboca al estudio a nivel de proteína del receptor soluble de TGF- β (TGFBR2-SE), basados en resultados previos obtenidos para niveles de expresión de ARNm en neutrófilos y su correlación con la actividad de la enfermedad (Carrea A, Tesis doctoral. 2013). La presencia de receptores solubles en fluidos biológicos podría ser parte de un mecanismo general regulatorio de la actividad de mediadores solubles *in vivo*. Probablemente, condiciones que afecten al sistema inmune y conduzcan a la activación, proliferación o muerte de células que secretan receptores solubles, alteren los niveles normales de estas proteínas. Alternativamente, las alteraciones en los niveles de receptores solubles podrían desempeñar, ellas mismas, un rol en la fisiopatología de enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, suero y orina humanos presentan, normalmente, pequeñas concentraciones de sIL-2R. Sin embargo, se han detectado niveles aumentados de sIL-2R en infecciones graves (Siegert, W. *et al.*, 1990), rechazo de trasplante (Mehta R. *et al.*, 2004; Adams, D. H. *et al.*, 1989) y enfermedad aguda de injerto contra huésped (GVHD, de sus siglas en inglés, *Graft vs. Host Disease*) (Siegert, W. *et al.*, 1990). Otro ejemplo de esta expresión diferencial de receptores solubles lo constituyen los receptores solubles 1 y 2 de TNF- α (sTNF-R1 y sTNF-R2), estos son productos extracelulares de escisión enzimática de TNF-R1 y TNF-R2 los cuales se encuentran unidos a membrana. Se sabe que estos receptores extracelulares de TNF- α de origen natural regulan negativamente la actividad de TNF- α , contrarrestando así las respuestas inflamatorias iniciadas por el mismo. Estos han sido encontrados en orina de individuos normales y en suero de pacientes con distintos tipos de cáncer, pero no en suero de individuos sanos. En el caso de la artritis reumatoidea, se ha reportado que, tanto sTNF-R1 como sTNF-R2 están elevados en suero de pacientes con AR, y se sabe que sTNF-R2 se correlaciona con la actividad de la enfermedad en AR (Valle, Y. *et al.*, 2009; Spoettl, T. *et al.*, 2007). Similar es lo hallado para el receptor soluble de IL-6, el cual se encuentra elevado ligeramente en pacientes con AR (Robak, T. *et al.*, 1998). Interesante es lo que ocurre con este receptor, ya que sIL-6R puede clasificarse como una alarma que, cuando es liberada por los neutrófilos, promueve la trans-señalización de IL-6 dentro del medio local como un posible aviso de peligro a la enfermedad, que afecta la respuesta inmunológica innata y adaptativa (Jones, S.A. *et al.*, 2005; Jones, S.A. *et al.*, 2011). Los neutrófilos activados son la fuente más importante de receptor de IL-6 soluble, y su acumulación en altos números dentro de las articulaciones sinoviales podría contribuir significativamente a la señalización de IL-6 en estos sitios

(Wright, H. L. *et al.*, 2014). Estos resultados en conjunto sitúan a los receptores solubles como potenciales biomarcadores de enfermedades inmunes.

Sumado a esto, en la última década se ha demostrado que, los neutrófilos desempeñan un papel clave y complejo en la fisiopatología de las enfermedades inflamatorias, como la AR. Además de impulsar el inicio y la progresión de la enfermedad y contribuir al daño en los tejidos del hospedador, estas células son excelentes informadores de los mecanismos subyacentes de la enfermedad, mostrando cambios dramáticos en la expresión de genes en condiciones de inflamación (Thieblemont, N. *et al.*, 2016; Wright, H. L. *et al.*, 2013; Wright, H. L. *et al.*, 2015).

Con respecto a las terapias biológicas contra la AR, existe una característica sistemática común a todas ellas que es la presencia de un grupo considerable de pacientes que no muestran una mejoría clínica significativa. Por lo tanto, uno de los principales objetivos en este campo de investigación es la identificación de biomarcadores que puedan servir de guía en la elección de la terapia más adecuada para cada paciente. El fenotipo de los neutrófilos en la AR está estrechamente asociado con la respuesta clínica a terapias, como los corticosteroides, el metotrexato y los inhibidores del TNF. Se han observado cambios en la función de los neutrófilos de sangre periférica durante el tratamiento, tales como la anulación de la apoptosis retardada (Weinmann, P. *et al.*, 2007), la disminución de la producción de TNF- α (Wright, H. L. *et al.*, 2011), la disminución de la expresión de la proteinasa 3 de membrana (Matsumoto, T. *et al.*, 2008) y una menor tasa de quimiotaxis en pacientes que responden a la terapia (Dominical, V. M. *et al.*, 2011). En un estudio reciente, en neutrófilos humanos de sangre periférica, se han identificado y validado un total de 23 genes que permitirían identificar pacientes respondedores y no respondedores a terapias con inhibidores de TNF- α (Wright, H. L. *et al.*, 2017). Es por ello y sumado a los resultados previos obtenidos en el laboratorio, que centramos nuestro estudio en los neutrófilos, analizando los porcentajes de neutrófilos TGFBR2-SE positivos. Se reporta aquí por primera vez, una correlación negativa entre los porcentajes de neutrófilos conteniendo TGFBR2-SE y la actividad de la enfermedad de los pacientes, medida por medio del índice DAS28-ESD. Cabe destacar que en ausencia de un control de isotipo se decidió tomar como valor de referencia basal la máxima fluorescencia obtenida en la población linfocitaria de cada paciente. Cabe destacar que no es la primera vez que se relacionan linfocitos y neutrófilos para la generación de un potencial biomarcador de la AR, siendo el $\text{ratio } \text{neutrofilos}_{\text{totales}}/\text{linfocitos}_{\text{totales}}$ un biomarcador que se encuentra en evaluación y ha mostrado correlacionar positivamente con DAS28-ESD en cohortes con un n elevado de pacientes (Uslu, A. U. *et al.*, 2015; Mercan, R. *et al.*, 2016). Nuestros resultados preliminares muestran una correlación negativa, lo que hablaría de una vinculación entre un alto porcentaje de neutrófilos generando TGFBR2-SE y una baja actividad de la enfermedad. Estos resultados sugieren que, TGFBR2-SE podría ser utilizado como blanco para el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos. Así mismo, nuestro descubrimiento brinda evidencias preliminares de que la evaluación de los niveles de TGFBR2-SE en neutrófilos podría representar un método alternativo al DAS28-ESD para la determinación de actividad de los pacientes con AR.

En línea con estos resultados, se demostró que células mesenquimales sobreexpresando TGFBR2-SE, tendrían reprimidos algunos factores relacionados con la actividad de la vía molecular Jak/STAT, interacciones citoquina-receptores de citoquinas, y vías de señalización asociadas a la Enfermedad parasitaria Malaria y la AR (Rodríguez, T. *et al.*, resultados no publicados). A su vez, se ha observado la presencia de TGFBR2-SE en exosomas de líneas celulares A549 y 293T (Bertolio, M. *et al.*,

resultados no publicados). Sumado al potencial terapéutico de las microvesículas de neutrófilos demostrado por Headland y colaboradores en un modelo de ratón de artritis reumatoidea. Donde, el suministro de microvesículas de neutrófilos en la articulación de la rodilla evitó el daño del cartílago a través de la generación de TGF- β (Headland, S. E. *et al.*, 2015). Basados en estos resultados, es que creemos que sería interesante en un futuro evaluar la presencia de TGFBR2-SE en microvesículas y/o exosomas de neutrófilos provenientes de pacientes con AR, de manera de ahondar en el estudio de dicha molécula con la AR.

A su vez, creemos interesante para la validación de nuestros potenciales biomarcadores planteados en esta tesis su desafío con biomarcadores utilizados en la clínica tales como SDAI y CDAI los cuales presentarían mayor eficiencia en zonas de remisión respecto al DAS28-ESD en esa zona (Thiele, K. *et al.*, 2013) y con PROs (resultados reportados por los pacientes de sus siglas en inglés: PROs-*Patient Reported Outcomes*). Estas últimas, son valoraciones directas de los pacientes acerca de distintos aspectos de su enfermedad. En los últimos años se ha incrementado el interés en incluir los PROs en ensayos clínicos y en la práctica cotidiana, con el fin no sólo de identificar el impacto de la enfermedad sobre la vida del paciente, sino también de objetivar la respuesta a los tratamientos instaurados (Orbai, A. *et al.*, 2015). Es por ello que creemos que en futuras cohortes deben incluirse, debido a que a diferencia de los índices tales como DAS28-ESD, CDAI y SDAI, reflejan la calidad de vida de los pacientes y permitirían tener una evaluación más general de la relación de nuestros potenciales biomarcadores y la enfermedad. Es decir, no solo vincularlos a las consecuencias inflamatorias y de dolor de la AR como lo realizado hasta el momento.

Conclusiones y perspectivas

1. Conclusiones

- Los niveles relativos de ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B de monocitos de paciente con AR purificados por inmunoseparación magnética son equivalentes a los obtenidos por adherencia al plástico, y correlacionan con la actividad de la enfermedad.
- El uso de células mononucleares (PBMC) permite simplificar el método anterior, siendo el cociente $\Delta Ct_{TGFBR2-SE} / (\Delta Ct_{TGFBR2A} + \Delta Ct_{TGFBR2B})$ el que correlaciona con la actividad de la enfermedad.
- Los porcentajes de neutrófilos conteniendo la proteína TGFBR2-SE, analizados por citometría de flujo, aumentan conforme aumenta la actividad de la enfermedad, sugiriendo un posible rol como biomarcador de esta proteína.

2. Perspectivas

- Ampliar el número de pacientes evaluados por los biomarcadores de actividad de AR planteados en esta tesis.
- Plantear estudios longitudinales para los biomarcadores propuestos, con fines de analizar sus potenciales como biomarcadores de pronóstico y/o respuesta terapéutica.
- Desarrollar un método de ELISA para detectar TGFBR2-SE en fluidos biológicos.

-Capítulo 2- TGFBR2 y osteoartritis

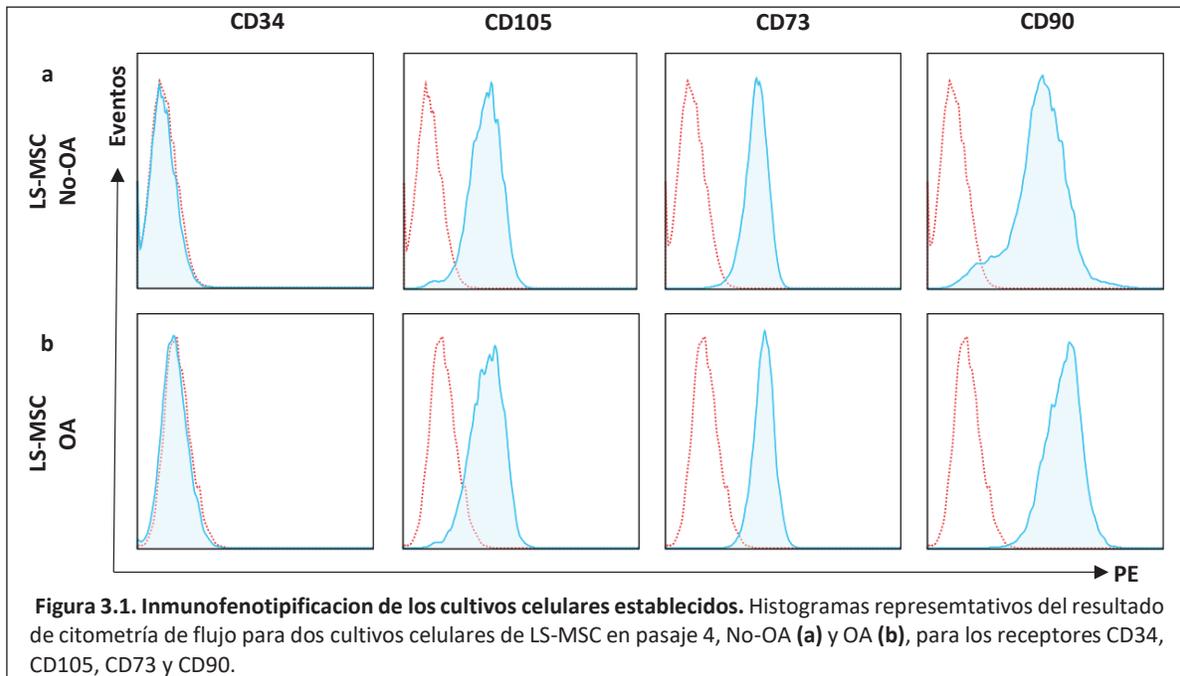
1. Caracterización de MSC provenientes de líquido sinovial (OA) y lavado articular de artroscopias post traumáticas (No-OA) de humanos.

Uno de los objetivos de este trabajo, fue ampliar el conocimiento existente acerca de la biología de las células mesenquimales de líquido sinovial (LS-MSC), haciendo foco en el potencial valor que ellas tienen en medicina regenerativa, en especial, en el efecto de componentes de la cascada de TGF- β sobre el potencial de diferenciación osteogénico y condrogénico de esas células. Con tal fin, se aislaron LS-MSC de muestras de líquido sinovial de pacientes con artrosis y de lavado articular de individuos No-OA. Dichas muestras se obtuvieron siguiendo criterios de inclusión previamente establecidos en la Clínica Privada Chascomús a cargo del Dr. Sebastián Orłowski. El protocolo de extracción fue aprobado por el Comité de Ética local y por el Ministerio de Salud de la provincia de Buenos Aires. Los pacientes acordaron donar el líquido sinovial o el lavado articular mediante la firma de un consentimiento informado, de manera voluntaria previo a la obtención de la muestra. A cada voluntario se lo clasificó según el índice de Outerbridge mediante artroscopía (Outerbridge, R. E., 1961). Se aislaron un total de 5 cultivos de LS-MSC No-OA y 5 cultivos OA (tabla 3.1).

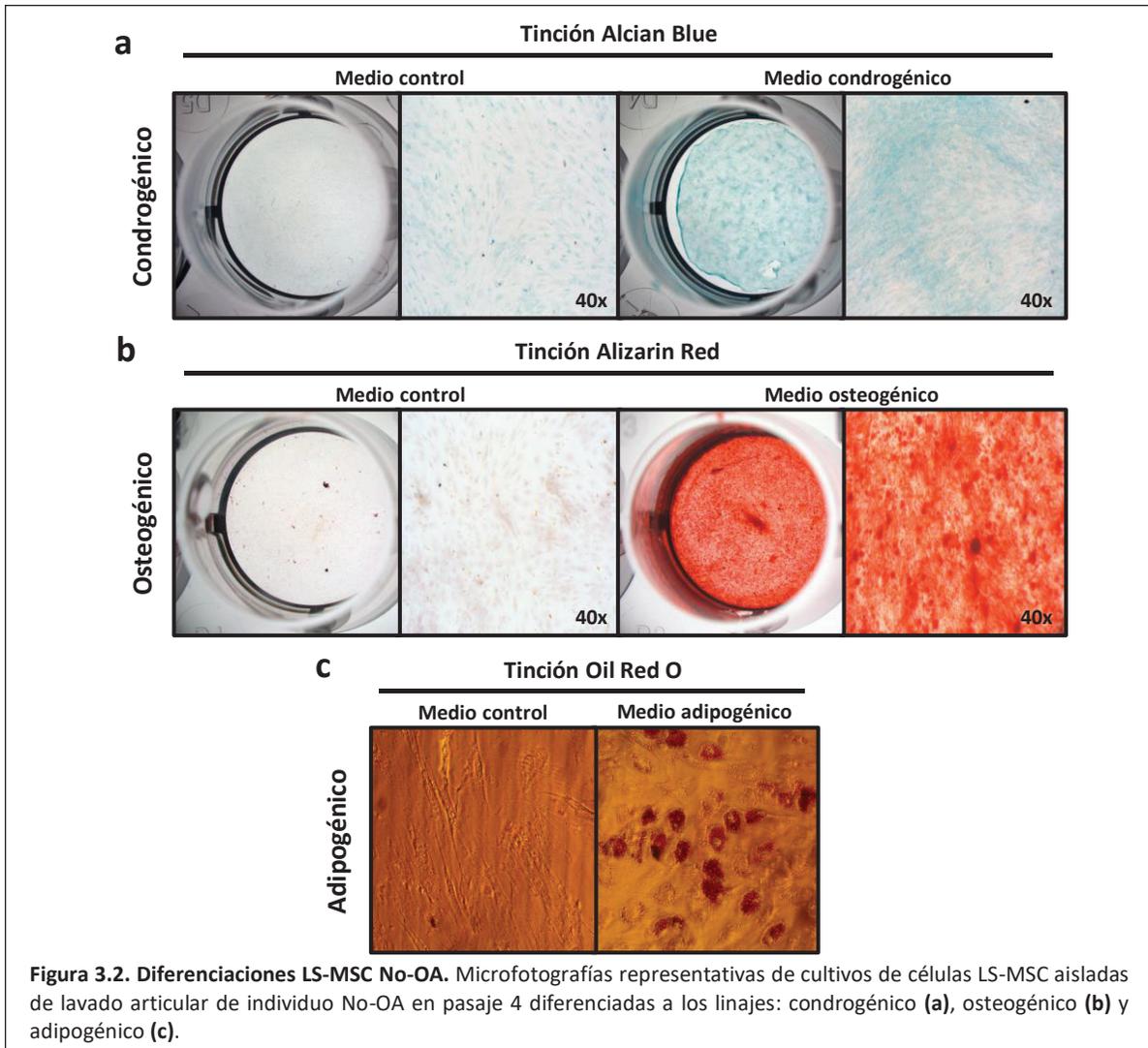
Nº y sexo voluntarios	Edad (años)	Índice de Outerbridge
No-OA 01/M	37	0
No-OA 02/F	27	0
No-OA 03/M	33	0
No-OA 04/M	33	0
No-OA 05/F	23	0
OA 01/F	66	3
OA 02/F	48	3
OA 03/F	47	3
OA 04/M	45	3
OA 05/F	41	3

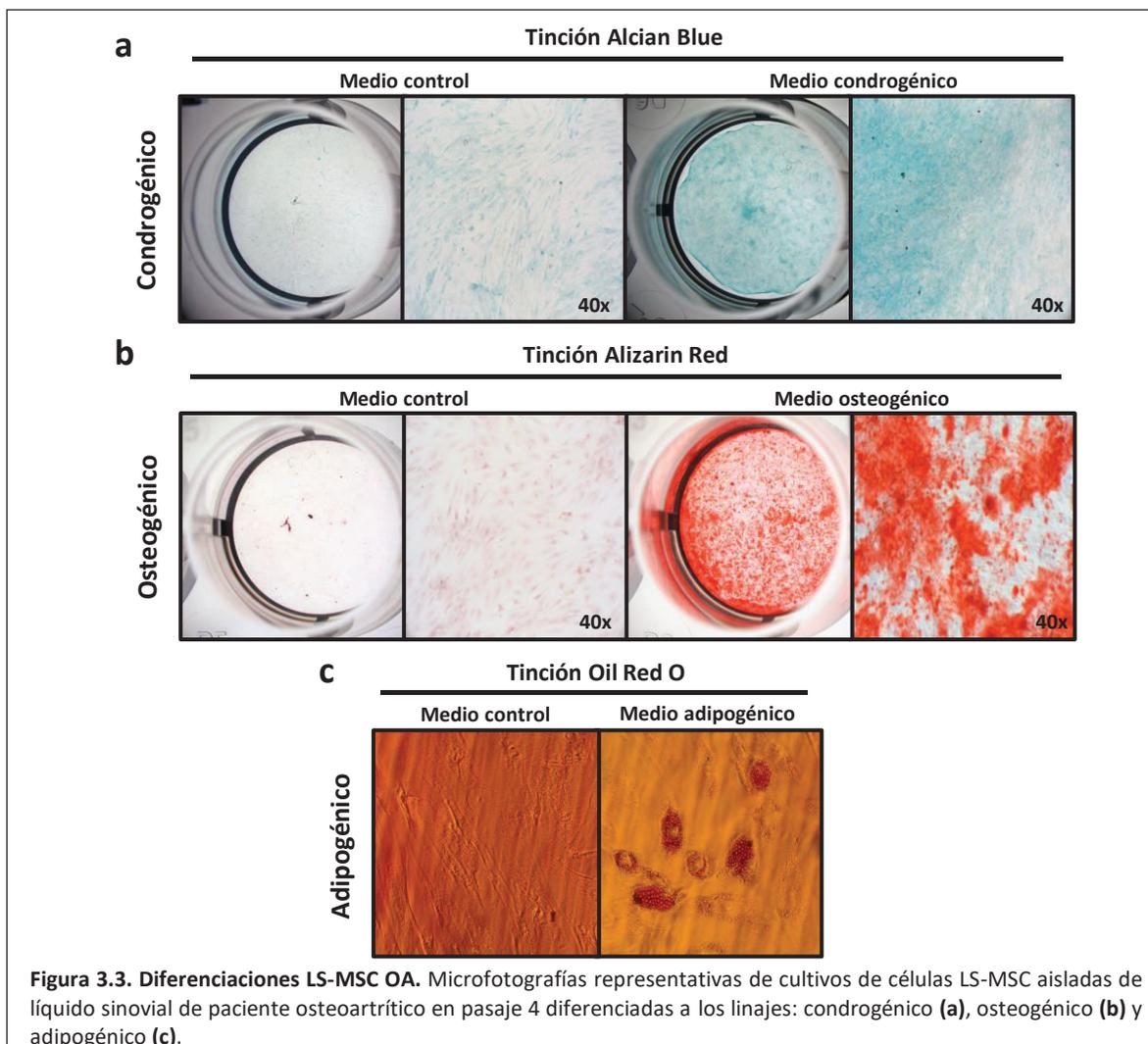
Tabla 3.1. Datos y determinaciones clínicas de los individuos incluidos en el estudio. Los números fueron asignados a los voluntarios por orden de ingreso al estudio. F: femenino; M: masculino.

Se ha propuesto que las MSC cumplen con tres características fundamentales: 1) adherencia a plástico, 2) fenotipo característico de marcadores de superficie tales como CD105, CD73 y CD90, y pérdida de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, entre otros, y 3) capacidad de diferenciarse a los linajes: osteogénico, adipogénicos y condrogénico *in vitro* (Dominici, *et al.*, 2006). Es por esto que, en primera instancia, se estudió el fenotipo de los cultivos establecidos mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos anti-CD34, anti-CD105, anti-CD73 y anti-CD90. El total de las células cultivadas resultaron negativas para CD34 y positivas para CD73, CD90 y CD105; como era de esperarse para células de linaje mesenquimal (figura 3.1).



Las MSC son células multipotentes, por lo tanto, las LS-MSC retienen la capacidad de diferenciarse en tipos celulares de varios linajes diferentes. La diferenciación de estas células puede ser dirigida por el agregado de *cocktails* específicos de inductores químicos o citoquinas. Continuando con la caracterización, se comprobó la multipotencialidad de LS-MSC en pasaje 4 (P4) mediante la diferenciación *in vitro* a los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico, siguiendo protocolos ya descritos en la bibliografía (Zuk P. A. *et al.*, 2001 y 2002; Mara, C. S. *et al.*, 2011). El grado de diferenciación fue determinado mediante tinciones con Alcian blue, para detectar presencia de colágeno en el caso de la diferenciación condrogénica; con Alizarin red para detectar presencia de depósitos de calcio, en el caso de la diferenciación osteogénica; y con Oil Red O la presencia de vesículas lipídicas, en el caso de la diferenciación adipogénica. Estos análisis se realizaron tanto para cultivos provenientes de individuos No-OA (lavado articular previa artroscopia postraumática, figura 3.2) como para OA (aisladas de líquido sinovial, figura 3.3).



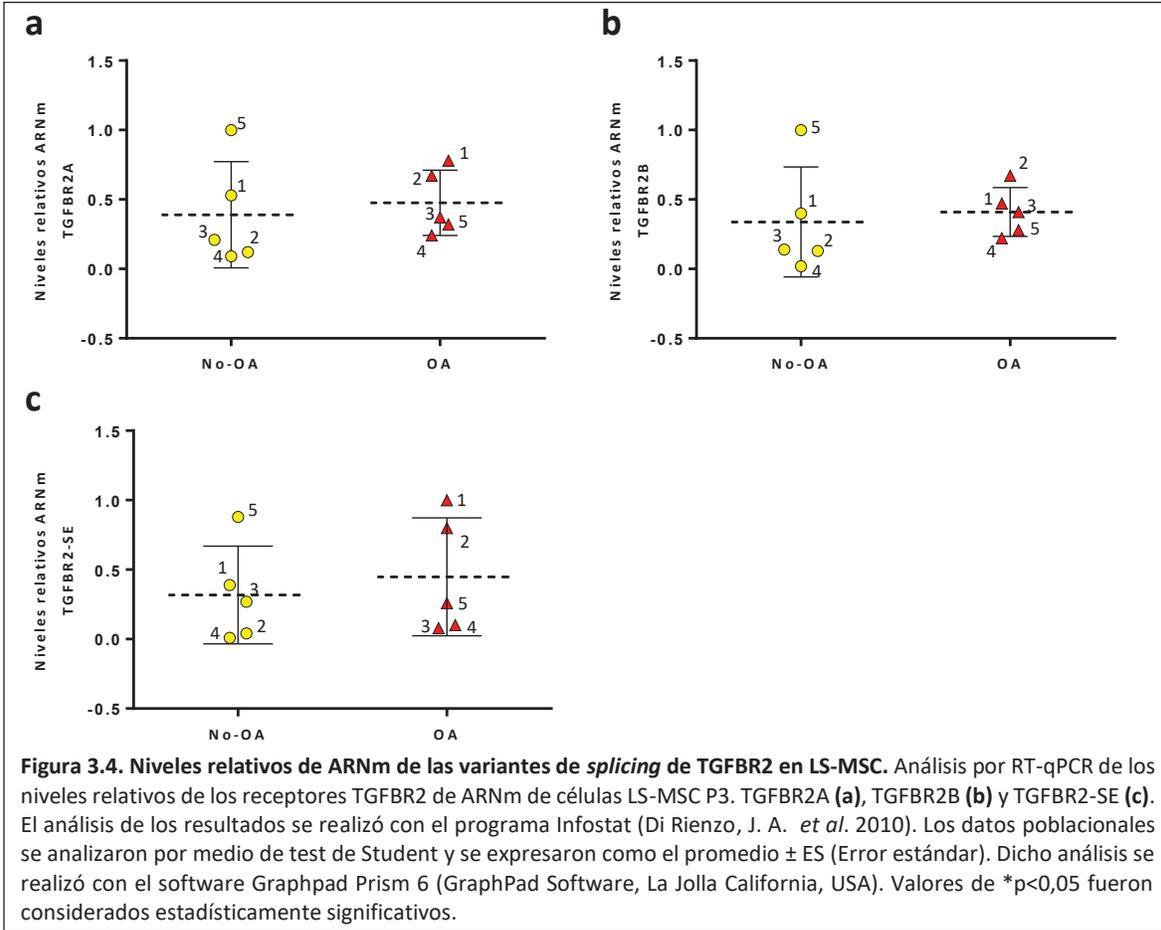


2. Evaluación de los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* del TGFBR2 en LS-MSC.

Con el objetivo de obtener indicios sobre la posible implicancia de cada una de las variantes de *splicing* de TGFBR2 en la patología osteoarthrítica, en este capítulo se evaluaron los perfiles de ARNm de estas variantes y su potencial relación con la OA.

Se estudiaron los niveles de ARNm de las 3 variantes de *splicing* de TGFBR2 en 5 cultivos celulares provenientes de líquido sinovial de pacientes con OA y 5 cultivos establecidas de aislamientos de lavado articular de individuos sanos (no artrosis, No-OA). Para ello, LS-MSC (Pasaje 3) fueron cultivadas durante 72 hs, luego de lo cual se purificó el ARN total de las mismas, y se cuantificaron los niveles de las variantes de *splicing* mediante RT-qPCR, con *primers* específicos. De la medida de los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* de TGFBR2, se observó que TGFBR2A es la variante mayoritaria, seguida por TGFBR2B y siendo TGFBR2-SE la minoritaria independientemente del origen de la LS-MSC analizada. El análisis poblacional mostró que en pacientes con OA se encontraron niveles de ARNm de TGFBR2A, TGFBR2B y TGFBR2-SE elevados comparados con las muestras de individuos NO-OA, aunque estadísticamente no significativos. Pudiéndose observar

una mayor dispersión en la población No-OA. Siendo el individuo 5 de esta población el que presento los niveles más altos de ARNm para las tres variantes, así como el paciente 4 mostro tener los niveles más bajos para las mismas. Por otra parte, en las células de voluntarios OA, salvo para el receptor TGFBR2-SE, los niveles de ARNm de TGFBR2A y TGFBR2B se mantienen más homogéneos. (figura 3.4).



3. Potencial de diferenciación de LS-MSC y su relación con las variantes de *splicing* del TGFBR2

Para evaluar si los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* guardan relación con el potencial de diferenciación de las LS-MSC, se planteó realizar el análisis comparativo del potencial de diferenciación osteogénico y condrogénico de estas células. Se evaluó el potencial de diferenciación osteogénico mediante tinción con Alizarin red en un total de 5 cultivos primarios de voluntarios No-OA (figura 3.5 a). Las células de los voluntarios No-OA 1, 2 y 3 mostraron niveles de diferenciación similares, mientras que la muestra del voluntario No-OA 4 presentó los niveles mayores de diferenciación osteogénica, y la muestra del voluntario 5 los menores niveles. Esta observación pudo ser confirmada mediante cuantificación de los contenidos de Alizarin red, mediante extracción con ácido acético y medida de absorbancia a 405 nm (figura 3.5 b). Para normalizar los valores de la cuantificación al contenido celular de los pocillos, la absorbancia a 405 nm se refirió a la cantidad de proteínas totales mediante cuantificación por el método de Bradford.

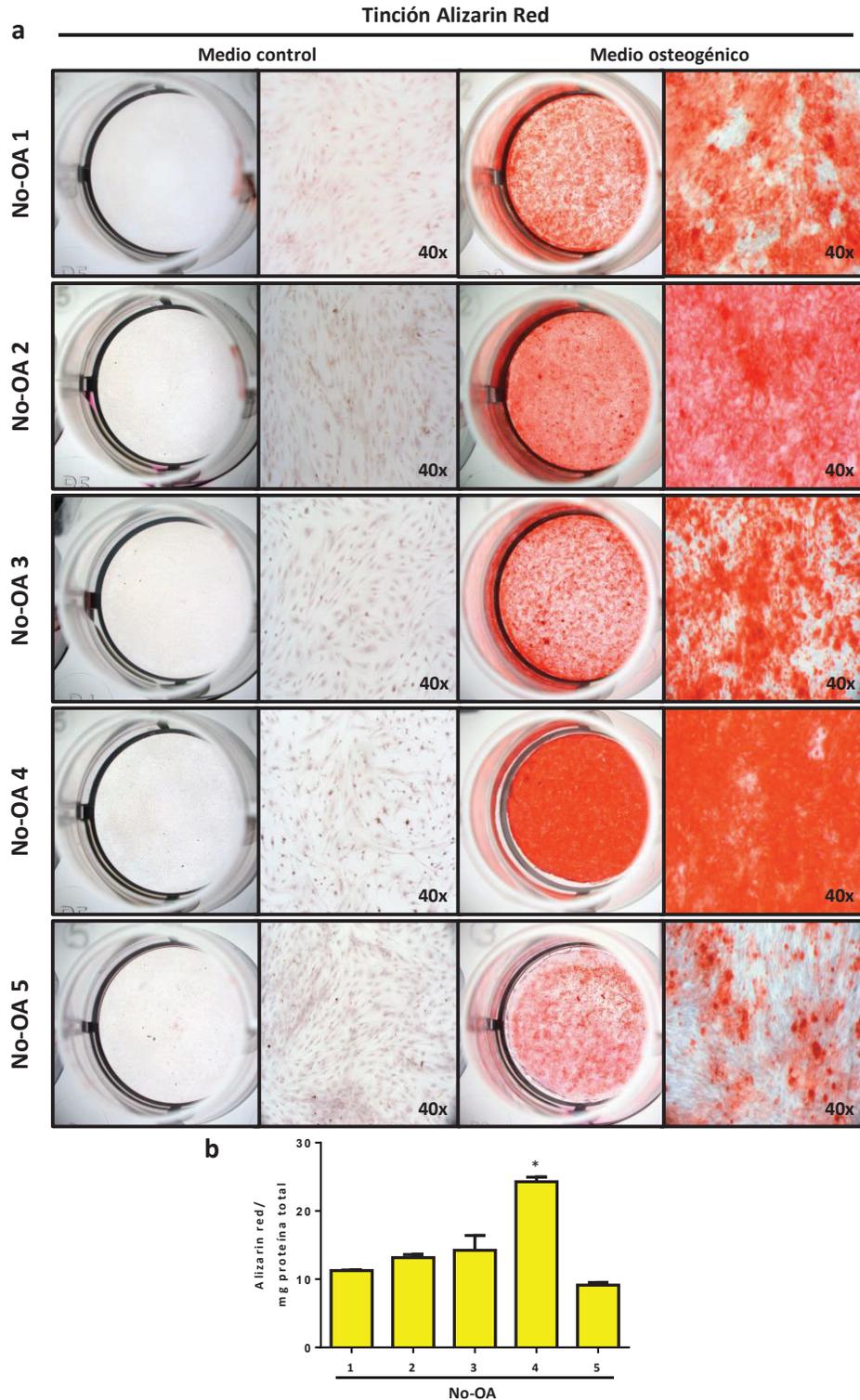
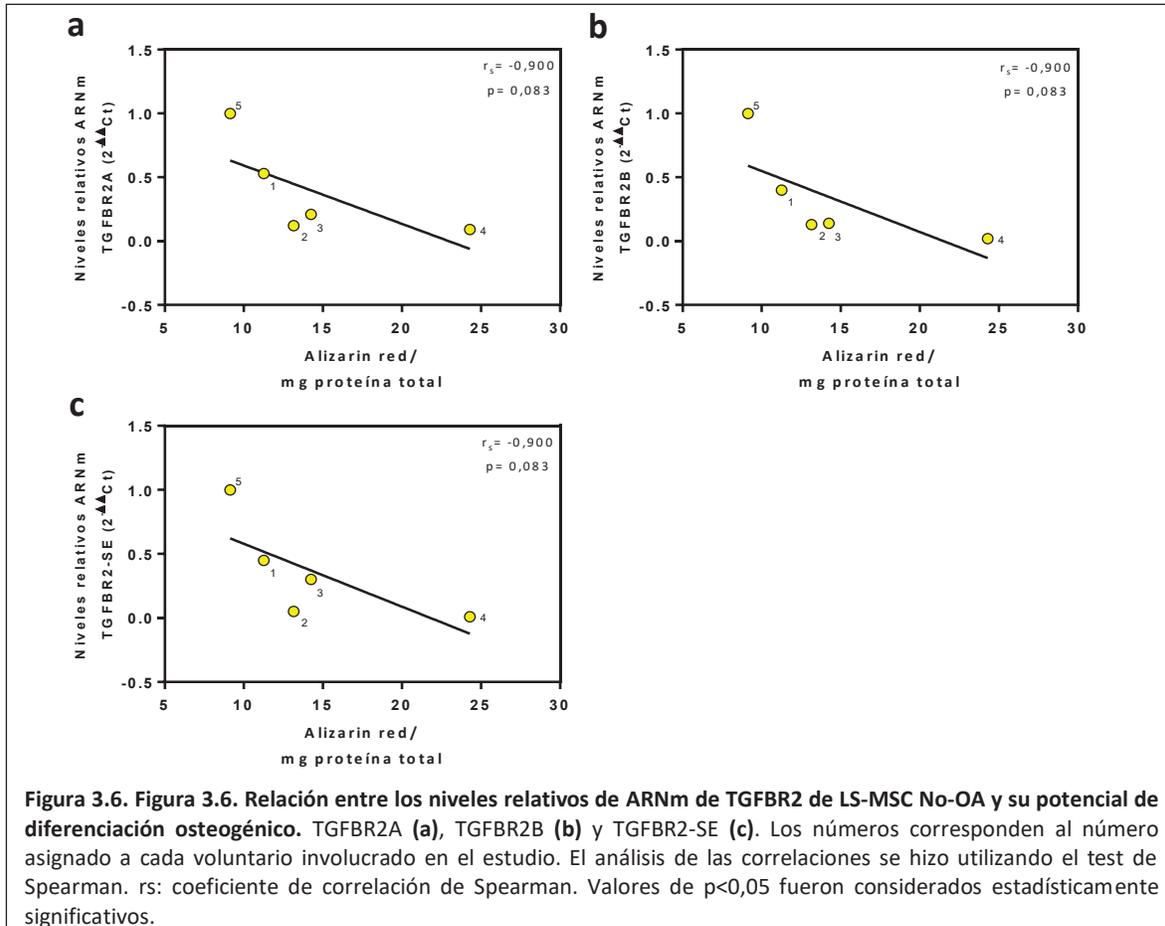


Figura 3.5. Diferenciación osteogénica de LS-MSC No-OA. (a) Microfotografías representativas de cultivos de LS-MSC de lavado articular (No-OA) pasajes 3/5, diferenciadas al linaje osteogénico. **(b)** cuantificación de la diferenciación osteogénica mediante extracción de Alizarin red con Ac. Acético 10 % y normalización a proteínas totales. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test de Tukey y se expresaron como el promedio \pm SE (error estándar). Para realizar estos tests se utilizó el *software* Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Cuando se correlacionaron los niveles de diferenciación osteogénica con los niveles relativos de ARNm de las variantes de *splicing* de TGFBR2 de estos donantes (figura 3.6), se observó una correlación negativa lo que sugiere un posible impacto de estas variantes de *splicing* sobre el potencial osteogénico de estas células.



Por otra parte, en LS-MSC de pacientes con OA, se observaron niveles de diferenciación osteogénica muy similares entre 4 de estos cultivos, siendo la muestra OA 1 la que presentó un mayor potencial de diferenciación (figura 3.7 a y b).

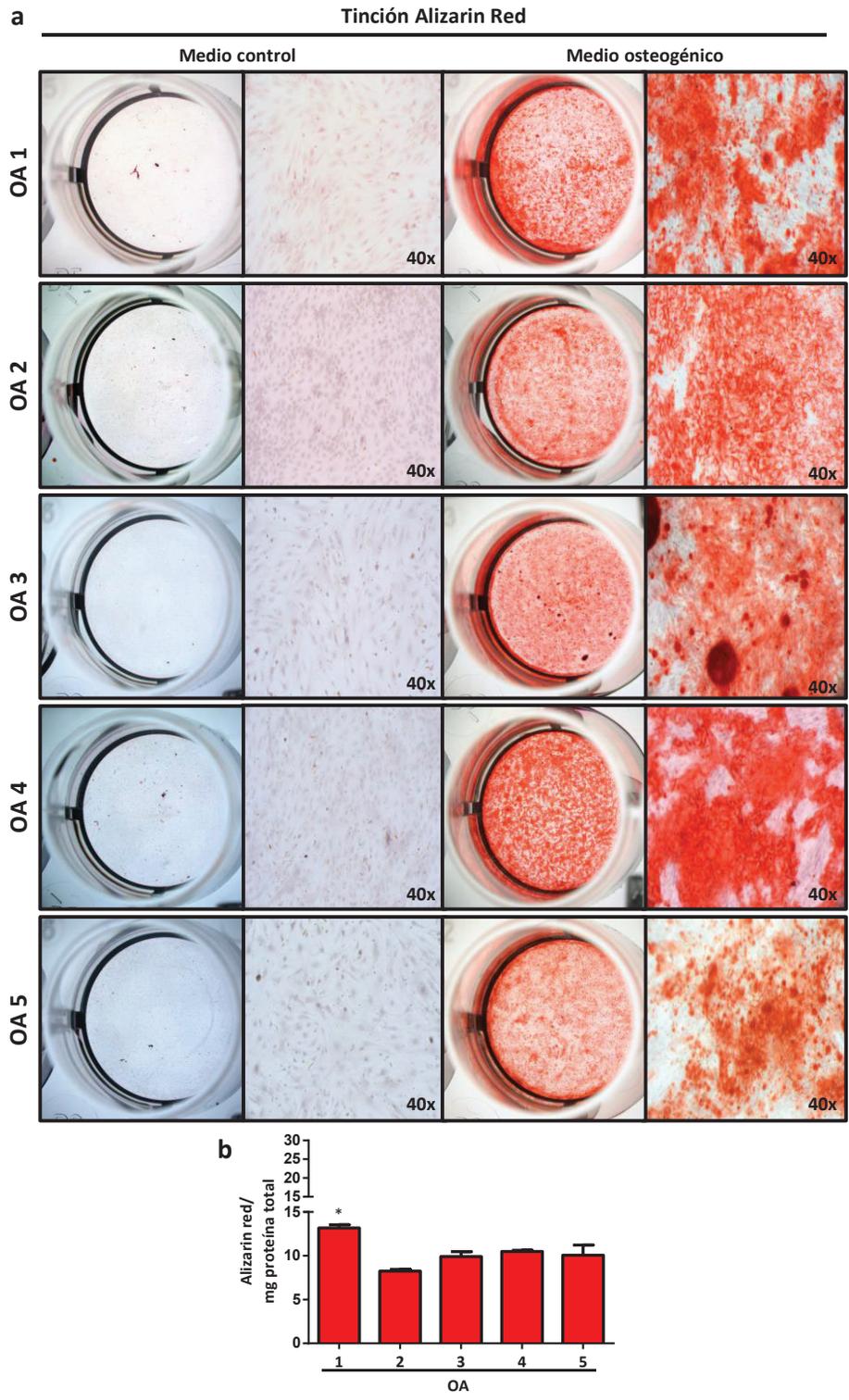
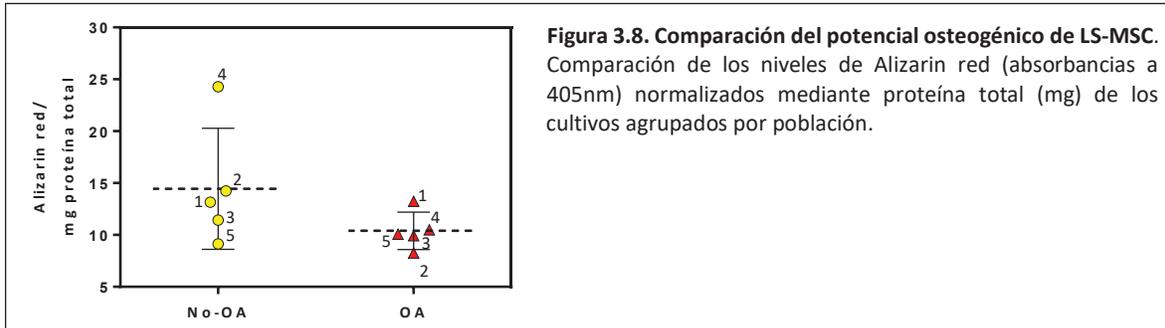
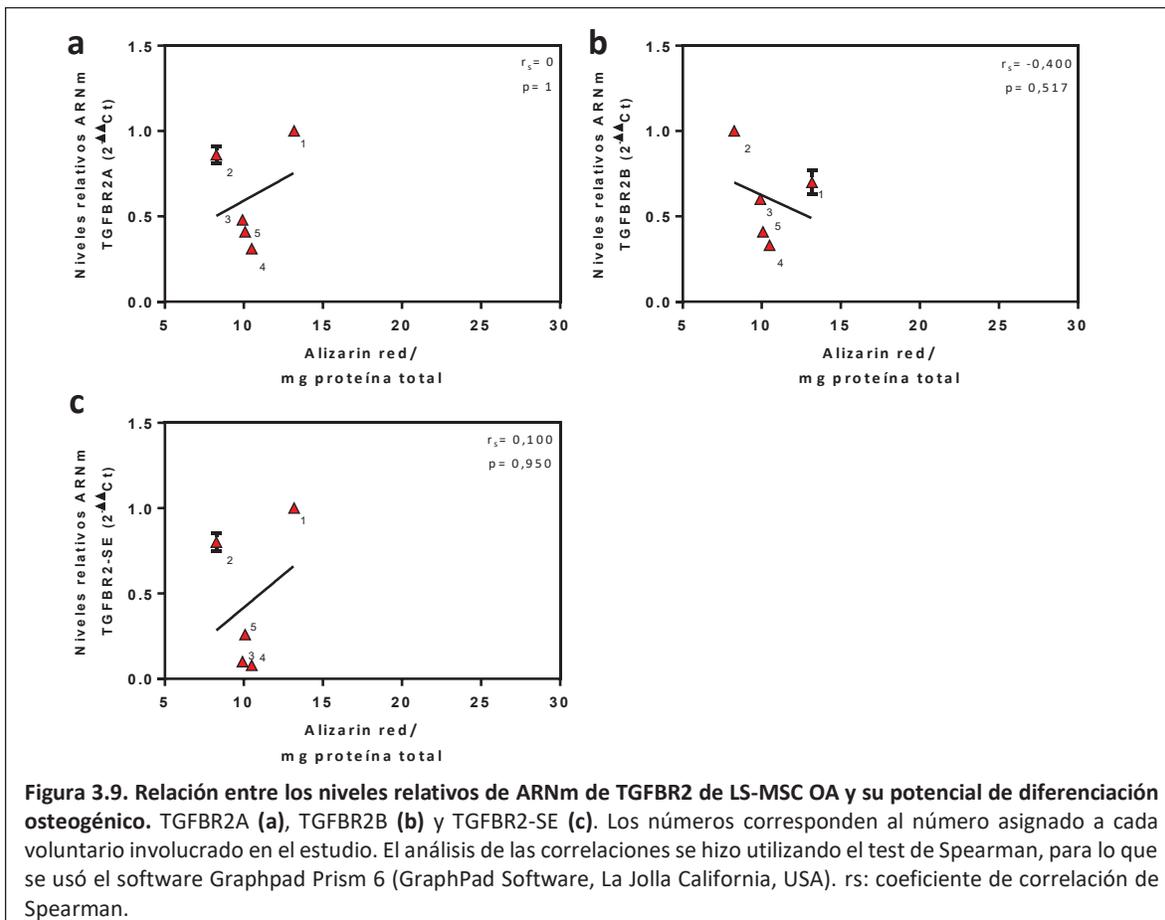


Figura 3.7. Diferenciación osteogénica de LS-MSC OA. (a) Microfotografías representativas de cultivos de células LS-MSC de líquido sinovial de rodillas artrósicas (OA) P3/5, diferenciadas al linaje osteogénico. (b) Cuantificación de la diferenciación osteogénica mediante extracción de Alizarin red con Ac. Acético 10% y normalización a proteínas totales. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test de Tukey y se expresaron como el promedio \pm SE (error estándar). Para realizar estos tests se utilizó el *software* Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Es importante mencionar que los niveles de diferenciación osteogénica obtenidos en LS-MSC de pacientes con OA fueron menores a los observados en individuos No-OA, aunque no estadísticamente significativos (figura 3.8).



Seguidamente, se realizaron comparaciones entre los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* de TGFBR2 y el potencial de diferenciación osteogénica de las LS-MSC OA (figura 3.9). En este análisis, no se observaron correlaciones entre las variantes de *splicing* y la diferenciación, sugiriendo inicialmente que las variantes de *splicing* no impactarían en la diferenciación osteogénica de estas células.



De manera similar a lo analizado para la diferenciación osteogénica, se evaluó la relación entre los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* y el potencial de diferenciación condrogénica de las LS-MSC. Siguiendo el protocolo de de Mara y colaboradores, en ensayo de monocapa y en pocillo único,

se evaluó inicialmente el potencial de diferenciación condrogénico mediante tinción con Alcian blue en un total de 5 cultivos primarios de voluntarios No-OA (figura 3.10 a). Se pudo observar que las células de los voluntarios No-OA 1, 2, 3 y 5 muestran niveles de diferenciación similares, mientras que la muestra del voluntario No-OA 4 presenta los mayores niveles de diferenciación condrogénica (al igual que lo observado en este paciente para diferenciación osteogénica). Para confirmar lo observado por microscopía, en la figura 3.10 b se representa la cuantificación de los contenidos de Alcian blue.

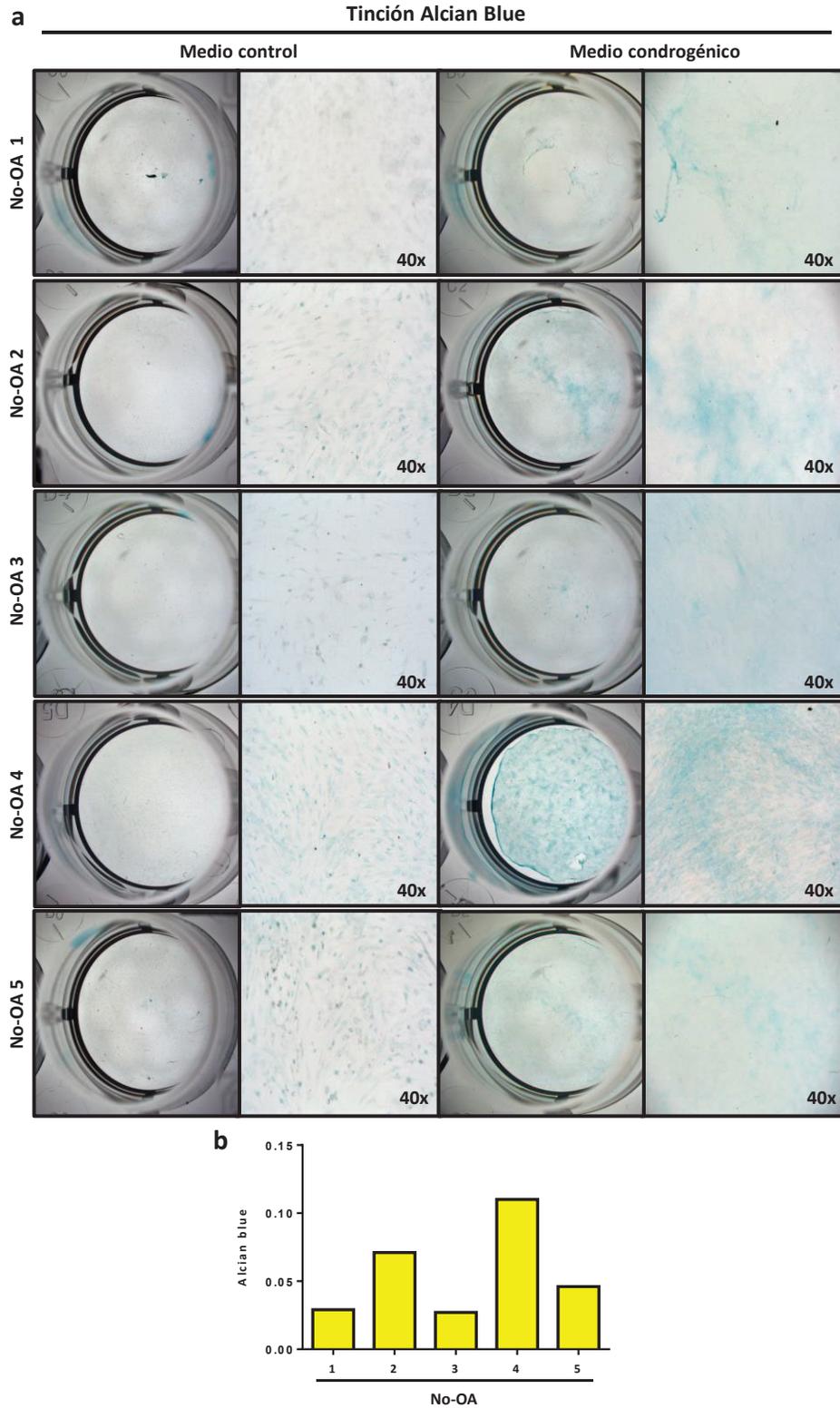


Figura 3.10. Diferenciación condrogénica de LS-MSC No-OA. (a) Microfotografías de cultivos de células LS-MSC de lavado articular (No-OA) P3/5, diferenciadas a precursores de cartílago. (b) Cuantificación de la diferenciación condrogénica mediante extracción de Alcian Blue con SDS 10 %. Los valores mostrados corresponden a los valores de absorbancia obtenidos para los cultivos con medio condrogénico menos la absorbancia de los cultivos control.

Cuando se correlacionaron los niveles de diferenciación condrogénica con los niveles relativos de ARNm de las variantes de *splicing* de TGFBR2 de estos donantes (figura 3.11), se observó una correlación negativa lo que sugiere un posible impacto de estas variantes de *splicing* sobre el potencial condrogénico de estas células al igual de lo observado en ellas, para la diferenciación osteogénica.

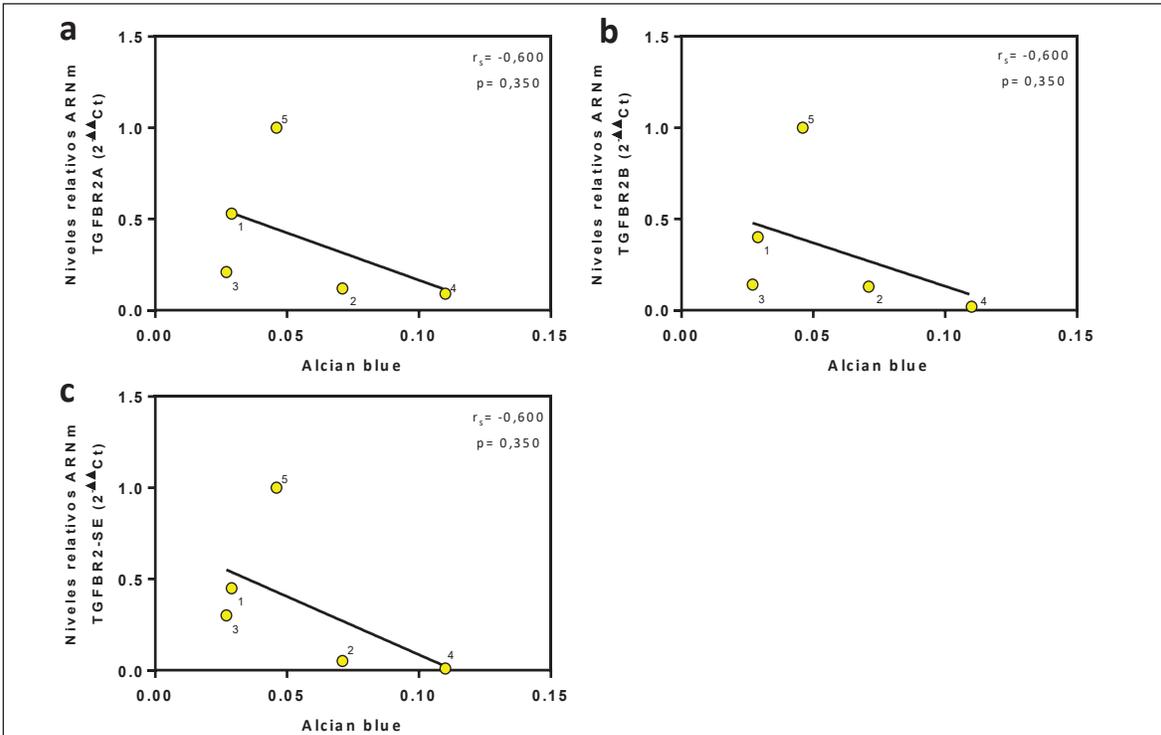


Figura 3.11. Relación entre los niveles relativos de ARNm de TGFBR2 de LS-MSC No-OA y su potencial de diferenciación condrogénica. TGFBR2A (a), TGFBR2B (b) y TGFBR2-SE (c). Los números corresponden al número asignado a cada voluntario involucrado en el estudio. El análisis de las correlaciones se hizo utilizando el test de Spearman. r_s : coeficiente de correlación de Spearman. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Por otra parte, en LS-MSC de pacientes con OA, se observaron niveles de diferenciación condrogénica muy similares entre ellos (figura 3.12 a y b). Cabe señalar que los valores de cuantificación de la capacidad condrogénica de las células del paciente 5 se encuentran disminuidos, debido a un artefacto de la técnica. Dicho cultivo presentó una alta condensación condrogénica lo que dificultó la extracción completa del Alcian blue.

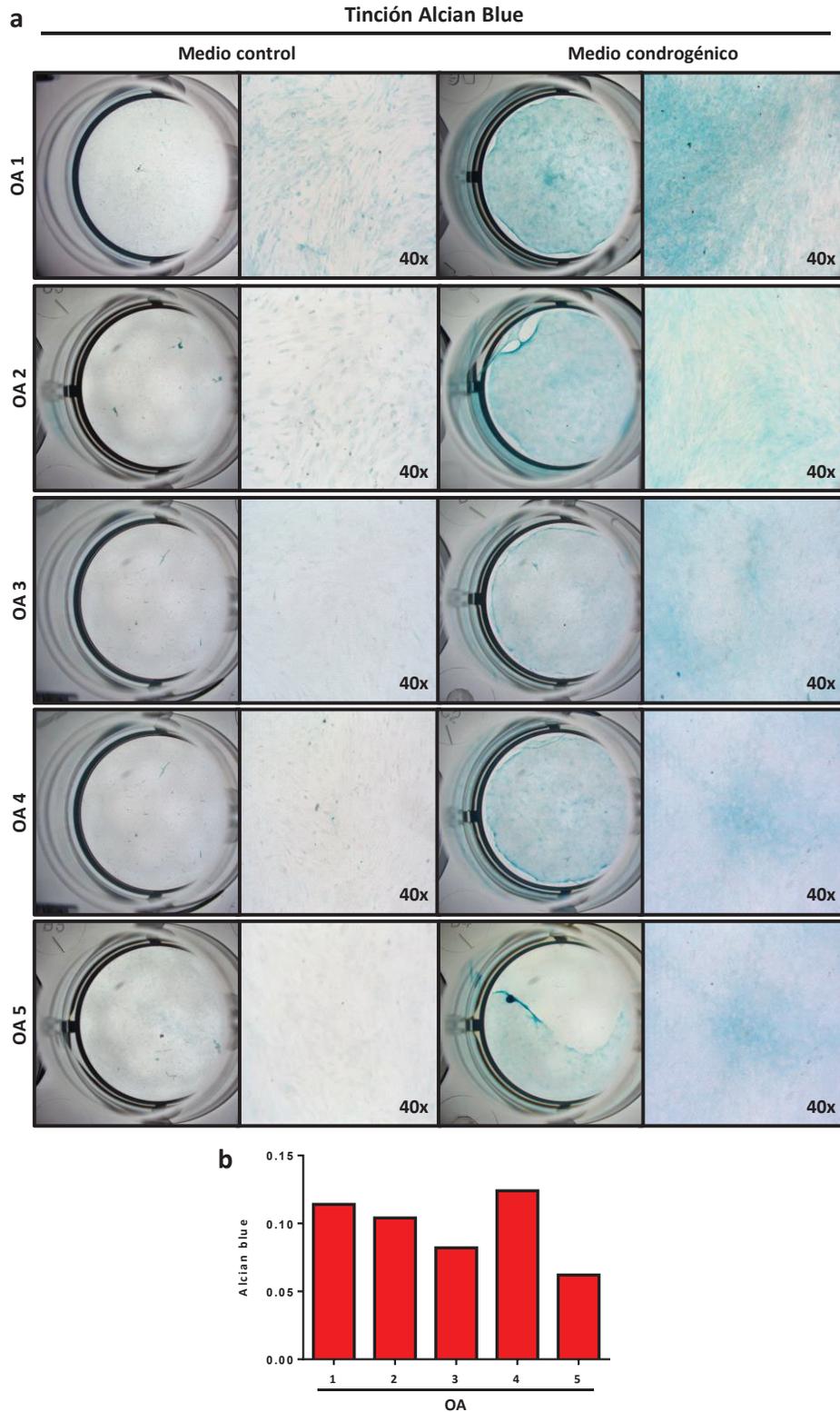


Figura 3.12. Diferenciación condrogénica de LS-MSC OA. (a) Microfotografías de cultivos de células LS-MSC de lavado articular (No-OA) P3/5, diferenciadas a precursores de cartílago. **(b)** Cuantificación de la diferenciación condrogénica mediante extracción de Alcian Blue con SDS 10 %. Los valores mostrados corresponden a los valores de absorbancia obtenidos para los cultivos con medio condrogénico menos la absorbancia de los cultivos control.

Interesantemente, los niveles de diferenciación condrogénica de LS-MSC de pacientes con OA fueron mayores a los observados en individuos No-OA, aunque no estadísticamente significativos (figura 3.13).

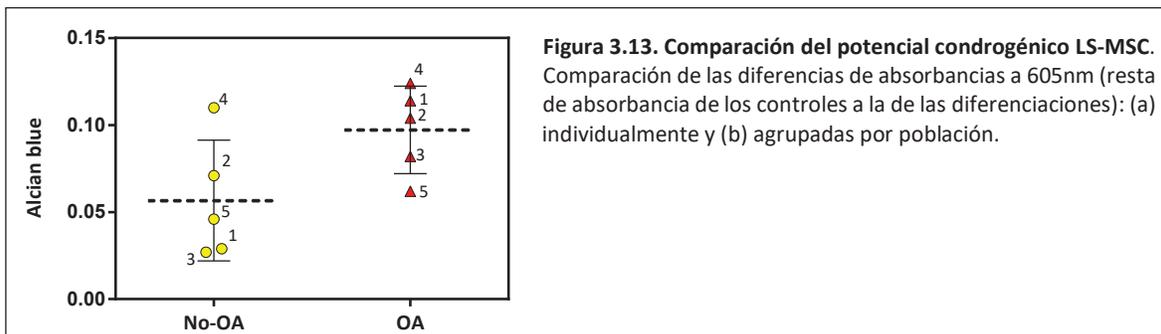
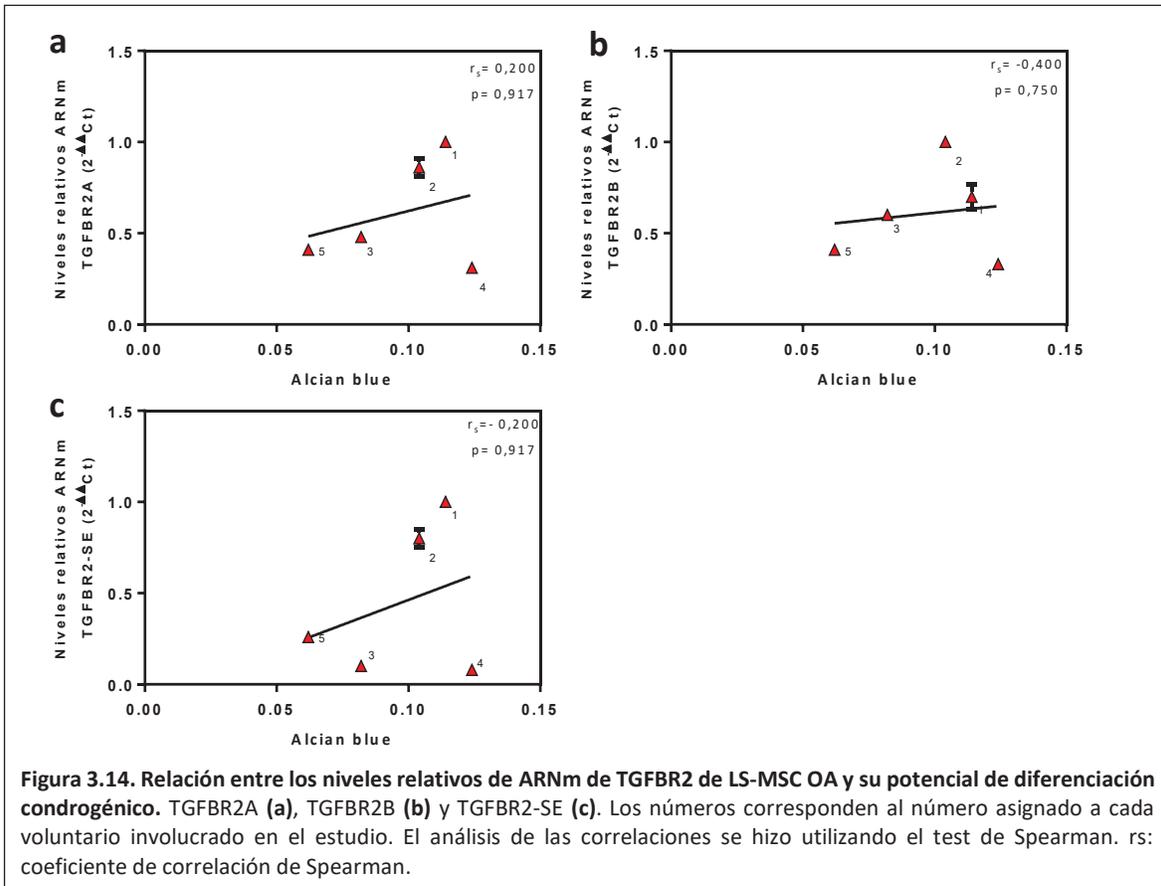


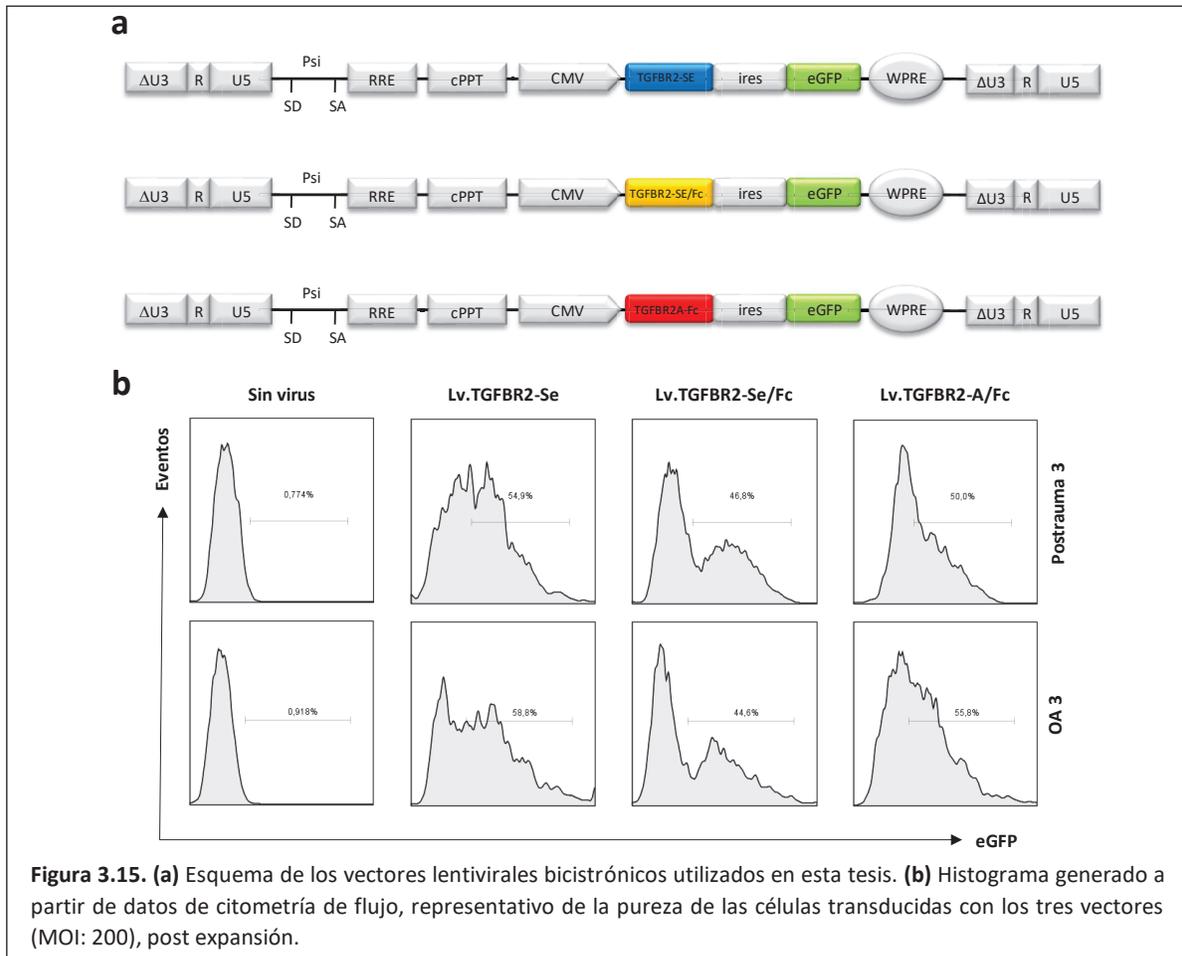
Figura 3.13. Comparación del potencial condrogénico LS-MSC. Comparación de las diferencias de absorbancias a 605nm (resta de absorbancia de los controles a la de las diferenciaciones): (a) individualmente y (b) agrupadas por población.

Continuando con el análisis, se realizaron comparaciones entre los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* de TGFBR2 y el potencial de diferenciación condrogénica de las LS-MSC OA (figura 3.14). En este ensayo y al igual que lo observado para la diferenciación osteogénica de estas mismas células, no se observaron correlaciones entre las variantes de *splicing* y la diferenciación condrogénica.



En conjunto, estos resultados sugieren que en LS-MSC de voluntarios No-OA habría una relación inversa entre los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* de TGFBR2 y el potencial de diferenciación tanto osteogénico como condrogénico (entorno No-OA). Por otra parte, en LS-MSC de pacientes con OA dicha relación se perdería, sugiriendo una disregulación en la cascada de TGF- β (entorno OA).

Con el fin de ahondar en esta teoría, se propuso sobreexpresar en LS-MSC miembros de la cascada de señalización de TGF- β tales como TGFBR2-SE, TGFBR2-SE/Fc (potencial versión terapéutica de TGFBR2-SE) y TGFBR2A/Fc (conocido antagonista de TGF- β) y evaluar su impacto sobre el potencial de diferenciación. Para ello, células LS-MSC en pasaje 2 provenientes del individuo 3 No-OA y del paciente 3 OA fueron transducidas con vectores lentivirales generados previamente en el laboratorio (Rodríguez, T., Tesis Doctoral 2015, figura 3.15 a). Las células fueron expandidas y la eficiencia de la transducción se cuantificó por citometría de flujo, en función de la expresión del gen reportero eGFP. De este modo se trabajó con poblaciones celulares de aproximadamente 45-60% de pureza (figura 3.15 b).



Inicialmente, se diferenciaron hacia el linaje osteogénico, células del voluntario 3 No-OA sin transducir (control) y transducidas con vectores lentivirales sobreexpresando TGFBRSE, TGFBR2-SE/Fc y TGFBR2A/Fc. Mediante tinción con Alizarin red se pudo observar que tanto TGFBRSE, como TGFBR2-SE/Fc incrementan los niveles de diferenciación osteogénica de manera significativa, y que TGFBR2A/Fc los disminuye (figura 3.16 a y b).

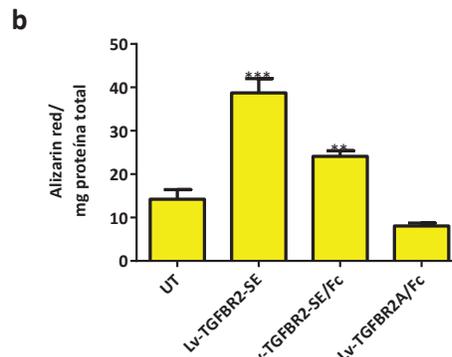
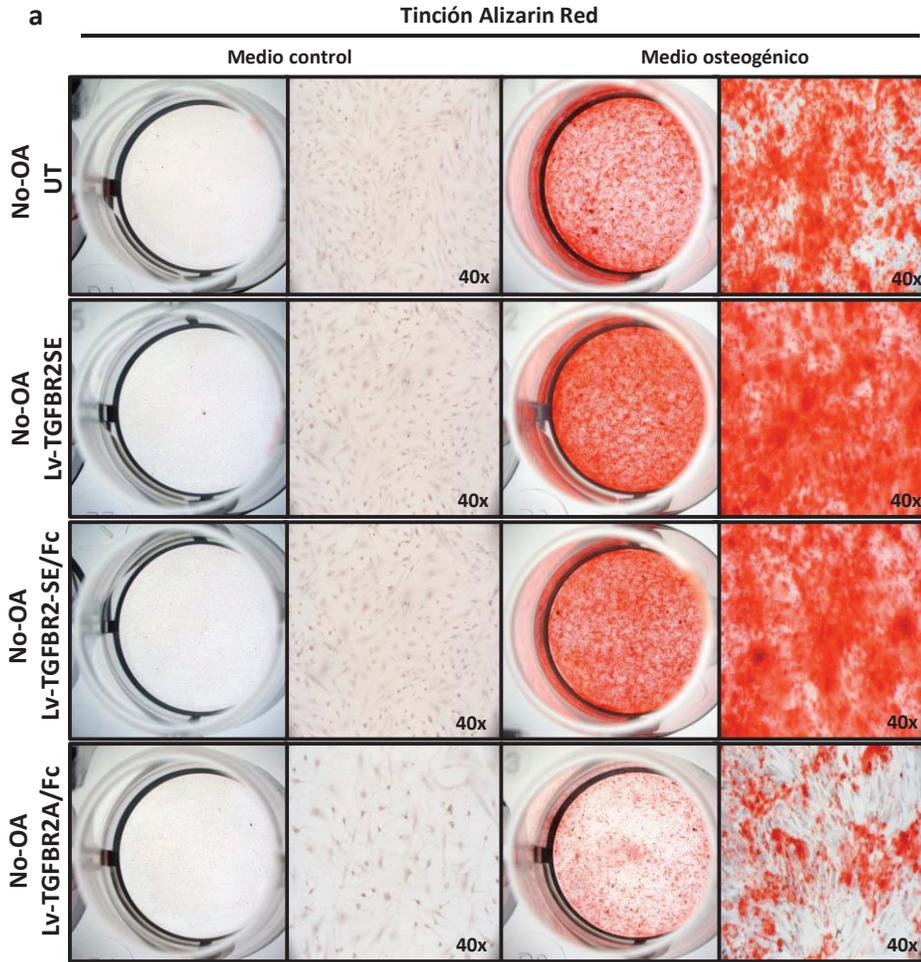


Figura 3.16. Diferenciación osteogénica de LS-MSC OA transducidas. (a) Microfotografías de cultivos de células LS-MSC de líquido sinovial (OA) en pasaje 5, sin transducir y transducidas con: Lv-TGFBR2-SE, Lv-TGFBR2-SE/Fc y Lv-TGFBR2A/Fc; diferenciadas al linaje osteogénico. **(b)** Cuantificación de la diferenciación osteogénica mediante extracción de Alizarin red con Ac. Acético 10% y normalización a proteínas totales. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test de Tukey y se expresaron como el promedio \pm SE (error estándar). Para realizar estos tests se utilizó el *software* Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Por otra parte, del análisis en LS-MSC OA (paciente 3) se observó que TGFBR2-SE aumentó los niveles de diferenciación osteogénica, TGFBR2-SE/Fc los disminuyó y con TGFBR2A/Fc permanecieron invariables (figura 3.17 a y b).

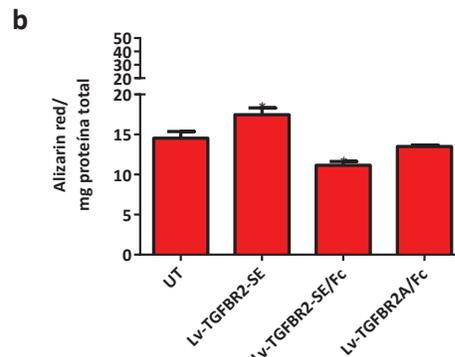
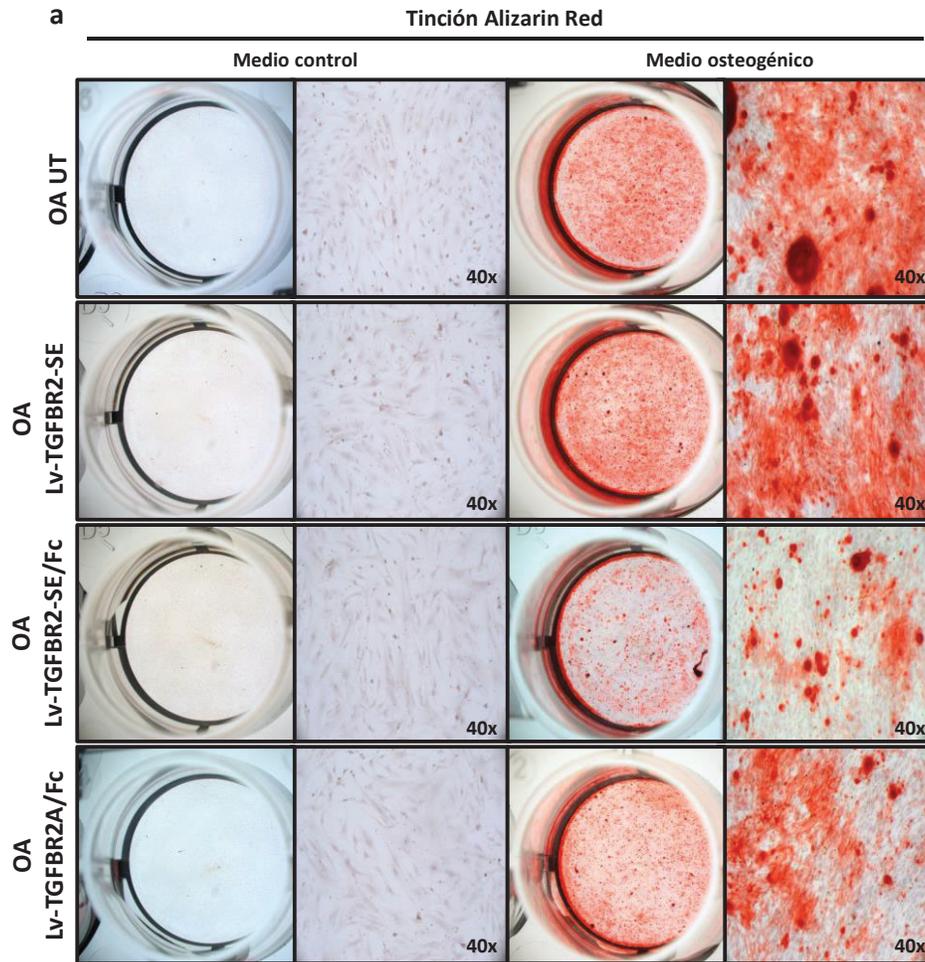
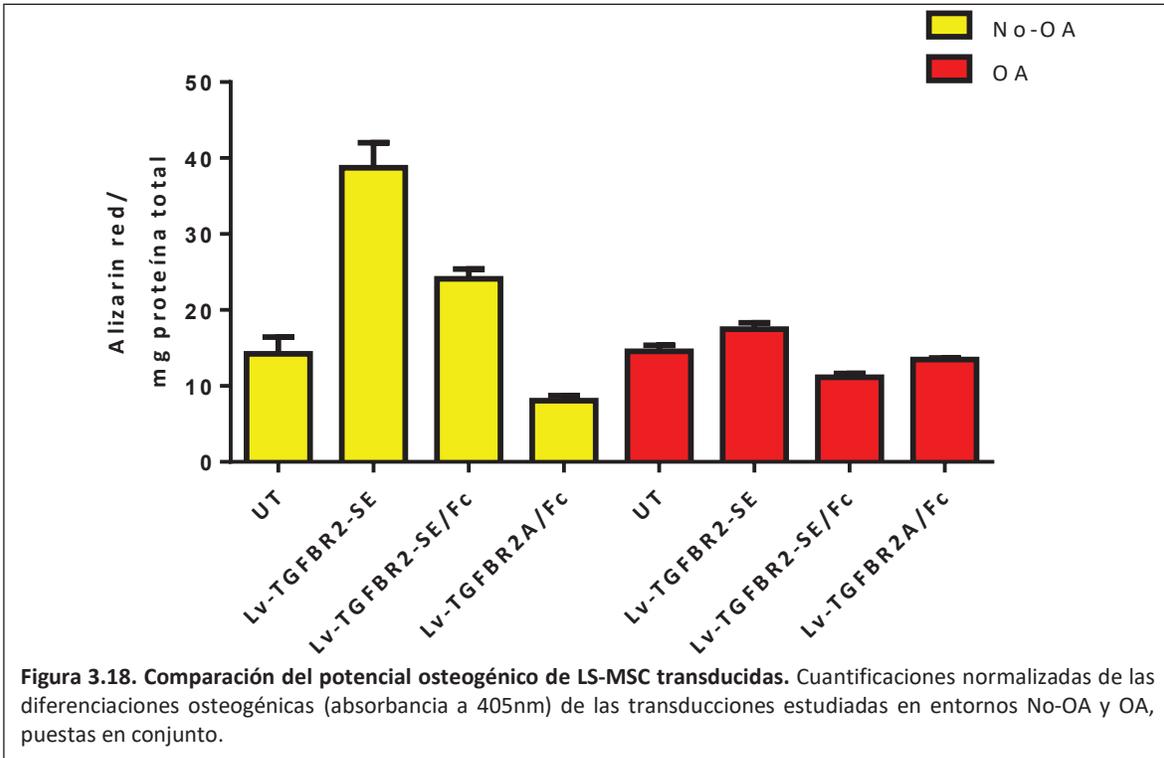
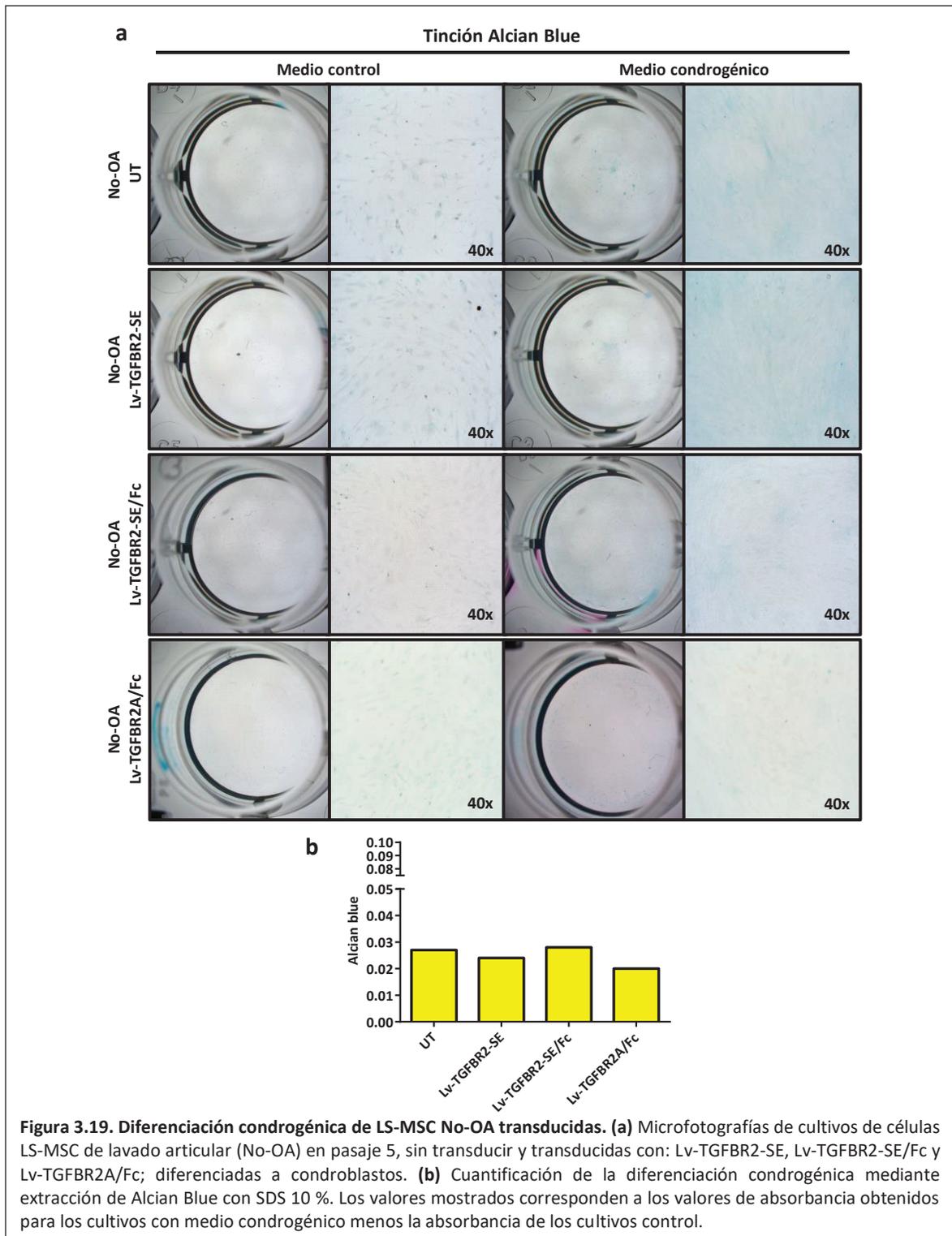


Figura 3.17. Diferenciación osteogénica de LS-MSC No-OA transducidas. (a) Microfotografías de cultivos de células LS-MSC de lavado articular (No-OA) en pasaje 5, sin transducir y transducidas con: Lv-TGFBR2-SE, Lv-TGFBR2-SE/Fc y Lv-TGFBR2A/Fc; diferenciadas al linaje osteogénico. (b) Cuantificación de la diferenciación osteogénica mediante extracción de Alizarin red con Ac. Acético 10% y normalización a proteínas totales. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido del test de Tukey y se expresaron como el promedio \pm SE (error estándar). Para realizar estos tests se utilizó el *software* Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Estos resultados en conjunto indican que, en un entorno No-OA, la sobreexpresión de transgenes de la cascada de TGF- β impacta de manera más conspicua sobre la diferenciación osteogénica que en células provenientes de un entorno OA (figura 3.18).

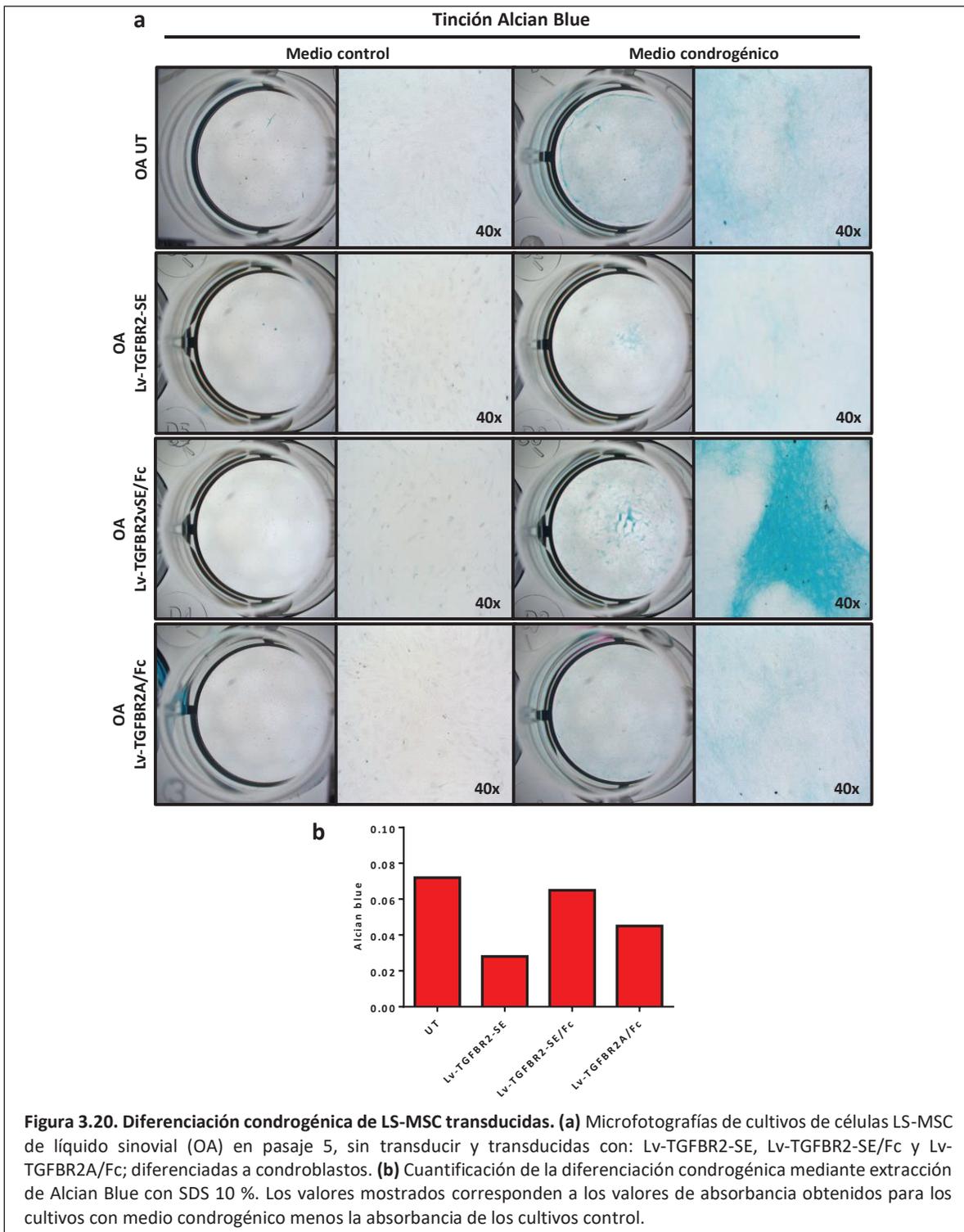


Continuando con el análisis del impacto generado por la sobreexpresión de miembros de la cascada de señalización de TGF- β sobre el potencial de diferenciación de las LS-MSC, se procedió a la diferenciación condrogénica de células del voluntario 3 No-OA sin transducir (control) y transducidas con vectores lentivirales sobreexpresando TGFB2-SE, TGFB2-SE/Fc y TGFB2A/Fc. Mediante tinción con Alcian blue se pudo observar que la sobreexpresión de los tres transgenes utilizados no modificó la diferenciación condrogénica, similar al bajo potencial condrogénico observado para estas células sin transducir (figura 3.19 a y b).

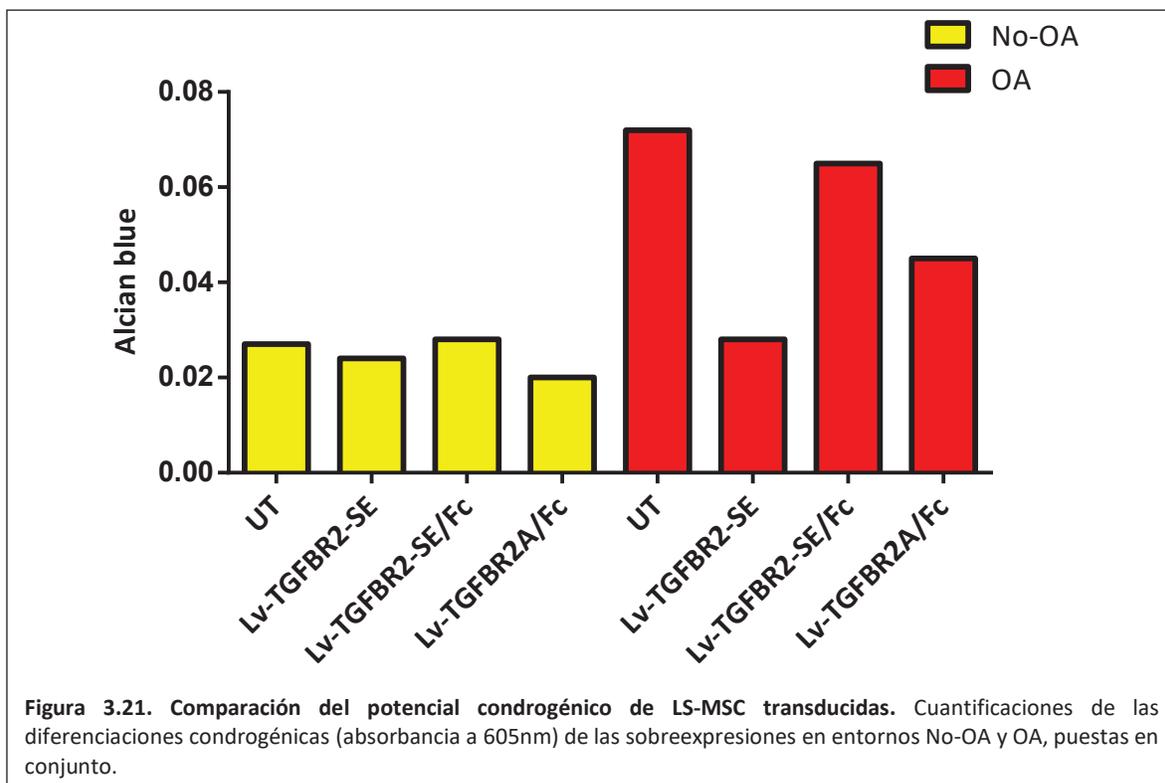


Por otra parte, se diferenciaron hacia el linaje condrogénico, células del voluntario 3 OA sin transducir (control) y transducidas con vectores lentivirales sobreexpresando TGFB2-SE, TGFB2-SE/Fc y TGFB2A/Fc. Mediante tinción con Alcian blue se pudo observar que tanto TGFB2-SE como TGFB2A/Fc disminuyeron los niveles de diferenciación condrogénica respecto al control sin

transducir. Siendo TGFBR2-SE el responsable de la disminución más pronunciada, alcanzando niveles similares a los observados para LS-MSC No-OA. (figura 3.20 a y b).



Contrario a lo observado para los niveles de diferenciación osteogénica, estos resultados en conjunto indican que, en un entorno OA, la sobreexpresión de transgenes de la cascada de TGF- β incide de manera más sensible sobre la diferenciación condrogénica que en células provenientes de un entorno No-OA (figura 3.21).



A pesar de tratarse de un bajo número de muestras, el estudio del potencial de diferenciación de LS-MSC y su relación con componentes de la cascada de TGF- β sugiere en primera instancia, una gran incidencia del entorno (No-OA u OA). Siendo los niveles de diferenciación osteogénica del entorno No-OA sensibles a las modificaciones estudiadas, y en contraparte no alterarse la diferenciación condrogénica. Mientras que el entorno OA los niveles de diferenciación osteogénica no mostraron variaciones ante la sobreexpresión de los transgenes y si se vieron afectados los niveles de diferenciación condrogénica.

Discusión

En este capítulo se analizaron por primera vez los niveles relativos de las variantes de *splicing* de TGFBR2 en células mesenquimales humanas de líquido sinovial. El análisis poblacional para cada una de las variantes aquí estudiadas mostró una alta variabilidad en los cultivos No-OA, siendo en la población OA más homogéneos. Aun así, pudo observarse una mayor expresión relativa de estas variantes en cultivos de LS-MSC provenientes de pacientes OA. Estos resultados sugieren que los niveles de estas variantes de *splicing* en células LS-MSC estarían relacionadas con la patología. En la misma línea de evidencia están los resultados obtenidos en un modelo murino de OA por Xie y colaboradores, donde se deletó el gen TGFBR2 en MSC de médula ósea disminuyendo la progresión de la enfermedad (Xie, L. *et al.*, 2016). Según FDA una de las características principales que debe tener un biomarcador es que debe ser seguro y fácil de medir (Sahu, P. *et al.*, 2011). Es por esto que dada la metodología llevada cabo, no es posible plantear los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* en LS-MSC como potenciales biomarcadores de OA. Principalmente debido a lo invasivo y complejo de la obtención de muestras. Una alternativa podría ser la evaluación de los niveles de TGFBR2-SE a nivel de proteínas. Por lo que deberían plantearse ensayos de evaluaciones comparativas de los niveles de TGFBR2-SE en suero de pacientes con OA e individuos sanos.

El interés creciente en el área de la medicina regenerativa, liderado por una mejor comprensión del papel de las células madre mesenquimales en la homeostasis y reparación de tejidos, se encuentra enfocado en explorar el potencial de las terapias con células madre en el manejo activo de la osteoartritis sintomática. En línea con estas demandas es que se propuso el estudio del potencial de diferenciación de las LS-MSC. Con tal fin, es esta tesis, se compararon por primera vez el potencial condrogénico y osteogénico de LS-MSC de un grupo pequeño de individuos No-OA y LS-MSC de pacientes OA. Inicialmente se determinó un mayor nivel de diferenciación osteogénica por parte de los cultivos No-OA respecto de la población LS-MSC OA. Cabe destacar que, hasta el momento, este tipo de comparaciones sólo había sido realizado utilizando células mesenquimales de médula ósea (BMSC) como control No-OA (Jones, E. A. *et al.*, 2004), es decir con células provenientes de una fuente diferente a las LS-MSC. Si bien en ese estudio se observaron potenciales de diferenciación osteogénicos similares entre individuos OA y no OA, el hecho de utilizar como control MSC provenientes de un microambiente celular distinto hace que esos resultados y los nuestros no sean comparables. Por otra parte, cuando se analizó la diferenciación condrogénica, se observó que la población de LS-MSC No-OA presentó un menor nivel de tinción con Alcian blue que la población OA. En contraposición, Dudics y colaboradores determinaron potenciales de diferenciación condrogénica similares en BMSC de individuos sanos e individuos No-OA (Dudics, V. *et al.*, 2009). Nuevamente, la utilización de MSC provenientes de un nicho celular diferente al que existe en las articulaciones, impide la comparación de esos resultados con los mostrados en esta tesis.

Numerosos estudios han relacionado los niveles de ARNm de las variantes de *splicing* del TGFBR2 y su relación con condiciones patológicas de cáncer. En pulmón, se ha descrito que la expresión reducida de TGFBR2 en el NSCLC humano está asociada con la diferenciación reducida, el aumento del estadio tumoral, el aumento de la metástasis nodal y, lo más importante, la reducción de la supervivencia (Malkoski *et al.*, 2012). A su vez, en cánceres hepáticos, se informa que niveles bajos de ARNm de TGFBR2 correlacionan positivamente con el tamaño tumoral, metástasis intrahepática y supervivencia más corta (Mamiya *et al.*, 2010). Por otro lado, la pérdida de expresión de TGFBR2 en el tumor de pacientes con cáncer oral se asoció con una reducción de la supervivencia global significativa (Sivadas *et al.*, 2013). No hallándose reportes en tal línea en patologías osteoarticulares.

Sin embargo, estudios previos de nuestro laboratorio, mostraron que, en leucocitos humanos, existen perfiles diferentes de los niveles de las variantes de *splicing* de TGFBR2 entre pacientes con AR y voluntarios que no tenían la enfermedad (Carrea, A. Tesis doctoral 2013). Estas variaciones a su vez fueron correlacionadas con parámetros clínicos de la AR. De modo similar, en esta tesis, se hipotetizó que los niveles de ARNm de TGFBR2A, TGFBR2B y TGFBR2-SE de LS-MSC podrían verse reflejados en características básicas de estas células tales como la diferenciación a hueso y cartílago, en pacientes con OA. De modo interesante aquí pudimos observar, en un entorno No-OA (n=5) una correlación negativa entre los niveles de diferenciación osteogénica y condrogénica y las tres variantes de *splicing* estudiadas. Y en contraposición la pérdida de estas en un entorno OA (n=5), no observándose relación alguna entre los niveles de ARNm y el grado de diferenciación. De esta manera, en esta tesis se pone de manifiesto por primera vez, una relación preliminar entre los niveles de diferenciación *in vitro* de LS-MSC y los niveles de variantes de *splicing* de TGFBR2.

Gran número de reportes indican que los altos niveles de TGF- β activo en el hueso subcondral, interrumpen el mecanismo homeostático normal esencial para el cartílago y la integridad de la articulación (Scharstuhl, A. *et al.*, 2002; Shen, J. *et al.*, 2014). Sumado a esto, la elevación aberrante de los niveles de TGF- β 1 activo en el hueso subcondral se asocia con signos tempranos de OA (Hunter, D.J. *et al.*, 2006). A su vez, se ha reportado que, altos niveles de TGF- β dan como resultado un reclutamiento erróneo de MSC y la formación de islotes osteoides (Ashraf, S. *et al.*, 2008; Suri, S. *et al.*, 2007). Por lo que, modular la activación excesiva de la cascada de TGF- β podría llevar a un mantenimiento estructural y funcional de la unidad hueso subcondral/cartílago articular, y potencialmente, ralentizar la progresión de la OA. A su vez, las relaciones dispares observadas en esta tesis entre la diferenciación osteogénica y los niveles de ARNm de TGFBR2 en LS-MSC No-OA y OA, sitúan al entorno como un factor determinante y objeto de estudio.

En base a lo anteriormente mencionado, se planteó la necesidad de evaluar si la sobreexpresión de dos nuevas proteínas tales como TGFBR2-SE y TGFBR2-SE/Fc (proteína de fusión) podrían afectar la diferenciación de las LS-MSC. Inicialmente se estudió el efecto de esa sobreexpresión sobre la diferenciación osteogénica en un entorno No-OA y OA (LS-MSC). Como control se utilizaron LS-MSC sobreexpresando TGFBR2A/Fc, (receptor artificial de TGF- β , carente del dominio transmembrana y por lo tanto capaz de capturar TGF- β y así inhibir su acción). Esta proteína ha sido reportada en varios estudios utilizándose como un barredor de TGF- β y con aspiraciones terapéuticas en diferentes modelos de cáncer, fibrosis hepática y diabetes, entre otros (George, J. *et al.*, 1999; Russo, L. M. *et al.*, 2007; Rowland-Goldsmith, M. A. *et al.*, 2001). Para dicha evaluación, las LS-MSC utilizadas en esta tesis fueron modificadas genéticamente mediante vectores lentivirales con muy buena eficiencia, al igual de lo reportado previamente en la literatura (Kang, Y. *et al.*, 2015). Interesantemente, en el entorno NO-OA, la sobreexpresión de los transgenes muestra tener una incidencia significativa sobre la diferenciación osteogénica. Así, TGFBR2-SE y TGFBR2-SE/Fc aumentan la diferenciación a hueso y, contrariamente, TGFBR2A/Fc lo disminuye. Por otra parte, en el entorno OA, la sobreexpresión de los tres transgenes tiene un impacto menor sobre la diferenciación osteogénica. TGFBR2-SE favorece levemente la diferenciación a ese linaje, TGFBR2-SE/Fc todo lo contrario, y TGFBR2A/Fc no la afecta. Estos resultados muestran que independientemente del entorno del cual provienen las LS-MSC, la sobreexpresión de TGFBR2-SE actúa promoviendo la diferenciación hacia ese linaje. Aunque en las LS-MSC de pacientes con OA la presencia o ausencia de miembros de la cascada de señalización de TGF- β podrían estar afectando

la acción de los transgenes sobre la diferenciación a hueso. En línea con esta observación, en un cultivo celular diferente, Couchourel y colaboradores en estudios *in vitro*, observaron que en osteoblastos humanos de pacientes OA el potencial de diferenciación osteogénica era menor al presentado por osteoblastos de individuos sanos, y que este efecto era revertido cuando se silenciaba la secreción de TGF- β (Couchourel, D. *et al*, 2009). El efecto pro-osteogénico mostrado por TGFBR2-SE, y de su versión como proteína de fusión, demanda un estudio más profundo tanto *in vitro* como *in vivo* en modelos de OA establecida a fines de ampliar y confirmar estas observaciones.

Los resultados mostrados en esta tesis no brindan evidencias suficientes para considerar a TGFBR2-SE y TGFBR2-SE/Fc como alternativas terapéuticas para el tratamiento de OA. Contrariamente, sería útil analizar, en cambio, si estas pudieran ser efectivas para tratamientos que demanden reparación ósea. Tal podría ser el caso de la elongación ósea, un novedoso y eficaz método para tratar defectos óseos, siendo el largo ciclo de regeneración uno de los problemas clínicos asociados con esta terapia. Se han realizado una gran cantidad de estudios para acelerar la osificación y acortar el proceso de tratamiento. Siendo los estudios de suplementación con combinaciones de factores de crecimiento los que han demostrado acortar los tiempos de tratamiento (Makhdom, A. M. *et al.*, 2013; Siwicka, K. A. *et al.*, 2011). Sin embargo, el *delivery* de factores de crecimiento en la región afectada sigue siendo un desafío. Lo que se suma a los costos de utilizar este tipo de suplementaciones. Es por ello que estudios recientes apuntan al desarrollo de estrategias más económicas y a su vez efectivas, siendo las MSC una interesante herramienta de *delivery*. En tal búsqueda, Sun y colaboradores demostraron en un modelo de regeneración ósea en conejos, que la sobreexpresión de TGF- β 1 por parte de BMSC promovió la formación de hueso nuevo, proponiendo este modelo como una opción terapéutica para mejorar este tipo de terapias (Sun, B. Y. *et al.*, 2018). Es en base los resultados obtenidos, que sería interesante evaluar en este tipo de modelos el *delivery* de TGFBR2-SE mediante MSC.

En lo referente a la capacidad de diferenciación hacia el linaje condrogénico de las LS-MSC sobreexpresando los mismos transgenes, el escenario fue el opuesto al observado para el linaje osteogénico. En LS-MS provenientes del entorno No-OA ninguno de los tres transgenes sobreexpresados muestran efecto sobre el potencial condrogénico apreciable. Por el contrario, en células de pacientes OA las tres proteínas sobreexpresadas tendrían un carácter anti-condrogénico, TGFBR2-SE/Fc con menor, y TGFBR2-SE, mayor impacto. Esta última disminuyendo el potencial condrogénico de las LS-MSC OA, a niveles observados en la población de donantes No-OA.

Una explicación a esto podría estar relacionada con la utilización de TGF- β 3 en el *cocktail* de diferenciación condrogénica utilizada en nuestro estudio. La falta de efecto de la sobreexpresión de los tres transgenes sobre la diferenciación condrogénica podría ser el resultado de que TGF- β 3 sólo o los niveles utilizados en las condiciones estudiadas durante esta tesis no fueron suficiente para la diferenciación de LS-MSC No-OA a precursores de cartílago. Siendo TGF- β 3 responsable entre otros procesos, de la estimulación de la proliferación de células mesenquimales previa diferenciación condrogénica (De Bari, C. *et al.*, 2001; Hsieh, P. C. *et al.*, 2003; Reinholz, G. G. *et al.*, 2009). Sumado a que la alta densidad celular es un requisito para la condrogénesis de células mesenquimales *in vitro* (Mara, C. S. *et al.*, 2011). Sería interesante evaluar los niveles de TGF- β 3 presentes en los cultivos de LS-MSC con el fin de explicar las diferencias observadas en los niveles de diferenciación condrogénica entre las poblaciones estudiadas.

Por otra parte, y en línea con lo observado en esta tesis *in vitro* en LS-MSc de paciente con OA, la inhibición de TGFBR2 con losartan o la neutralización de TGF- β con anticuerpos monoclonales específicos, retrasó la progresión de la degeneración del cartílago articular en modelos animales de OA (Xie, L. *et al.*, 2016; Chen, R. *et al.*, 2015). En el contexto de la bibliografía, esta última observación es controversial ya que existen reportes que demuestran que la sobreexpresión de TGF β 1 en las articulaciones de conejos con OA experimental por transfección intraarticular de TGF β 1 condujo a una reducción sustancial de la degradación del cartílago (Zhang, P. *et al.*, 2015). Es por ello que, para poder atacar a las vías dependientes de TGF β de manera más predecible, es de suma importancia dilucidar en detalle las diferentes vías de señalización intracelular y discriminar los efectos perjudiciales y protectores de TGF- β , y de otros miembros de la cascada de señalización, en los tejidos articulares y el organismo en general. A este respecto, los resultados obtenidos en esta tesis, sugieren un rol de inhibición de TGFBR2-SE y TGFBR2-SE/Fc sobre el potencial condrogénico de las LS-MSc de paciente con OA, pero, por su naturaleza *in vitro*, no permiten compararlos directamente con lo que ocurre *in vivo*. Si bien TGFBR2-SE parece estar involucrado en la modulación de la capacidad condrogénica de estas células, sería aventurado proponer a estas nuevas proteínas como posibles herramientas terapéuticas para esta enfermedad sin antes realizar evaluaciones precisas de su efecto en modelos animales.

Finalmente, es necesario discutir cómo impactarían los estudios realizados en esta tesis respecto del uso autólogo de MSc, y particularmente de LS-MSc, para revertir la OA con fines regenerativos. En base a los resultados obtenidos en este trabajo se puede sugerir la presencia de un entorno para las LS-MSc de pacientes con OA. En este, la cascada de TGF- β pareciera estar desregulada y al menos, para la diferenciación osteogénica, mostrar insensibilidad a la sobreexpresión de miembros de dicha cascada. De confirmar estas observaciones en LS-MSc, y en MSc provenientes de otras fuentes, el uso de estas células con fines de trasplante autólogo para revertir la enfermedad no sería alternativa eficaz. A pesar de lo observado, los estudios clínicos con trasplante autólogo de MSc son un procedimiento ampliamente difundido. Una revisión reciente evalúa un total de 17 protocolos de ensayos clínicos en reparación de cartílago en humanos publicados hasta el 2019 utilizando MSc. De esos 17 protocolos 14 estudios utilizaron células autólogas, mientras que 3 utilizaron células alogénicas (Ha, C. W. *et al.*, 2019). De esta recopilación se concluye que las MSc intraarticulares proporcionan mejoras en el dolor y la función en la artrosis de rodilla en el seguimiento a corto plazo en muchos casos. Demostrado cierta eficacia de las MSc para la reparación del cartílago en la osteoartritis; sin embargo, la evidencia de la eficacia de las MSc intraarticulares tanto en los resultados clínicos como en la reparación del cartílago sigue siendo limitada. Estos resultados podrían ser explicados por el bajo porcentaje de ensayos clínicos utilizando trasplantes alogénicos y la ausencia de protocolos comparando ambas fuentes de trasplante. A su vez es de destacar que ningún protocolo publicado hasta la actualidad ha estudiado los efectos regenerativos de LS-MSc. Por lo tanto, las observaciones *in vitro* mostradas en esta tesis podrían estar reflejando la falta de efectividad de los trasplantes autólogos para el tratamiento de OA.

Más allá de esto, existen reportes en modelos animales demostrando la eficacia de estas células en trasplantes alogénicos estimulando la reparación de cartílago y hueso en modelos de OA (Miki, S. *et al.*, 2015; Zayed, M. *et al.*, 2018). Recientemente se han establecido los protocolos de laboratorio establecidos según las GMP de aislamiento, caracterización de las MSc obtenidas de membrana

sinovial y producción a gran escala (Fernandes, T. L. *et al.*, 2018; Jorgenson, K. D. *et al.*, 2018), lo que a futuro haría pensar en ensayos clínicos con trasplantes de estas células, así como de LS-MSK.

Conclusiones y perspectivas

1. Conclusiones

- El aislamiento y caracterización de LS-MSC de lavado articular previa artroscopia postraumática, pudo realizarse de forma exitosa.
- El potencial osteogénico de la población de LS-MSC OA fue menor al de la población No-OA en las condiciones evaluadas.
- El potencial condrogénico de la población de LS-MSC OA fue mayor al de la población No-OA en las condiciones estudiadas.
- Los niveles de diferenciación osteogénica y condrogénica correlacionan negativamente con los niveles relativos de ARNm de las tres variantes de *splicing* de TGFBR2 en LS-MSC de individuos No-OA.
- La sobreexpresión de TGFBR2-SE y TGFBR2-SE/Fc en LS-MSC No-OA aumenta los niveles de diferenciación osteogénica *in vitro*.
- La sobreexpresión de TGFBR2-SE en LS-MSC OA disminuye los niveles de diferenciación condrogénica *in vitro*.

2. Perspectivas

- Analizar de manera más exhaustiva el potencial condrogénico de LS-MSC.
- Evaluar en un mayor número de muestras de LS-MSC los efectos generados por la sobreexpresión de TGFBR2-SE y TGFBR2-SE/Fc, sobre el potencial de diferenciación osteogénico y condrogénico.
- Medir y contrastar las citoquinas presentes en cultivos de LS-MSC de pacientes OA con las secretadas por LS-MSC de individuos No-OA.
- Estudiar el efecto de la sobreexpresión de TGFBR2-SE sobre la capacidad inmunomoduladora de las LS-MSC.

Consideraciones finales

En esta tesis se confirma el rol como biomarcador de actividad de AR de las tres variantes de *splicing* de TGFBR2, y se propone a la proteína TGFBR2-SE como biomarcador alternativo y posible blanco terapéutico. Para el caso de LS-MS, si bien el número de muestras de donantes analizados es reducido, los bajos niveles de las variantes de *splicing* de TGFBR2 predicen diferenciación ósea, y en menor medida condrogénica, en individuos sin la enfermedad. Estas relaciones se pierden en la población OA analizada, sin embargo, no representarían un biomarcador de OA. Desde el punto de vista terapéutico, la sobreexpresión de la nueva proteína TGFBR2-SE y su proteína de fusión TGFBR2-SE/Fc son claramente pro-osteogénicas, con mayor injerencia en individuos sin la enfermedad, aunque el potencial de estas proteínas para el tratamiento de la OA debería ser evaluado en mayor detalle empleando modelos experimentales diferentes.

Referencias bibliográficas

- Abadie, E., Ethgen, D., Avouac, B., Bouvenot, G., Branco, J., Bruyere, O., ... Reginster, J. Y. (2004). Recommendations for the use of new methods to assess the efficacy of disease-modifying drugs in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.01.006>.
- Adams, D. H., Hubscher, S. G., Wang, L., Elias, E., & Neuberger, J. M. (1989). Soluble interleukin-2 receptors in serum and bile of liver transplant recipients. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)91368-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(89)91368-8).
- Albro, M. B., Nims, R. J., Cigan, A. D., Yeroushalmi, K. J., Shim, J. J., Hung, C. T., & Ateshian, G. A. (2013). Dynamic mechanical compression of devitalized articular cartilage does not activate latent TGF- β . *Journal of Biomechanics*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.03.006>.
- Allen, J. B. (2004). Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.171.1.231>.
- Allen, K. D., & Golightly, Y. M. (2015). State of the evidence. *Current Opinion in Rheumatology*. <https://doi.org/10.1097/BOR.000000000000161>.
- Altman, R., Alarcón, G., Appelrouth, D., Bloch, D., Borenstein, D., Brandt, K., ... Wolfe, F. (1991). The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.1780340502>
- Altman, R., Alarcon, G., Appelrouth, D., Bloch, D., Borenstein, K., Brandt, K., ... Wolfe, F. (1990). the American College of Rheumatology Reporting O F Osteoarthritis of the Hand. *Arthritis & Rheumatism*.
- Altman, R., Asch, E., Bloch, D., Bole, G., Borenstein, D., Brandt, K., ... Wolfe, F. (1986). Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: Classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.1780290816>.
- Arias, M., Sauer-Lehnen, S., Treptau, J., Janoschek, N., Theuerkauf, I., Buettner, R., ... Weiskirchen, R. (2003). Adenoviral expression of a transforming growth factor- β 1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-3-29>.
- Ashcroft, G. S. (1999). Bidirectional regulation of macrophage function by TGF- β . *Microbes and Infection*. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(99\)00257-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(99)00257-9).
- Ashraf, S., & Walsh, D. A. (2008). Angiogenesis in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e3283103d12>.
- Assoian, R. K., Komoriya, A., Meyers, C. A., Miller, D. M., & Sporn, M. B. (1983). Transforming growth factor- β in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*.
- Baardsnes, J., Hinck, C. S., Hinck, A. P., & O'Connor-McCourt, M. D. (2009). T β R-II discriminates the high- and low-affinity TGF- β isoforms via two hydrogen-bonded ion Pairs. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi8019004>.
- Baboolal, T. G., Boxall, S. A., Churchman, S. M., Buckley, C. T., Jones, E., & McGonagle, D. (2014). Intrinsic multipotential mesenchymal stromal cell activity in gelatinous Heberden's nodes in osteoarthritis at clinical presentation. *Arthritis Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/ar4574>.
- Baboolal, T. G., Mastbergen, S. C., Jones, E., Calder, S. J., Lafeber, F. P. J. G., & McGonagle, D. (2016). Synovial fluid hyaluronan mediates MSC Attachment to cartilage, a potential novel mechanism contributing to

- cartilage repair in osteoarthritis using knee joint distraction. *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-206847>.
- Bakker, A. C., van de Loo, F. A. J., van Beuningen, H. M., Sime, P., van Lent, P. L. E. M., van der Kraan, P. M., ... van den Berg, W. B. (2001). Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: Evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1053/joca.2000.0368>.
- Barcellos-de-Souza, P., Comito, G., Pons-Segura, C., Taddei, M. L., Gori, V., Becherucci, V., ... Chiarugi, P. (2016). Mesenchymal Stem Cells are Recruited and Activated into Carcinoma-Associated Fibroblasts by Prostate Cancer Microenvironment-Derived TGF- β 1. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.2412>.
- Barcellos-de-Souza, P., Comito, G., Pons-Segura, C., Taddei, M. L., Gori, V., Becherucci, V., ... Chiarugi, P. (2016). Mesenchymal Stem Cells are Recruited and Activated into Carcinoma-Associated Fibroblasts by Prostate Cancer Microenvironment-Derived TGF- β 1. *STEM CELLS*. <https://doi.org/10.1002/stem.2412>.
- Barcellos-Hoff, M. H., & Dix, T. A. (1996). Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/mend.10.9.8885242>.
- Bellamy, N., Buchanan, W. W., Goldsmith, C. H., Campbell, J., & Stitt, L. W. (1988). Validation study of WOMAC: A health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *Journal of Rheumatology*.
- Bellamy, N., Campbell, J., Haraoui, B., Gercz-Simon, E., Buchbinder, R., Hobby, K., & MacDermid, J. C. (2002). Clinimetric properties of the AUSCAN osteoarthritis hand index: An evaluation of reliability, validity and responsiveness. *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1053/joca.2002.0838>.
- Bellone, G., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G., & Rodeck, U. (1995). Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Berse, B., Hunt, J. A., Diegel, R. J., Morganelli, P., Yeo, K., Brown, F., & Fava, R. A. (1999). Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta (TGF-beta) and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clinical and experimental immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00775>.
- Bertolio, M., Rodríguez, T., Velasco Zamora, J., Perone, M. & Dewey R. (2018). TGFBR2-SE, a new soluble human TGF- β type II receptor isoform, is sumoylated, interacts with cytoplasmic and nuclear proteins, and is secreted on exosomes. LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). *MEDICINA – Vol. 78 (Supl. 3), p. 158*.
- Bira, Y., Tani, K., Nishioka, Y., Miyata, J., Sato, K., Hayashi, A., ... Sone, S. (2005). Transforming growth factor β stimulates rheumatoid synovial fibroblasts via the type II receptor. *Modern Rheumatology*. <https://doi.org/10.1007/s10165-004-0378-2>.
- Birnbaum, T., Hildebrandt, J., Nuebling, G., Sostak, P., & Straube, A. (2007). Glioblastoma-dependent differentiation and angiogenic potential of human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Neuro-Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s11060-011-0561-1>.
- Brand, T., Robb MacLellan, W., & Schneider, M. D. (1993). A dominant-negative receptor for type II transforming growth factors created by deletion of the kinase domain. *Journal of Biological Chemistry*.

- Brandes, M. E., Mai, U. E., Ohura, K., & Wahl, S. M. (1991). Type I transforming growth factor-beta receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor-beta. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Brennan, F., & Beech, J. (2007). Update on cytokines in rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*. <https://doi.org/10.1097/BOR.0b013e32805e87f1>.
- Brown, C. B., Boyer, A. S., Runyan, R. B., & Barnett, J. V. (1999). Requirement of type III TGF- β receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.283.5410.2080>.
- Buckley, C. D., Amft, N., Bradfield, P. F., Pilling, D., Ross, E., Arenzana-Seisdedos, F., ... Salmon, M. (2000). Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Burgkart, R., Glaser, C., Hyhlik-Dürr, A., Englmeier, K. H., Reiser, M., & Eckstein, F. (2001). Magnetic Resonance Imaging-Based Assessment of Cartilage Loss in Severe Osteoarthritis: Accuracy, Precision, and Diagnostic Value. *Arthritis and Rheumatism*. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200109\)44:9<2072::AID-ART357>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200109)44:9<2072::AID-ART357>3.0.CO;2-3).
- Campbell, T. M., Churchman, S. M., Gomez, A., McGonagle, D., Conaghan, P. G., Ponchel, F., & Jones, E. (2016). Mesenchymal Stem Cell Alterations in Bone Marrow Lesions in Patients With Hip Osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*. <https://doi.org/10.1002/art.39622>.
- Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.20886>.
- Cárcamo, J., Zentella, A., & Massagué, J. (1995). Disruption of transforming growth factor beta signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.3.1573>.
- Czac, B. B., & Roes, J. (2000). TGF- β receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity*. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)00044-3).
- Centola, M., Cavet, G., Shen, Y., Ramanujan, S., Knowlton, N., Swan, K. A., ... Curtis, J. R. (2013). Development of a Multi-Biomarker Disease Activity Test for Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060635>.
- Chang, H., Brown, C. W., & Matzuk, M. M. (2002). Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2002-0003>.
- Chaparro Del Moral, R., Rillo, O. L., Casalla, L., Zárate, L., Pérez Dávila, A., & Scheines, E. (2010). Validation of an argentinian version of the "western ontario and Mc master universities" (WOMAC) LK3.1 short form questionnaire in knee osteoarthritis. *Journal of Clinical Rheumatology*.
- Cheeti, A., & Ramphul, K. (2018). *Arthritis, Reactive (Reiter Syndrome)*. *StatPearls*.
- Chen, R. H., Ebner, R., & Derynck, R. (1993). Inactivation of the type II receptor reveals two receptor pathways for the diverse TGF- β activities. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.8388126>.
- Chen, R., Mian, M., Fu, M., Zhao, J. Y., Yang, L., Li, Y., & Xu, L. (2015). Attenuation of the progression of articular cartilage degeneration by inhibition of TGF- β 1 signaling in a mouse model of osteoarthritis. *American Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.07.003>.

- Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., Li, L., Marinos, N., ... Wahl, S. M. (2003). Conversion of Peripheral CD4 + CD25 – Naive T Cells to CD4 + CD25 + Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20030152>.
- Cheon, H., Yu, S. J., Yoo, D. H., Chae, I. J., Song, G. G., & Sohn, J. (2002). Increased expression of pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase-1 by TGF- β 1 in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis and normal individuals. *Clinical and Experimental Immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2002.01785>.
- Chu, C. Q., Field, M., Abney, E., Zheng, R. Q., Allard, S., Feldmann, M., & Maini, R. N. (1991). Transforming growth factor- β 1 in rheumatoid synovial membrane and cartilage/pannus junction. *Clin Exp Immunol*.
- Constantin, A., Loubet-Lescoulié, P., Lambert, N., Yassine-Diab, B., Abbal, M., Mazières, B., ... Cantagrel, A. (1998). Antiinflammatory and immunoregulatory action of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis: Evidence of increased interleukin-4 and interleukin-10 gene expression demonstrated in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Arthritis and Rheumatism*. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199801\)41:1<48::AID-ART7>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199801)41:1<48::AID-ART7>3.0.CO;2-K).
- Cottrez, F., & Groux, H. (2001). Regulation of TGF- Response During T Cell Activation Is Modulated by IL-10. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.773>.
- Couchourel, D., Aubry, I., Delalandre, A., Lavigne, M., Martel-Pelletier, J., Pelletier, J. P., & Lajeunesse, D. (2009). Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.24489>.
- Coughlin, T. R., & Kennedy, O. D. (2016). The role of subchondral bone damage in post-traumatic osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/nyas.13261>.
- Crane, J. L., & Cao, X. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI70050>.
- Cross, M., Smith, E., Hoy, D., Nolte, S., Ackerman, I., Fransen, M., ... March, L. (2014). The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204763>.
- Cross, M., Smith, E., Hoy, D., Nolte, S., Ackerman, I., Fransen, M., ... March, L. (2014). The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204763>.
- Cui, J., Stahl, E. A., Saevarsdottir, S., Miceli, C., Diogo, D., Trynka, G., ... Plenge, R. M. (2013). Genome-Wide Association Study and Gene Expression Analysis Identifies CD84 as a Predictor of Response to Etanercept Therapy in Rheumatoid Arthritis. *PLoS Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003394>.
- Cui, Z., Crane, J., Xie, H., Jin, X., Zhen, G., Li, C., ... Cao, X. (2016). Halofuginone attenuates osteoarthritis by inhibition of TGF- β activity and H-type vessel formation in subchondral bone. *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207923>.
- Cusa, M. A., Alsina, G., Papasidero, S. B., Rillo, O., & Converso, G. (2006). Correlation between the auscan index (ai) and strength, dexterity and function tests in patients with primary osteoarthritis of the hand (POAH). *JCR: Journal of Clinical Rheumatology*. <https://doi.org/10.1097/01.rhu.0000226449.72579.27>.
- Day, J. S., Van Der Linden, J. C., Bank, R. A., Ding, M., Hvid, I., Sumner, D. R., & Weinans, H. (2004). Adaptation of subchondral bone in osteoarthritis. *Biorheology*.

- De Bari, C., Dell'Accio, F., & Luyten, F. P. (2001). Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis and Rheumatism*. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200101\)44:1<85::AID-ANR12>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200101)44:1<85::AID-ANR12>3.0.CO;2-6).
- De Crescenzo, G., Hinck, C. S., Shu, Z., Zúñiga, J., Yang, J., Tang, Y., ... Hinck, A. P. (2006). Three key residues underlie the differential affinity of the TGF β isoforms for the TGF β type II receptor. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.022>.
- De Visser, K. E., & Kast, W. M. (1999). Effects of TGF- β on the immune system: Implications for cancer immunotherapy. *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401477>.
- Dean, L. E., Jones, G. T., Macdonald, A. G., Downham, C., Sturrock, R. D., & Macfarlane, G. J. (2014). Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology (United Kingdom)*. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ket387>.
- del Re, E., Babitt, J. L., Pirani, A., Schneyer, A. L., & Lin, H. Y. (2004). In the Absence of Type III Receptor, the Transforming Growth Factor (TGF)- β Type II-B Receptor Requires the Type I Receptor to Bind TGF- β 2. *Journal of Biologcall Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401350200>.
- Denis, M. (1994). Neutralization of transforming growth factor-beta 1 in a mouse model of immune-induced lung fibrosis. *Immunology*.
- Derynck, R., Akhurst, R. J., & Balmain, A. (2001). TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1001-117>.
- Derynck, R.; Choy, L. (1998). Transforming growth factor- β and its receptors. En Thomson, A. ed. *The cytokine handbook*, 3rd edn. San Diego, Academic Press.
- Dewey, R.A., et al. (2014). Isoform of the tgf-beta receptor II. <https://patents.google.com/patent/WO2015095628A1>.
- Di, W. T., Vergara, F., Bertiller, E., De Los Angeles Gallardo, M., Gandino, I., Scolnik, M., ... Soriano, E. R. (2016). Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis in a health management organization in Argentina: A 15-year Study. *Journal of Rheumatology*. <https://doi.org/10.3899/jrheum.151262>.
- Dominical, V. M., Bértolo, M. B., Almeida, C. B., Garrido, V. T., Miguel, L. I., Costa, F. F., & Conran, N. (2011). Neutrophils of Rheumatoid Arthritis Patients on Anti-TNF- α Therapy and in Disease Remission Present Reduced Adhesive Functions in Association with Decreased Circulating Neutrophil-Attractant Chemokine Levels. *Scandinavian Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02503>.
- Dreiser, R. L., Maheu, E., & Guillou, G. B. (2000). Sensitivity to change of the functional index for hand osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1053/joca.2000.0332>.
- Dudics, V., Kunstár, A., Kovács, J., Lakatos, T., Géher, P., Gömör, B., ... Uher, F. (2009). Chondrogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: Measurements in a microculture system. *Cells Tissues Organs*. <https://doi.org/10.1159/000140679>.
- Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., & Miyazono, K. (2001). Smurf1 Interacts with Transforming Growth Factor- β Type I Receptor through Smad7 and Induces Receptor Degradation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100008200>.

- Edwards, D. R., Leco, K. J., Beaudry, P. P., Atadja, P. W., Veillette, C., & Riabowol, K. T. (1996). Differential effects of transforming growth factor- β 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Experimental Gerontology*. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(95\)02010-1](https://doi.org/10.1016/0531-5565(95)02010-1).
- Elkord, E., Williams, P. E., Kynaston, H., & Rowbottom, A. W. (2005). Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02076>.
- Ezquerro, I. J., Lasarte, J. J., Dotor, J., Castilla-Cortázar, I., Bustos, M., Peñuelas, I., ... Borrás-Cuesta, F. (2003). A synthetic peptide from transforming growth factor β type III receptor inhibits liver fibrogenesis in rats with carbon tetrachloride liver injury. *Cytokine*. [https://doi.org/10.1016/S1043-4666\(03\)00101-7](https://doi.org/10.1016/S1043-4666(03)00101-7).
- Fan, X., Valdimarsdottir, G., Larsson, J., Brun, A., Magnusson, M., Jacobsen, S. E., ... Karlsson, S. (2002). Transient Disruption of Autocrine TGF- β Signaling Leads to Enhanced Survival and Proliferation Potential in Single Primitive Human Hemopoietic Progenitor Cells. *The Journal of Immunology*, 168(2), 755 LP – 762. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.2.755>.
- Fang, P. K., Ma, X. C., Ma, D. L., & Fu, K. Y. (1999). Determination of interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-10, and transforming growth factor- β 1 in synovial fluid aspirates of patients with temporomandibular disorders. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(99\)90009-5](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(99)90009-5).
- Fava, R. A., Olsen, N. J., Postlethwaite, A. E., Broadley, K. N., Davidson, J. M., Nanney, L. B., ... Townes, A. S. (1991). Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *The Journal of Experimental Medicine*.
- Fava, R., Olsen, N., Keski-Oja, J., Moses, H., & Pincus, T. (1989). Active and latent forms of transforming growth factor beta activity in synovial effusions. *The Journal of experimental medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.169.1.291>.
- Fellows, C. R., Williams, R., Davies, I. R., Gohil, K., Baird, D. M., Fairclough, J., ... Khan, I. M. (2017). Characterisation of a divergent progenitor cell sub-populations in human osteoarthritic cartilage: The role of telomere erosion and replicative senescence. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep41421>.
- Fernandes, T. L., Kimura, H. A., Pinheiro, C. C. G., Shimomura, K., Nakamura, N., Ferreira, J. R., ... Bueno, D. F. (2018). Human Synovial Mesenchymal Stem Cells Good Manufacturing Practices for Articular Cartilage Regeneration. *Tissue Engineering Part C: Methods*. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2018.0219>.
- Firestein, G. S., Klippel, J. H., & Dieppe, P. A. (1994). Rheumatoid arthritis and spondyloarthropathy, rheumatoid synovitis and pannus. *Rheumatology*.
- Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. (2005). A well adapted regulatory contrivance: Regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1179>.
- Fransen, J., Creemers, M. C. W., & Van Riel, P. L. C. M. (2004). Remission in rheumatoid arthritis: Agreement of the disease activity score (DAS28) with the ARA preliminary remission criteria. *Rheumatology*. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keh297>.

- Franzén, P., ten Dijke, P., Ichijo, H., Yamashita, H., Schulz, P., Heldin, C. H., & Miyazono, K. (1993). Cloning of a TGF β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF β type II receptor. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90489-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90489-D).
- Frolik, C. A., Dart, L. L., Meyers, C. A., Smith, D. M., & Sporn, M. B. (1983). Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.12.3676>.
- Funck-Brentano T., Cohen-Solal, M. (2015). Subchondral bone and osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*.
- Funovits J., Aletaha, D., Bykerk, V., Combe, B., Dougados, M., Emery, P., Felson, D., Hawker, G., Hazes, J. M., Huizinga, T., Kay, J., Kvien, T. K., Smolen, J. S., Symmons, D., Tak, P. P., & Silman, A. (2010). The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: methodological report phase I. *Annals of Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.130310>.
- Galligan, C. L., Baig, E., Bykerk, V., Keystone, E. C., & Fish, E. N. (2007). Distinctive gene expression signatures in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblast cells: Correlates with disease activity. *Genes and Immunity*. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364400>
- Garone, A., Chaparro del Moral, R. E., Uña, C. R., Casalla, L., & Rillo, O. L. (2008). Validación de una versión Argentina del Cuestionario “WESTERN ONTARIO AND Mc MASTER UNIVERSITIES” (WOMAC) LK 3.1 Abreviado en pacientes con osteoartritis de rodillas. [abstract]. *Revista Argentina de Reumatología*.
- Gatza, C. E., Oh, S. Y., & Blobel, G. C. (2010). Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer. *Cellular Signalling*. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.016>.
- George, J., Roulot, D., Koteliensky, V. E., & Bissell, D. M. (1999). In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: A potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12719>.
- Gerlag, D. M., & Tak, P. P. (2008). Novel approaches for the treatment of rheumatoid arthritis: lessons from the evaluation of synovial biomarkers in clinical trials. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2008.02.002>.
- Gong, D., Shi, W., Yi, S. ju, Chen, H., Groffen, J., & Heisterkamp, N. (2012). TGF β signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-31>.
- Gorelik, L., & Flavell, R. A. (2000). Abrogation of TGF β signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity*. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80170-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80170-3).
- Gorelik, L., & Flavell, R. A. (2002). Transforming growth factor- β in T-cell biology. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri704>.
- Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., & Ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1743>.
- Govinden, R., & Bhoola, K. D. (2003). Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β . *Pharmacology and Therapeutics*. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(03\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(03)00035-4).

- Gray, J. D., Hirokawa, M., Ohtsuka, K., & Horwitz, D. A. (1998). Generation of an inhibitory circuit involving CD8+ T cells, IL-2, and NK cell-derived TGF-beta: contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5213>.
- Gresham, H. D., Ray, C. J., & Sullivan, F. X. (1991). Defective neutrophil function in the autoimmune mouse strain MRL/lpr. Potential role of transforming growth factor-beta. *The Journal of Immunology*. <http://www.jimmunol.org/content/146/11/3911>.
- Groppe, J., Hinck, C. S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J. P., Taylor, A. B., ... Hinck, A. P. (2008). Cooperative Assembly of TGF- β Superfamily Signaling Complexes Is Mediated by Two Disparate Mechanisms and Distinct Modes of Receptor Binding. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.039>.
- Guimond, A., Sulea, T., Pen, A., Ear, P., & O'Connor-McCourt, M. D. (2002). Site-directed mutagenesis of the type II TGF-beta receptor indicates a ligand-binding site distinct from that of the type II activin receptor. *FEBS Letters*. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02378-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02378-5).
- Gutierrez-Roelens, I., Galant, C., Theate, I., Lories, R. J., Durez, P., Nzeusseu-Toukap, A., ... Lauwerys, B. R. (2011). Rituximab treatment induces the expression of genes involved in healing processes in the rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.30292>.
- Ha, C. W., Park, Y. B., Kim, S. H., & Lee, H. J. (2019). Intra-articular Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Clinical Outcomes and Evidence of Cartilage Repair. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2018.07.028>.
- Ha, C. W., Park, Y. B., Kim, S. H., & Lee, H. J. (2019). Intra-articular Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Clinical Outcomes and Evidence of Cartilage Repair. *Arthroscopy - Journal of Arthroscopic and Related Surgery*. <https://doi.org/10.1016/j.arthro.2018.07.028>.
- Halilova, K. I., Brown, E. E., Morgan, S. L., Bridges, S. L., Hwang, M.-H., Arnett, D. K., & Danila, M. I. (2012). Markers of Treatment Response to Methotrexate in Rheumatoid Arthritis: Where Do We Stand? *International Journal of Rheumatology*. <https://doi.org/10.1155/2012/978396>.
- Han, J., Hajjar, D. P., Tauras, J. M., Feng, J., Gotto, A. M., & Nicholson, A. C. (2000). Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 2 decrease expression of CD36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1241>.
- Harris, Q., Seto, J., O'Brien, K., Lee, P. S., Kondo, C., Heard, B. J., ... Krawetz, R. J. (2013). Monocyte chemotactic protein-1 inhibits chondrogenesis of synovial mesenchymal progenitor cells: An in vitro study. *Stem Cells*. <https://doi.org/10.1002/stem.1477>.
- Hart, P. J., Deep, S., Taylor, A. B., Shu, Z., Hinck, C. S., & Hinck, A. P. (2002). Crystal structure of the human T β R2 ectodomain-TGF- β 3 complex. *Nature Structural Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsb766>.
- Hawker, G. A., Davis, A. M., French, M. R., Cibere, J., Jordan, J. M., March, L., ... Dieppe, P. (2008). Development and preliminary psychometric testing of a new OA pain measure--an OARSI/OMERACT initiative. *Osteoarthritis and cartilage*. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.12.015>.
- Hawley, D. J., & Wolfe, F. (1993). Sensitivity to change of the Health Assessment Questionnaire (HAQ) and other clinical and health status measures in rheumatoid arthritis results of short-term clinical trials and

- observational studies versus long-term observational studies. *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.1790050304>.
- Hayami, T., Pickarski, M., Wesolowski, G. A., McLane, J., Bone, A., Destefano, J., ... Duong, L. T. (2004). The Role of Subchondral Bone Remodeling in Osteoarthritis: Reduction of Cartilage Degeneration and Prevention of Osteophyte Formation by Alendronate in the Rat Anterior Cruciate Ligament Transection Model. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.20124>.
- Headland, S. E., Jones, H. R., Norling, L. V., Kim, A., Souza, P. R., Corsiero, E., ... Perretti, M. (2015). Neutrophil-derived microvesicles enter cartilage and protect the joint in inflammatory arthritis. *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac5608>.
- Heredia, M., Pérez Dávila, A., Nitsche, A., Padulo, L., Llanos González, L., & Gómez, L. (2004). Validación al Español en Argentina del Cuestionario WOMAC 3.0 (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index) en pacientes con Osteoartritis de Rodilla y Caderas. *Revista Argentina de Reumatología*.
- Hill, C., Flyvbjerg, A., Rasch, R., Bak, M., & Logan, A. (2001). Transforming growth factor- β 2 antibody attenuates fibrosis in the experimental diabetic rat kidney. *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1700647>.
- Hill, J. (2006). *Rheumatology nursing: a creative approach*. 2nd ed. England, *John Wiley & Sons*.
- Hirai, R., & Fujita, T. (1996). A Human Transforming Growth Factor- β Type II Receptor That Contains an Insertion in the Extracellular Domain. *Experimental Cell Research*. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0066>
- Hogrefe, J. F., Marengo, M. F., Schmeerberger, E. E., Rosemffet, M., Cocco, J. C. M., & Citera, G. (2007). Valor de corte de HAQ para predecir discapacidad laboral en pacientes con artritis reumatoidea. *Rev Arg Reumatol*.
- Hsieh, P.-C., Thanapipatsiri, S., Anderson, P. C., Wang, G.-J., & Balian, G. (2003). Repair of full-thickness cartilage defects in rabbit knees with free periosteal graft preincubated with transforming growth factor. *Orthopedics*.
- Huang, J. S., Wang, Y. H., Ling, T. Y., Chuang, S. S., Johnson, F. E., & Huang, S. S. (2002). Synthetic TGF-beta antagonist accelerates wound healing and reduces scarring. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Hunter, D. J., Zhang, Y. Q., Niu, J. B., Tu, X., Amin, S., Clancy, M., ... Felson, D. T. (2006). The association of meniscal pathologic changes with cartilage loss in symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.21724>.
- Isaka, Y., Akagi, Y., Ando, Y., Tsujie, M., Sudo, T., Ohno, N., ... Imai, E. (1999). Gene therapy by transforming growth factor- β receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney International*. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00275>.
- Jones, E. A., Crawford, A., English, A., Henshaw, K., Mundy, J., Corscadden, D., ... McGonagle, D. (2008). Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: Detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.23485>.

- Jones, E. A., English, A., Henshaw, K., Kinsey, S. E., Markham, A. F., Emery, P., & McGonagle, D. (2004). Enumeration and Phenotypic Characterization of Synovial Fluid Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells in Inflammatory and Degenerative Arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.20203>.
- Jones, S. A., Richards, P. J., Scheller, J., & Rose-John, S. (2005). Review: IL-6 Transsignaling: The In Vivo Consequences. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. <https://doi.org/10.1089/jir.2005.25.241>.
- Jones, S. A., Scheller, J., & Rose-John S. (2011). Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI57158>.
- Jordan, J. M., Helmick, C. G., Renner, J. B., Luta, G., Dragomir, A. D., Woodard, J., ... Hochberg, M. C. (2009). Prevalence of hip symptoms and radiographic and symptomatic hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians: The Johnston County osteoarthritis project. *Journal of Rheumatology*. <https://doi.org/10.3899/jrheum.080677>.
- Jordan, J. M., Kalsbeek, W. D., Hochberg Dragomir, M. C., Woodard, J., Fang, F., Schwartz, T. A., ... Luta, G. (2007). Osteoarthritis Project. osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee. *The Journal of Rheumatology Journal of Rheumatology*.
- Jorgenson, K. D., Hart, D. A., Krawetz, R., & Sen, A. (2018). Production of adult human synovial fluid-derived mesenchymal stem cells in stirred-suspension culture. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2018/8431053>.
- Julià, A., Barceló, M., Erra, A., Palacio, C., & Marsal, S. (2009). Identification of candidate genes for rituximab response in rheumatoid arthritis patients by microarray expression profiling in blood cells. *Pharmacogenomics*. <https://doi.org/10.2217/pgs.09.99>.
- Kaminski, N., Allard, J. D., Pittet, J. F., Zuo, F., Griffiths, M. J., Morris, D., ... Heller, R. A. (2000). Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Kang, Y., Song, J., Kim, D., Ahn, C., Park, S., Chun, C. H., & Jin, E. J. (2015). PCGEM1 stimulates proliferation of osteoarthritic synoviocytes by acting as a sponge for miR-770. *Journal of Orthopaedic Research*. <https://doi.org/10.1002/jor.23046>.
- Karnoub, A. E., Dash, A. B., Vo, A. P., Sullivan, A., Brooks, M. W., Bell, G. W., ... Weinberg, R. A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06188>.
- Karp, J. M., & Leng Teo, G. S. (2009). Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.001>.
- Kehrl, J. H. (1986). Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.163.5.1037>.
- Kehrl, J. H., Roberts, a B., Wakefield, L. M., Jakowlew, S., Sporn, M. B., & Fauci, a S. (1986). Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.

- Kennedy, A., Fearon, U., Veale, D. J., & Godson, C. (2011). Macrophages in synovial inflammation. *Frontiers in Immunology*.
- Kim, M. S., Ahn, S. M., & Moon, A. (2002). In vitro bioassay for transforming growth factor- β using XTT method. *Archives of Pharmacal Research*. <https://doi.org/10.1007/BF02977012>.
- Kinne, R. W., Bräuer, R., Stuhl Müller, B., Palombo-Kinne, E., & Burmester, G. R. (2000). Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*. <https://doi.org/10.1186/ar86>.
- Komesli, S., Vivien, D., & Dutartre, P. (1998). Chimeric extracellular domain of type II transforming growth factor (TGF)- β receptor fused to the Fc region of human immunoglobulin as a TGF- β antagonist. *European Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2540505>.
- Kondou, H., Mushiake, S., Etani, Y., Miyoshi, Y., Michigami, T., & Ozono, K. (2003). A blocking peptide for transforming growth factor- β 1 activation prevents hepatic fibrosis in vivo. *Journal of Hepatology*. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(03\)00377-5](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(03)00377-5).
- Konrad, L., Scheiber, J. A., Völck-Badouin, E., Keilani, M. M., Laible, L., Brandt, H., ... Hofmann, R. (2007). Alternative splicing of TGF-betas and their high-affinity receptors T β RI, T β RII and T β RIII (betaglycan) reveal new variants in human prostatic cells. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-318>.
- Kulkarni, A. B., Huh, C. G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K. C., ... Karlsson, S. (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Kulkarni, A. B., Ward, J. M., Yaswen, L., Mackall, C. L., Bauer, S. R., Huh, C. G., ... Karlsson, S. (1995). Transforming growth factor-beta 1 null mice. An animal model for inflammatory disorders. *The American journal of pathology*.
- Kuo, C. F., Grainge, M. J., Mallen, C., Zhang, W., & Doherty, M. (2015). Rising burden of gout in the UK but continuing suboptimal management: A nationwide population study. *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204463>.
- Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., & Robey, P. G. (2001). Circulating skeletal stem cells. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.1133>.
- La Colla, A., Bertolio, M., Campisano, S., Rodríguez, T., Camara, C., Velasco Zamora, J., Dewey, R. & Chisari, A. (2018). Antifibrotic effect on liver of a novel truncated isoform of the human TGF- β type II receptor Fc-tag protein. LXIII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). *MEDICINA – Vol. 78 (Supl. 3)*, p. 65.
- Lafyatis, R., Thompson, N. L., Remmers, E. F., Flanders, K. C., Roche, N. S., Kim, S. J., ... Wilder, R. L. (1989). Transforming growth factor-beta production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats. Studies on secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Landewé, R., Van Der Heijde, D., Van Der Linden, S., & Boers, M. (2006). Twenty-eight-joint counts invalidate the DAS28 remission definition owing to the omission of the lower extremity joints: A comparison with the original DAS remission. *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.039859>.
- Lawrence, R. C., Helmick, C. G., Arnett, F. C., Deyo, R. A., Felson, D. T., Giannini, E. H., ... Wolfe, F. (1998). Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States.

Arthritis and Rheumatism. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199805\)41:5<778::AID-ART4>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199805)41:5<778::AID-ART4>3.0.CO;2-V).

Lázaro de Mercado, P., Aguilar Conesa, M. D., & Carmona, L. (2007). Guía de Práctica Clínica para el Manejo de la Artritis Reumatoide en España. *Sociedad Española de Reumatología*.

Levine, S. J. (2004). Molecular mechanisms of soluble cytokine receptor generation. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700052200>.

Li, A. G., Wang, D., Feng, X. H., & Wang, X. J. (2004). Latent TGF β 1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600183>.

Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A.-K. L., & Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090737>.

Lin, H. Y., Moustakas, A., Knaus, P., Wells, R. G., Henis, Y. I., & Lodish, H. F. (1995). The Soluble Exoplasmic Domain of the Type II Transforming Growth Factor (TGF)- β Receptor: a heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for tgf- β ligands. *Journal of Biological Chemistry*, 270(6), 2747–2754. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2747>.

Lin, H. Y., Moustakas, A., Knaus, P., Wells, R. G., Henis, Y. I., & Lodish, H. F. (1995). The soluble exoplasmic domain of the type II transforming growth factor (TGF)- β receptor. A heterogeneously glycosylated protein with high affinity and selectivity for TGF- β ligands. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2747>.

Lin, H. Y., Wang, X.-F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R. A., & Lodish, H. F. (1992). Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell*, 68(4), 775–785. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90152-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90152-3).

López-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S., & Massague, J. (1991). Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90073-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90073-8).

López-Casillas, F., Wrana, J. L., & Massagué, J. (1993). Betaglycan presents ligand to the TGF β signaling receptor. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90368-Z](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90368-Z).

Lotz, M., Kekow, J., & Carson, D. A. (1990). Transforming growth factor-beta and cellular immune responses in synovial fluids. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.

Luttmann, W., Franz, P., Matthys, H., & Virchow, J. C. (1998). Effects of TGF- β on eosinophil chemotaxis. *Scandinavian Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1998.00298>.

Machold, K. P., Stamm, T. A., Nell, V. P. K., Pflugbeil, S., Aletaha, D., Steiner, G., ... Smolen, J. S. (2007). Very recent onset rheumatoid arthritis: Clinical and serological patient characteristics associated with radiographic progression over the first years of disease. *Rheumatology*. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel237>.

Madej, W., van Caam, A., Blaney Davidson, E., Buma, P., & van der Kraan, P. M. (2016). Unloading results in rapid loss of TGF β signaling in articular cartilage: role of loading-induced TGF β signaling in maintenance of articular chondrocyte phenotype? *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2016.05.018>.

- Maggard, M., Meng, L., Ke, B., Allen, R., Devgan, L., & Imagawa, D. K. (2001). Antisense TGF- β 2 immunotherapy for hepatocellular carcinoma: Treatment in a rat tumor model. *Annals of Surgical Oncology*. <https://doi.org/10.1245/aso.2001.8.1.32>.
- Makhdom, A. M., & Hamdy, R. C. (2013). The Role of Growth Factors on Acceleration of Bone Regeneration During Distraction Osteogenesis. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0717>.
- Mäkinen, H., Kautiainen, H., Hannonen, P., & Sokka, T. (2005). Is DAS28 an appropriate tool to assess remission in rheumatoid arthritis? *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.037333>.
- Mara, C. S. de, Sartori, A. R., Duarte, A. S., Andrade, A. L. L., Pedro, M. A. C., & Coimbra, I. B. (2011). Periosteum as a source of mesenchymal stem cells: the effects of TGF- β 3 on chondrogenesis. *Clinics*. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011000300022>.
- Marhadour, T., Jousse-Joulin, S., Chalès, G., Grange, L., Hacquard, C., Loeuille, D., ... Saraux, A. (2010). Reproducibility of joint swelling assessments in long-lasting rheumatoid arthritis: Influence on disease activity score-28 values (SEA-repro study part I). *Journal of Rheumatology*. <https://doi.org/10.3899/jrheum.090879>.
- Marinova-Mutafchieva, L., Gabay, C., Funa, K., & Williams, R. O. (2006). Remission of collagen-induced arthritis is associated with high levels of transforming growth factor- β expression in the joint. *Clinical and Experimental Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03204>.
- Massague, J. (1990). The Transforming Growth Factor-Beta Family. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.6.1.597>.
- Massagué, J., & Chen, Y. G. (2000). Controlling TGF- β signaling. *Genes and Development*.
- Massagué, J., Attisano, L., & Wrana, J. L. (1994). The TGF- β family and its composite receptors. *Trends in Cell Biology*. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(94\)90202-X](https://doi.org/10.1016/0962-8924(94)90202-X).
- Matsukura, Y., Muneta, T., Tsuji, K., Koga, H., & Sekiya, I. (2014). Mesenchymal stem cells in synovial fluid increase after meniscus injury. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. <https://doi.org/10.1007/s11999-013-3418-4>.
- Matsumoto, T., Kaneko, T., Seto, M., Wada, H., Kobayashi, T., Nakatani, K., ... Kurosawa, S. (2008). The membrane proteinase 3 expression on neutrophils was downregulated after treatment with infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. <https://doi.org/10.1177/1076029607303961>.
- McCormick, L. L., Zhang, Y., Tootell, E., Gilliam, A. C., Shlomchik, M. J., & Shlomchik, W. D. (1999). Anti-TGF-beta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus-host disease: a model for human scleroderma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5467>.
- McIntyre, T. M., Kehry, M. R., & Snapper, C. M. (1995). Novel in vitro model for high-rate IgA class switching. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Mehta, R., Shah, G., Adler, W., & Kittur, D. (2004). Soluble interleukin 2 receptor (sIL-2R) levels in renal transplant recipients. *Clinical Transplantation*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0012.2004.00221>.

- Mercan, R., Bitik, B., Tufan, A., Bozbulut, U. B., Atas, N., Ozturk, M. A., ... Goker, B. (2016). The Association Between Neutrophil/Lymphocyte Ratio and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis and Ankylosing Spondylitis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(5), 597–601. <https://doi.org/10.1002/jcla.21908>.
- Mieliauskaitė, D., Venalis, P., Dumalakiene, I., Venalis, A., & Distler, J. (2009). Relationship between serum levels of TGF- β 1 and clinical parameters in patients with rheumatoid arthritis and Sjgren's syndrome secondary to rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. <https://doi.org/10.1080/08916930902831977>.
- Miki, S., Takao, M., & Miyamoto, W. (2015). Intra-Articular Injection of Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells with Hyaluronic Acid Can Repair Articular Cartilage Defects in a Canine Model. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. <https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000314>.
- Moniri, M. R., Sun, X.-Y., Rayat, J., Dai, D., Ao, Z., He, Z., ... Warnock, G. L. (2012). TRAIL-engineered pancreas-derived mesenchymal stem cells: characterization and cytotoxic effects on pancreatic cancer cells. *Cancer Gene Therapy*, 19, 652. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/cgt.2012.46>.
- Morales, T. I., Joyce, M. E., Sobel, M. E., Danielpour, D., & Roberts, A. B. (1991). Transforming growth factor- β in calf articular cartilage organ cultures: Synthesis and distribution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90212-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90212-2).
- Moreland, L. W., Weinblatt, M. E., Keystone, E. C., Kremer, J. M., Martin, R. W., Schiff, M. H., ... White, B. W. (1999). Etanercept treatment in adults with established rheumatoid arthritis: 7 Years of clinical experience. *Journal of Rheumatology*.
- Morikawa, M., Derynck, R., & Miyazono, K. (2016). TGF- β and the TGF- β family: Context-dependent roles in cell and tissue physiology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021873>.
- Morito, T., Muneta, T., Hara, K., Ju, Y. J., Mochizuki, T., Makino, H., ... Sekiya, I. (2008). Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology*. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken114>.
- Mulherin, D., Fitzgerald, O., & Bresnihan, B. (1996). Synovial tissue macrophage populations and articular damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.1780390116>.
- Munitz, A., & Levi-Schaffer, F. (2004). Eosinophils: "New" roles for "old" cells. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2003.00442>.
- Muraoka, R. S., Dumont, N., Ritter, C. A., Dugger, T. C., Brantley, D. M., Chen, J., ... Arteaga, C. L. (2002). Blockade of TGF- β inhibits mammary tumor cell viability, migration, and metastases. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI0215234>.
- Murphy, J. M., Fink, D. J., Hunziker, E. B., & Barry, F. P. (2003). Stem Cell Therapy in a Caprine Model of Osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.11365>.
- Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., ... Lang, F. F. (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1874>.
- Nakamura, K., Kitani, A., & Strober, W. (2001). Cell Contact-Dependent Immunosuppression by Cd4⁺CD25⁺Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-Bound Transforming Growth Factor β . *The Journal of Experimental Medicine*, 194(5), 629 LP – 644. <https://doi.org/10.1084/jem.194.5.629>.

- Ogawa, Y., Schmidt, D. K., Dasch, J. R., Chang, R. J., & Glaser, C. B. (1992). Purification and characterization of transforming growth factor-beta 2.3 and -beta 1.2 heterodimers from bovine bone. *Journal of Biological Chemistry*.
- Orbai, A. M., & Bingham, C. O. (2015). Patient Reported Outcomes in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. *Current Rheumatology Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11926-015-0501-8>.
- Osteoarthritis - National clinical guideline for care and management in adults. (2008). <http://www.rcplondon.ac.uk/Pubs/brochure.aspx?e=242>. Royal College of Physicians.
- Park, M.-J., Park, H.-S., Cho, M.-L., Oh, H.-J., Cho, Y.-G., Min, S.-Y., ... Cho, S.-G. (2011). Transforming growth factor β -transduced mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Treg/Th17 cells and osteoclastogenesis. *Arthritis & Rheumatism*, 63(6), 1668–1680. <https://doi.org/10.1002/art.30326>.
- Penn, J. W., Grobelaar, A. O., & Rolfe, K. J. (2012). The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *International Journal of Burns and Trauma*.
- Pers, Y.-M. M., Rackwitz, L., Ferreira, R., Pullig, O., Delfour, C., Barry, F., ... Consortium, A. (2016). Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Translational Medicine*. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0245>.
- Philipp, K., Riedel, F., Germann, G., Hörmann, K., & Sauerbier, M. (2005). TGF-beta antisense oligonucleotides reduce mRNA expression of matrix metalloproteinases in cultured wound-healing-related cells. *International Journal of Molecular Medicine*.
- Pinals, R. S., Masi, A. T., & Larsen, R. A. (1981). Preliminary criteria for clinical remission in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.1780241012>.
- Pincus, T., & Sokka, T. (2003). Quantitative measures for assessing rheumatoid arthritis in clinical trials and clinical care. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*. [https://doi.org/10.1016/S1521-6942\(03\)00077-9](https://doi.org/10.1016/S1521-6942(03)00077-9).
- Prevo, M. L. L., Van'T Hof, M. A., Kuper, H. H., Van Leeuwen, M. A., Van De Putte, L. B. A., & Van Riel, P. L. C. M. (1995). Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.1780380107>.
- Radaev, S., Zou, Z., Huang, T., Lafer, E. M., Hinck, A. P., & Sun, P. D. (2010). Ternary complex of transforming growth factor- β 1 reveals isoform-specific ligand recognition and receptor recruitment in the superfamily. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.079921>.
- Ramey, D. R., Raynauld, J.-P., & Fries, J. F. (1992). The health assessment questionnaire 1992. Status and review. *Arthritis & Rheumatism*, 5(3), 119–129. <https://doi.org/10.1002/art.1790050303>.
- Ranges, G. E. (1987). Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor beta and reversal by recombinant tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.166.4.991>.
- Ranzolin, A., Brenol, J. C. T., Bredemeier, M., Guarienti, J., Rizzatti, M., Feldman, D., & Xavier, R. M. (2009). Association of concomitant fibromyalgia with worse disease activity score in 28 joints, health assessment questionnaire, and short form 36 scores in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care and Research*. <https://doi.org/10.1002/art.24430>.

- Rat, A. C., Coste, J., Pouchot, J., Baumann, M., Spitz, E., Retel-Rude, N., ... Guillemin, F. (2005). OAKHQOL: A new instrument to measure quality of life in knee and hip osteoarthritis. *Journal of Clinical Epidemiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2004.04.011>.
- Rat, A. C., Guillemin, F., & Pouchot, J. (2008). Mapping the osteoarthritis knee and hip quality of life (OAKHQOL) instrument to the international classification of functioning, disability and health and comparison to five health status instruments used in osteoarthritis. *Rheumatology*. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ken352>.
- Rat, A. C., Pouchot, J., Coste, J., Baumann, C., Spitz, E., Retel-Rude, N., ... Guillemin, F. (2006). Development and testing of a specific quality-of-life questionnaire for knee and hip osteoarthritis: OAKHQOL (OsteoArthritis of Knee Hip Quality Of Life). *Joint Bone Spine*. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2006.01.027>.
- Reeves, W. B., & Andreoli, T. E. (2002). Transforming growth factor beta contributes to progressive diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.14.7667>.
- Reinholz, G. G., Fitzsimmons, J. S., Casper, M. E., Ruesink, T. J., Chung, H. W., Schagemann, J. C., & O'Driscoll, S. W. (2009). Rejuvenation of periosteal chondrogenesis using local growth factor injection. *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2008.10.011>.
- Remst, D. F. G., Blaney Davidson, E. N., Vitters, E. L., Bank, R. A., Van Den Berg, W. B., & Van Der Kraan, P. M. (2014). TGF- β induces Lysyl hydroxylase 2b in human synovial osteoarthritic fibroblasts through ALK5 signaling. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1740-5>.
- Robak, T., Gladalska, A., Stepień, H., & Robak, E. (1998). Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1080/09629359890875>.
- Rodríguez, T. M., Saldías, A., Irigo, M., Zamora, J. V., Perone, M. J., & Dewey, R. A. (2015). Effect of TGF- β 1 Stimulation on the Secretome of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *STEM CELLS Translational Medicine*. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0012>.
- Rook, A. H., Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Burlington, D. B., ... Fauci, A. S. (1986). Effects of transforming growth factor beta on the functions of natural killer cells: depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Rotzer, D., Roth, M., Lutz, M., Lindemann, D., Sebald, W., & Knaus, P. (2001). Type III TGF- β receptor-independent signalling of TGF β 2 via T β RII-B, an alternatively spliced TGF- β type II receptor. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.3.480>.
- Rowland-Goldsmith, M. A., Maruyama, H., Kusama, T., Ralli, S., & Korc, M. (2001). Soluble type II transforming growth factor- β (TGF- β) receptor inhibits TGF- β signaling in COLO-357 pancreatic cancer cells in vitro and attenuates tumor formation. *Clinical Cancer Research*.
- Russo, L. M., Brown, D., & Lin, H. Y. (2007). The soluble transforming growth factor- β receptor: Advantages and applications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(3), 472–476. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.01.026>.
- Sahu, P., Pinkalwar, N., Dubey, R., Paroha, S., Chatterjee, S., & Chatterjee, T. (2011). Biomarkers: An Emerging Tool for Diagnosis of a Disease and Drug Development. *Asian J. Res. Pharm.*

- Saito, T., Kinoshita, A., Yoshiura, K. I., Makita, Y., Wakui, K., Honke, K., ... Taniguchi, N. (2001). Domain-specific Mutations of a Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 Latency-associated Peptide Cause Camurati-Engelmann Disease because of the Formation of a Constitutively Active Form of TGF- β 1. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000859200>.
- Sakao, K., Takahashi, K. A., Arai, Y., Saito, M., Honjyo, K., Hiraoka, N., ... Kubo, T. (2009). Asporin and transforming growth factor- β gene expression in osteoblasts from subchondral bone and osteophytes in osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Science*. <https://doi.org/10.1007/s00776-009-1401-4>.
- Sakuma, M., Hatsushika, K., Koyama, K., Katoh, R., Ando, T., Watanabe, Y., ... Nakao, A. (2007). TGF- β type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody. *International Immunology*. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxl128>.
- Sancho, D., Gómez, M., Viedma, F., Esplugues, E., Gordón-Alonso, M., García-López, M. A., ... Sánchez-Madrid, F. (2003). CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor- β production in collagen-induced arthritis. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI200319112>.
- Sanford, L. P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A. C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G. P., ... Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development (Cambridge, England)*.
- Santiago, B., Gutierrez-Cañas, I., Dotor, J., Palao, G., Lasarte, J. J., Ruiz, J., ... Pablos, J. L. (2005). Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor- β 1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23859>.
- Scharstuhl, A., Glansbeek, H. L., van Beuningen, H. M., Vitters, E. L., van der Kraan, P. M., & van den Berg, W. B. (2014). Inhibition of Endogenous TGF- During Experimental Osteoarthritis Prevents Osteophyte Formation and Impairs Cartilage Repair. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.507>.
- Scharstuhl, A., Vitters, E. L., van der Kraan, P. M., & van den Berg, W. B. (2002). Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor β /bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 48(12), 3442–3451. <https://doi.org/10.1002/art.11328>.
- Schlaak, J. F., Pfers, I., Meyer Zum Büschenfelde, K. H., & Märker-Hermann, E. (1996). Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clinical and Experimental Rheumatology*.
- Schlingensiepen, K. H., Jaschinski, F., Lang, S. A., Moser, C., Geissler, E. K., Schlitt, H. J., ... Schneider, A. (2011). Transforming growth factor-beta 2 gene silencing with trabedersen (AP 12009) in pancreatic cancer. *Cancer Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01917>.
- Scotti, L., Franchi, M., Marchesoni, A., & Corrao, G. (2018). Prevalence and incidence of psoriatic arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2018.01.003>.
- Scrivo, R., Di Franco, M., Spadaro, A., & Valesini, G. (2007). The immunology of rheumatoid arthritis. In *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1196/annals.1422.033>.

- Seitz, M., Zwicker, M., & Villiger, P. M. (2003). Pretreatment cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells and serum from patients with rheumatoid arthritis in different American College of Rheumatology response groups to methotrexate. *Journal of Rheumatology*.
- Sekiya, I., Colter, D. C., & Prockop, D. J. (2001). BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4898>.
- Sekiya, I., Ojima, M., Suzuki, S., Yamaga, M., Horie, M., Koga, H., ... Muneta, T. (2012). Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*. <https://doi.org/10.1002/jor.22029>.
- Sergijenko, A., Roelofs, A. J., Riemen, A. H. K., & De Bari, C. (2016). Bone marrow contribution to synovial hyperplasia following joint surface injury. *Arthritis Research and Therapy*. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1060-8>.
- Serra, R., Johnson, M., Filvaroff, E. H., LaBorde, J., Sheehan, D. M., Derynck, R., & Moses, H. L. (1997). Expression of a truncated, kinase-defective TGF- β type II receptor in mouse skeletal tissue promotes terminal chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.2.541>.
- Shen, J., Li, S., & Chen, D. (2014). TGF- β signaling and the development of osteoarthritis. *Bone Research*. <https://doi.org/10.1038/boneres.2014.2>.
- Shi, C., Jia, T., Mendez-Ferrer, S., Hohl, T. M., Serbina, N. V., Lipuma, L., ... Pamer, E. G. (2011). Bone Marrow Mesenchymal Stem and Progenitor Cells Induce Monocyte Emigration in Response to Circulating Toll-like Receptor Ligands. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.02.016>.
- Shi, Y., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00432-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X).
- Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., ... Ren, G. (2010). Mesenchymal stem cells: A new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.44>.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A. I., Shou, P., Rabson, A. B., & Ren, G. (2012). How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.11.004>.
- Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., ... Doetschman, T. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease [14]. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/359693a0>.
- Siegel, P. M., & Massagué, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1208>.
- Siegert, W., Josimovic-Alasevic, O., Schwerdtfeger, R., Baurmann, H., Schmidt, C. A., Much, R., Schmid, H. J., Hartmann, R., Henze, G., & Huhn, D. (1990). Soluble interleukin 2 receptors in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*.
- Siwicka, K. A., Kitoh, H., Kawasumi, M., & Ishiguro, N. (2011). Spatial and temporal distribution of growth factors receptors in the callus: implications for improvement of distraction osteogenesis. *Nagoya J Med Sci*.

- Smith, J. D., Bryant, S. R., Couper, L. L., Vary, C. P. H., Gotwals, P. J., Koteliensky, V. E., & Lindner, V. (1999). Soluble transforming growth factor- β type II receptor inhibits negative remodeling, fibroblast transdifferentiation, and intimal lesion formation but not endothelial growth. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/01.RES.84.10.1212>.
- Smith, M. D., Slavotinek, J., Au, V., Weedon, H., Parker, A., Coleman, M., ... Ahern, M. J. (2001). Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression. *Rheumatology*. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/40.9.965>.
- Snapper, C. M., Waegell, W., Beernink, H., & Dasch, J. R. (1993). Transforming growth factor-beta 1 is required for secretion of IgG of all subclasses by LPS-activated murine B cells in vitro. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Souchelnytskyi, S., ten Dijke, P., Miyazono, K., & Heldin, C. H. (1996). Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb01013>.
- Spoettl, T., Hausmann, M., Klebl, F., Dirmeier, A., Klump, B., Hoffmann, J., ... Rogler, G. (2007). Serum soluble TNF receptor I and II levels correlate with disease activity in IBD patients. *Inflammatory Bowel Diseases*. <https://doi.org/10.1002/ibd.20107>.
- Summers, K. L., O'Donnell, J. L., Heiser, A., Highton, J., & Hart, D. N. J. (1999). Synovial fluid transforming growth factor β inhibits dendritic cell-T lymphocyte interactions in patients with chronic arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199904\)42:3<507::AID-ANR16>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199904)42:3<507::AID-ANR16>3.0.CO;2-Y).
- Sun, B. Y., Zhao, B. X., Zhu, J. Y., Sun, Z. P., Shi, Y. A., & Huang, F. (2018). Role of TGF- β 1 expressed in bone marrow-derived mesenchymal stem cells in promoting bone formation in a rabbit femoral defect model. *International Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3692>.
- Suri, S., Gill, S. E., De Camin, S. M., Wilson, D., McWilliams, D. F., & Walsh, D. A. (2007). Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.063354>.
- Suzuki, C., Murakami, G., Fukuchi, M., Shimanuki, T., Shikauchi, Y., Imamura, T., & Miyazono, K. (2002). Smurf1 regulates the inhibitory activity of Smad7 by targeting Smad7 to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201901200>.
- Suzuki, E., Kapoor, V., Cheung, H. K., Ling, L. E., DeLong, P. A., Kaiser, L. R., & Albelda, S. M. (2004). Soluble type II transforming growth factor- β receptor inhibits established murine malignant mesothelioma tumor growth by augmenting host antitumor immunity. *Clinical Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0611>.
- Szekanecz, Z., Haines, G. K., Harlow, L. A., Shah, M. R., Fong, T. W., Fu, R., ... Koch, A. E. (1995). Increased Synovial Expression of Transforming Growth Factor (TGF)- β Receptor Endoglin and TGF- β 1 in Rheumatoid Arthritis: Possible Interactions in the Pathogenesis of the Disease. *Clinical Immunology and Immunopathology*. <https://doi.org/10.1006/clin.1995.1114>.
- Tak, P. P., Smeets, T. J. M., Daha, M. R., Kluin, P. M., Meijers, K. A. E., Brand, R., ... Breedveld, F. C. (1997). Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.1780400206>.

- Taketazu, F., Kato, M., Gobl, A., Ichijo, H., ten, D. P., Itoh, J., ... (1994). Enhanced expression of transforming growth factor-beta s and transforming growth factor-beta type II receptor in the synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Lab Invest*.
- Tan, H. B., Giannoudis, P. V., Boxall, S. A., McGonagle, D., & Jones, E. (2015). The systemic influence of platelet-derived growth factors on bone marrow mesenchymal stem cells in fracture patients. *BMC Medicine*. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0202-6>.
- Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., Shi, Z., ... Cao, X. (2009). TGF-B1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.1979>.
- Thieblemont, N., Wright, H. L., Edwards, S. W., & Witko-Sarsat, V. (2016). Human neutrophils in autoimmunity. *Seminars in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2016.03.004>.
- Thiele, K., Huscher, D., Bischoff, S., Späthling-Mestekemper, S., Backhaus, M., ... Aringer, M. (2013). Performance of the 2011 ACR/EULAR preliminary remission criteria compared with DAS28 remission in unselected patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 72(7), 1194 LP – 1199. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201821>.
- Thorbecke, G. J., Shah, R., Leu, C. H., Kuruvilla, A. P., Hardison, A. M., & Palladino, M. A. (1992). Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7375>.
- Tridandapani, S., Wardrop, R., Baran, C. P., Wang, Y., Opalek, J. M., Caligiuri, M. A., & Marsh, C. B. (2003). TGF- 1 Suppresses Myeloid Fc Receptor Function by Regulating the Expression and Function of the Common -Subunit. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.9.4572>.
- Turner, M., Chantry, D., & Feldmann, M. (1990). Transforming growth factor β induces the production of interleukin 6 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(90\)90018-O](https://doi.org/10.1016/1043-4666(90)90018-O).
- Uhlig, T., Kvien, T. K., & Pincus, T. (2009). Test-retest reliability of disease activity core set measures and indices in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/ard.2008.097345>.
- Uslu, A. U., Küçük, A., Şahin, A., Ugan, Y., Yılmaz, R., Güngör, T., ... Küçükşen, S. (2015). Two new inflammatory markers associated with Disease Activity Score-28 in patients with rheumatoid arthritis: Neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio. *International Journal of Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12582>.
- Valle, Y., Ledezma-Lozano, I. Y., Torres-Carrillo, N., Padilla-Gutiérrez, J. R., Navarro-Hernández, R. E., Vázquez-Del Mercado, M., ... Muñoz-Valle, J. F. (2009). Circulating TNFRI and TNFRII levels correlated with the disease activity score (DAS28) in rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. <https://doi.org/10.1080/03009740902865456>.
- van Beuningen, H. M., van der Kraan, P. M., Arntz, O. J., & van den Berg, W. B. (1994). Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*.

- Van De Laar, I. M. B. H., Oldenburg, R. A., Pals, G., Roos-Hesselink, J. W., De Graaf, B. M., Verhagen, J. M. A., ... Bertoli-Avella, A. M. (2011). Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng.744>.
- Van Der Heijde, D. M. F. M. (1995). Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (United Kingdom)*. https://doi.org/10.1093/rheumatology/XXXIV.suppl_2.74.
- van der Kraan, P. M. (2018). Differential Role of Transforming Growth Factor-beta in an Osteoarthritic or a Healthy Joint. *Journal of Bone Metabolism*. <https://doi.org/10.11005/jbm.2018.25.2.65>.
- van der Kraan, P. M., & van den Berg, W. B. (2007). Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis and Cartilage*, 15(3), 237–244. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2006.11.006>.
- van Gestel, A. M., Anderson, J. J., van Riel, P. L., Boers, M., Haagsma, C. J., Rich, B., ... Felson, D. T. (1999). ACR and EULAR improvement criteria have comparable validity in rheumatoid arthritis trials. American College of Rheumatology European League of Associations for Rheumatology. *The Journal of Rheumatology*.
- Wahl, S. M. (1993). Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor beta. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.177.1.225>.
- Wahl, S. M., Allen, J. B., Weeks, B. S., Wong, H. L., & Klotman, P. E. (1993). Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.10.4577>
- Wahl, S. M., Hunt, D. A., Wakefield, L. M., McCartney-Francis, N., Wahl, L. M., Roberts, A. B., & Sporn, M. B. (1987). Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.16.5788>.
- Wang, Q., Tan, Q. Y., Xu, W., Qi, H. B., Chen, D., Zhou, S., ... Chen, L. (2017). Cartilage-specific deletion of Alk5 gene results in a progressive osteoarthritis-like phenotype in mice. *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2017.07.010>.
- Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., & Shi, Y. F. (2013). Mesenchymal stem cells: A new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. <https://doi.org/10.1038/aps.2013.50>.
- Weinmann, P., Moura, R. A., Caetano-Lopes, J. R., Pereira, P. A., Canhão, H., Queiroz, M. V., & Fonseca, J. E. (2007). Delayed neutrophil apoptosis in very early rheumatoid arthritis patients is abrogated by methotrexate therapy. *Clinical and Experimental Rheumatology*.
- Wieser, R., Attisano, L., Wrana, J. L., & Massagué, J. (1993). Signaling activity of transforming growth factor beta type II receptors lacking specific domains in the cytoplasmic region. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.12.7239>.
- Wolfe, F., & Sharp, J. T. (1998). Radiographic outcome of recent-onset rheumatoid arthritis. A 19-year study of radiographic progression. *Arthritis and Rheumatism*. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(199809\)41:9<1571::AID-ART7>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1529-0131(199809)41:9<1571::AID-ART7>3.0.CO;2-R).
- Wood, J. A., Chung, D.-J., Park, S. A., Zwingenberger, A. L., Reilly, C. M., Ly, I., ... Murphy, C. J. (2012). Periocular and Intra-Articular Injection of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: An In Vivo Imaging and Migration Study. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1089/jop.2011.0166>.

- Wrana, J. L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., ... Massagué, J. (1992). TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90395-S](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90395-S).
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., & Massagué, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF- β receptor. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/370341a0>.
- Wrana, J. L., Tran, H., Attisano, L., Arora, K., Childs, S. R., Massagué, J., & O'Connor, M. B. (1994). Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.14.2.944>.
- Wright, H. L., Chikura, B., Bucknall, R. C., Moots, R. J., & Edwards, S. W. (2011). Changes in expression of membrane TNF, NF- κ B activation and neutrophil apoptosis during active and resolved inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/ard.2010.138065>.
- Wright, H. L., Makki, F. A., Moots, R. J., & Edwards, S. W. (2016). Low-density granulocytes: functionally distinct, immature neutrophils in rheumatoid arthritis with altered properties and defective TNF signalling. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1189/jlb.5a0116-022r>.
- Wright, H. L., Moots, R. J., & Edwards, S. W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.80>.
- Wright, H. L., Thomas, H. B., Moots, R. J., & Edwards, S. W. (2013). RNA-Seq Reveals Activation of Both Common and Cytokine-Specific Pathways following Neutrophil Priming. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058598>.
- Wu, Q., Kim, K. O., Sampson, E. R., Chen, D., Awad, H., O'Brien, T., ... Rosier, R. N. (2008). Induction of an osteoarthritis-like phenotype and degradation of phosphorylated Smad3 by Smurf2 in transgenic mice. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.23946>.
- Xie, L., Tintani, F., Wang, X., Li, F., Zhen, G., Qiu, T., ... Cao, X. (2016). Systemic neutralization of TGF- β attenuates osteoarthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/nyas.13000>.
- Xu, C., Yu, P., Han, X., Du, L., Gan, J., Wang, Y., & Shi, Y. (2014). TGF- Promotes Immune Responses in the Presence of Mesenchymal Stem Cells. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302164>.
- Yamashita, H., Ten Dijke, P., Franzén, P., Miyazono, K., & Heldin, C. H. (1994). Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor- β . *Journal of Biological Chemistry*.
- Yang, Y. A., Dukhanina, O., Tang, B., Mamura, M., Letterio, J. J., MacGregor, J., ... Wakefield, L. M. (2002). Lifetime exposure to a soluble TGF- β antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI200215333>.
- Yu, F., Dong, Y., Yang, Y. W., Lin, P. T., Yu, H. H., Sun, X., ... Chen, J. H. (2016). Effect of an experimental direct pulp-capping material on the properties and osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep34713>.

- Yubo, M., Yanyan, L., Li, L., Tao, S., Bo, L., & Lin, C. (2017). Clinical efficacy and safety of mesenchymal stem cell transplantation for osteoarthritis treatment: A meta-analysis. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175449>.
- Zayed, M., Newby, S., Misk, N., Donnell, R., & Dhar, M. (2018). Xenogenic Implantation of Equine Synovial Fluid-Derived Mesenchymal Stem Cells Leads to Articular Cartilage Regeneration. *Stem Cells International*. <https://doi.org/10.1155/2018/1073705>.
- Zgoda, M., Paczek, L., Bartłomiejczyk, I., Sieminska, J., Chmielewski, D., & Górecki, A. (2005). Transforming growth factor- β 1, interleukin-1 β and collagenase activity in subchondral bone of the femur and the severity of osteoarthritis of the hip [1]. *Clinical and Experimental Rheumatology*.
- Zhang, P., Zhong, Z. H., Yu, H. T., & Liu, B. (2015). Exogenous expression of IL-1Ra and TGF- β 1 promotes in vivo repair in experimental rabbit osteoarthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology*. <https://doi.org/10.3109/03009742.2015.1009942>.
- Zhang, W., Doherty, M., Leeb, B. F., Alekseeva, L., Arden, N. K., Bijlsma, J. W., ... Zimmermann-Górska, I. (2007). EULAR evidence based recommendations for the management of hand osteoarthritis: Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCSIT). *Annals of the Rheumatic Diseases*. <https://doi.org/10.1136/ard.2006.062091>.
- Zhang, W., Moskowitz, R. W., Nuki, G., Abramson, S., Altman, R. D., Arden, N., ... Tugwell, P. (2007). OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part I: Critical appraisal of existing treatment guidelines and systematic review of current research evidence. *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.06.014>.
- Zhang, W., Moskowitz, R. W., Nuki, G., Abramson, S., Altman, R. D., Arden, N., ... Tugwell, P. (2008). OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis and Cartilage*. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.12.013>.
- Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- β signaling. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.328>.
- Zhang, Y., Niu, J., Kelly-Hayes, M., Chaisson, C. E., Aliabadi, P., & Felson, D. T. (2002). Prevalence of symptomatic hand osteoarthritis and its impact on functional status among the elderly: The framingham study. *American Journal of Epidemiology*. <https://doi.org/10.1093/aje/kwf141>.
- Zhao, W., Wang, T., Luo, Q., Chen, Y., Leung, V. Y. L., Wen, C., ... Lu, W. W. (2016). Cartilage degeneration and excessive subchondral bone formation in spontaneous osteoarthritis involves altered TGF- β signaling. *Journal of Orthopaedic Research*. <https://doi.org/10.1002/jor.23079>.
- Zhen, G., Wen, C., Jia, X., Li, Y., Crane, J. L., Mears, S. C., ... Cao, X. (2013). Inhibition of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.3143>.
- Zielinski, S., Bartels, K., Cebulski, K., Kühne, C., & Kekow, J. (2002). Evidence of proteolytic activation of transforming growth factor beta in synovial fluid. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/0-306-46826-3_48.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., & Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *Journal of Virology*.

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., ... Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*. <https://doi.org/10.1089/107632701300062859>.

Esta version de la tesis corresponde a la última versión de la tesis e incluye las correcciones de los jurados.



Preisegger Matias Adan



Dewey Ricardo Alfredo