

# Artritis Reumatoidea y TGF $\beta$

Ricardo A. DEWEY\*, José LuíS VELASCO ZAMORA†, Alejandra CARREA\*,  
Tania M. RODRÍGUEZ\*, Marcelo J. PERONE‡, Jorge VELASCO ZAMORA†.

\*Laboratorio de Terapia Génica y Células Madre, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), CONICET-UNSAM.

†Servicio de Reumatología, Instituto Médico CER, Quilmes, Argentina.

‡Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular, IFIBYNE-CONICET, FCEN-UBA e Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires-CONICET-Instituto Partner de la Sociedad Max Planck.

## Autor para correspondencia

Dr. Ricardo A. Dewey.

Avenida Intendente Marino  
km 8,2 7130, Chascomús,  
Pcia. de Buenos Aires.

ricardodewey@intech.gov.ar

Recibido: 19/09/2011

Aceptado: 22/09/2011

**RESUMEN** La artritis reumatoidea (AR) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones con su consiguiente deterioro estructural. Las diversas poblaciones de glóbulos blancos, incluyendo monocitos/macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y linfocitos, contribuyen al daño estructural de las articulaciones. Existen evidencias que la citoquina pleiotrópica TGF- $\beta$  y sus receptores actúan como un potente regulador de los eventos inflamatorios, en el tejido sinovial de AR. De modo adicional, los niveles aumentados de TGF- $\beta$ 1 encontrados en el microambiente sinovial de pacientes con AR, además de producir inflamación, parecen afectar el potencial regenerativo de las células madre mesenquimales presentes en el líquido sinovial. En la presente revisión queda en evidencia que a pesar de que son necesarios estudios adicionales, la modulación de TGF- $\beta$  y sus receptores en pacientes con AR, podría ofrecer una alternativa terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad.

**PALABRAS CLAVE:** Citoquinas, leucocitos, células madre, inflamación, enfermedades autoinmunes.

## Rheumatoid arthritis and TGF $\beta$

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic inflammation of the joints with structural deterioration. Different subpopulations of white blood cells, including monocytes/macrophages, dendritic cells, neutrophils and lymphocytes, directly contribute to the damage of the articulations. Evidences indicate that the pleiotropic cytokine TGF- $\beta$  and its receptors act as a potent regulator of inflammation in RA synovial tissue. In addition to the increased inflammation, high levels of TGF- $\beta$ 1 in the RA synovial microenvironment, seem to affect the regenerative potential of Synovial Fluid Mesenchymal Stem Cells (SF-MSCs). Although further in depth studies must be performed, in this review, evidences are given that modulation of TGF- $\beta$  and receptors in RA patients could offer an alternative therapeutic strategy for the treatment of the disease.

**KEY WORDS:** Cytokines, leucocytes, stem cells, inflammation, autoimmune diseases.

La artritis reumatoidea (AR) es una enfermedad autoinmune, inflamatoria y sistémica. Se caracteriza por la inflamación crónica de las articulaciones conduciendo al daño estructural de las mismas con el consecuente deterioro funcional (1). El compromiso articular en la AR es notable por una excesiva proliferación de células sinoviales, células presentadoras de antígenos y leucocitos, donde los linfocitos T y B median el proceso inflamatorio que contribuye al daño estructural de las articulaciones (2).

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ , en inglés) es una citoquina multifuncional involucrada en la regulación y proliferación de diversos linajes celulares. El TGF- $\beta$  está involucrado en procesos críticos tales como: desarrollo embrionario, diferenciación y maduración celular, cicatrización de heridas y regulación del sistema inmunológico. Este mantiene la homeostasis, actuando como un potente supresor mediante la inhibición de la proliferación, diferenciación y activación de las células del sistema inmune. Paradójicamente y dependiendo del microambiente celular, el TGF- $\beta$  puede desarrollar también, propiedades pro-inflamatorias (3).

El TGF- $\beta$  ha sido involucrado en la patogenia de diversas enfermedades. En infecciones, protege contra daños colaterales producto de la activación del sistema inmune, pero también promueve la evasión inmune y las infecciones crónicas. En cáncer, el TGF- $\beta$  es un potente inhibidor de la proliferación celular y actúa como un supresor tumoral en el comienzo de la enfermedad neoplásica. Sin embargo, y una vez que las células se hacen resistentes al TGF- $\beta$ , esta citoquina puede facilitar el desarrollo de la enfermedad tumoral a través de promoción de la evasión inmune y la angiogénesis. En asma, se ha demostrado que promueve la tolerancia alérgica, pero juega un rol perjudicial en la remodelación irreversible de las vías aéreas (3). Debido a su amplio rol en la patogenia de diversas enfermedades, TGF- $\beta$  se ha convertido en un objetivo promisorio para el desarrollo de nuevos tratamientos, incluyendo cáncer, fibrosis, asma y enfermedades autoinmunes.

La superfamilia de TGF- $\beta$  se compone de más de 40 miembros incluyendo activinas (A, B), proteínas morfogénicas óseas (BMP 1-20) y factores de diferenciación de crecimiento (GDF), entre otros. Tres miembros del TGF- $\beta$  están presentes en mamíferos (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3). Ellos tienen funciones similares pero se expresan en diferentes tejidos (4). TGF- $\beta$ 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 más extensamente. Los fenotipos resultantes del *knockout* de las tres isoformas de mamíferos son muy diferentes y no se superponen. Ratones *knockout* para TGF- $\beta$ 1 presentan una enfermedad similar a la autoinmune (5). Ratones *knockout* para TGF- $\beta$ 2 exhiben mortalidad perinatal y severos defectos de desarrollo (6) y ratones deficientes en TGF- $\beta$ 3 poseen paladar hendido y tienen un desarrollo pulmonar defectivo (7). Esto indica que estos ligandos tienen actividades especifi-

cas y que no pueden ser compensadas por otros miembros de la familia. Recientemente, se han identificado y clonado receptores de los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  (8,9). Dentro del sistema inmune, las isoformas 2 y 3 nos se expresan ubicuamente como el TGF- $\beta$ 1, el que por el contrario, su expresión en estas células da cuenta de su rol en el mantenimiento de la tolerancia del sistema inmune, en especial en el control de la proliferación, diferenciación y activación de las células T (4).

En células de mamíferos, la mayoría de las respuestas a TGF- $\beta$  están mediadas por receptores de superficie del tipo I (T $\beta$ RI) y II (T $\beta$ RII), los cuales se expresan en la mayoría de los tipos celulares y de tejidos (10). El clonado molecular de T $\beta$ RI and T $\beta$ RII (11,12) ha demostrado que son miembros de una familia de proteínas con una pequeña región extracelular, un dominio simple de transmembrana y una región citoplasmática con un dominio serina/treonina quinasa. Entre los dominios quinasa de T $\beta$ RI y T $\beta$ RII existe un 40% de homología (13). Evidencias genéticas de células mutantes resistentes a la acción de TGF- $\beta$  sugieren que tanto el receptor del tipo I como del tipo II son requeridos para la señalización de TGF- $\beta$  (14). La señalización vía TGF- $\beta$ 1 se inicia mediante la unión de TGF- $\beta$ 1 al receptor T $\beta$ RII. T $\beta$ RII es una quinasa constitutivamente activa que se encuentra autofosforilada (15). TGF- $\beta$ 1 se une directamente a T $\beta$ RII; T $\beta$ RI es luego reclutado al complejo y es fosforilado por T $\beta$ RII (16). Una vez ocurrida la unión del ligando al receptor T $\beta$ RII, T $\beta$ RI es reclutado a un complejo de señalización hetero-oligomérico y posteriormente, T $\beta$ RII activa T $\beta$ RI mediante transfosforilación (14). T $\beta$ RI se asocia transitoriamente con proteínas SMAD 2/3 las cuales son fosforiladas en su extremo C-terminal y se disocian del receptor. Estas proteínas SMAD 2/3 forman un complejo con SMAD4 y este complejo es translocado al núcleo para regular la transcripción de una gran cantidad de genes (15). La pérdida de T $\beta$ RII funcional por delección o mutación, resulta en una proliferación celular anormal que se cree que contribuye al fenotipo maligno de ciertos tipos de tumores (16). Se ha demostrado que las tres isoformas de TGF- $\beta$  (1, 2 y 3) transducen sus señales mediante unión a receptores de TGF- $\beta$  tipo I (T $\beta$ RI) y tipo II (T $\beta$ RII) (14). Sin embargo, TGF- $\beta$ 2 parece tener un modo diferente de activación del receptor, ya que T $\beta$ RII posee una afinidad intrínseca muy baja por esta isoforma (alrededor de mil veces menos) (17). El requerimiento de un tercer receptor (T $\beta$ RIII o  $\beta$ -glicano) ha sido descrito en diferentes tipos celulares para que las células respondan a TGF- $\beta$ 2 (18). T $\beta$ RIII une a TGF- $\beta$ 2 y lo presenta a T $\beta$ RII luego de la oligomerización de ambos tipos de receptores (19).

## TGF- $\beta$ 1 durante el proceso de Artritis Reumatoidea

El TGF- $\beta$ 1 ha sido hallado en elevadas concentraciones tanto en el líquido sinovial como en las células derivadas de la

estructura articular de pacientes con AR comparados con controles (20,21-23). Cuando se administra en forma sistémica, el TGF- $\beta$ 1 ha demostrado suprimir el desarrollo de artritis experimental (24). Sin embargo, en otros estudios, la administración intra-articular indujo una artritis aparente, caracterizada por hiperplasia sinovial y reclutamiento de monocitos (25,26). Además, el antagonismo del TGF- $\beta$ 1 pudo bloquear la acumulación de células inflamatorias en un modelo experimental de poliartritis inflamatoria (27). Estos resultados indican que el exceso local de TGF- $\beta$ 1, provocado por la estimulación persistente del sistema inmune, podrían conducir a una inflamación no resuelta contribuyendo a la perpetuación de la lesión inflamatoria de la AR (20). Avalando este mecanismo, existen reportes que confirman el aumento en la expresión de los receptores para TGF- $\beta$ 1 en las células de la unión del cartílago con el pannus, donde ocurre la destrucción articular en la AR (28). EN 1991, Chu y col. demostraron que el 90% de las células del pannus de tejidos sinoviales en pacientes con AR expresaban el TGF- $\beta$ 1 en comparación con muestras de pacientes con osteoartritis y enfermedades autoinmunes (29). Bajo la estimulación con TGF- $\beta$ 1, los fibroblastos sinoviales pueden producir varias moléculas efectoras, incluyendo metaloproteasas, las que están directamente involucradas en la destrucción del hueso y del cartílago en AR. Se sugiere que aquellos polimorfismos con elevada producción de TGF- $\beta$ 1, llevaría a un proceso inflamatorio local suficiente como para acelerar el daño estructural y la progresión radiográfica (20,30,31). Sin embargo, el rol preciso del TGF- $\beta$ 1 en la fisiopatología de la AR es aún controvertido. Brandes y col. han reportado que la administración intraperitoneal del TGF- $\beta$  suprimió tanto la artritis aguda como crónica inducida por fragmentos de pared celular de estreptococo (PCE) en ratas susceptibles así como en artritis inducida por colágeno tipo II en ratones DBA/1 (24). Además la inyección intraperitoneal de un anticuerpo neutralizante del TGF- $\beta$  mejoró la artritis inducida en ratones DBA/1 (32). Estos resultados sugieren que el TGF- $\beta$  tanto el exógeno como endógeno, tienen una actividad anti artrítica. En contraste con estos hallazgos, otros autores han mostrado que la inyección intrarticular de TGF- $\beta$  indujo eritema, tumefacción e infiltración linfocitaria (25,26). Además la inyección intrarticular de anticuerpo neutralizante anti TGF- $\beta$  suprimió la artritis aguda y crónica inducida por PCE (33). Según estos hallazgos, el TGF- $\beta$  tanto exógeno como endógeno actuaría como pro-artrítico. La posible explicación a estos aparentes resultados contradictorios puede deberse a la regulación diferencial de la inflamación.

Diferentes estudios no han podido demostrar una asociación directa entre los niveles séricos de TGF- $\beta$ 1 y las variables clínicas de la enfermedad. Mileliauskaitė y col., han encontrado que las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 fueron mayores en pacientes con AR comparados con sujetos sanos así como aquellos con AR y síndrome de Sjögren (23). Estos resultados son similares a los encontrados por Eriksson y col., quienes reportaron niveles elevados del TGF- $\beta$ 1 en sujetos con AR comparados con pacientes con Sjögren primario (34).

Sin embargo, estos últimos autores no pudieron demostrar una diferencia significativa entre las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 con sujetos sanos. Resultados similares fueron reportados por un estudio reciente, donde se estudiaron 120 sujetos con AR comparados con controles sanos (35). Estos autores reportaron que las concentraciones de TGF- $\beta$ 1 fueron mayores en sueros de pacientes con AR comparados con los controles, pero las diferencias no fueron significativas. Cuando se compararon los niveles del TGF- $\beta$ 1 con las variables clínicas o funcionales de la enfermedad (DAS28; HAQ) encontraron una correlación negativa con las mismas, siendo solo positiva para la clase funcional de acuerdo a la escala de Steinbrocker. De manera similar, el estudio de Mileliauskaitė ha podido correlacionar los niveles del TGF- $\beta$ 1 con una peor clase funcional y no se encontró relación con el DAS28, la velocidad de sedimentación globular o la duración de la enfermedad (23).

## Efecto de TGF- $\beta$ sobre leucocitos en AR.

Las citoquinas inflamatorias tales como interleuquina-1 $\alpha$  y  $\beta$  (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-SCF, por sus siglas en inglés) e IL-6 son todas producidas por la membrana sinovial de pacientes con AR (36-38). También parece haber una respuesta anti-inflamatoria compensadora en esas membranas que incluye el receptor de IL-1 (IL-1R $\alpha$ ) (39), receptores solubles del TNF $\alpha$  (40,41), IL-4 (36), IL-10 (36) y TGF- $\beta$  (22). El establecimiento de sinovitis crónica involucra el tráfico de células inflamatorias circulantes hacia y a través de la membrana sinovial (42,43) reguladas por moléculas de adhesión celular, las cuales son, a su turno, reguladas por citoquinas pro-inflamatorias.

Los macrófagos parecen tener un rol central en AR ya que están presentes en grandes cantidades tanto en la membrana sinovial inflamada como en la unión del cartílago con el pannus (44). Szekanecz y col. (22) encontraron que TGF- $\beta$ 1 está presente en el 63% de las células de revestimiento (*lining cells*), 43% de macrófagos intersticiales y 48% de células vasculares endoteliales en el tejido sinovial (TS) de AR, pero sólo en unas pocas células del TS normal y en osteoartritis (OA). Por lo tanto, TGF- $\beta$ 1 actuaría como un potente regulador de los eventos inflamatorios, fibróticos y angiogénicos en el TS de AR. Además, la expresión de algunos epitopes de endoglina, un receptor de TGF- $\beta$ 1 y - $\beta$ 3, se vio aumentada en macrófagos y células de revestimiento (*lining cells*) del TS en AR, comparada con la del TS normal y en OA. Estos resultados sugieren que endoglina serviría como un receptor de TGF- $\beta$ 1 en células de revestimiento del TS y en macrófagos del TS inflamado. Los monocitos CD14+ CD16+, población minoritaria de monocitos en sangre periférica humana, han sido involucrados en varias enfermedades inflamatorias incluyendo AR (45). Los monocitos CD16+ pue-

den migrar rápidamente al lugar de la inflamación, donde rápidamente maduran a macrófagos pro-inflamatorios. En su estudio, Kawanaka y col., demostraron que el número de monocitos sanguíneos CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> aumenta durante la fase activa de AR (45). Este cambio fenotípico parece ser inducido por una combinación de citoquinas liberadas en las articulaciones inflamadas, incluyendo TGF- $\beta$ , M-CSF e IL-10. Los monocitos CD16<sup>+</sup> presentan mayor expresión de los receptores de quimioquinas CCR1 y CCR5 e ICAM-1 que los monocitos CD16<sup>-</sup>, lo que concuerda con su capacidad de infiltrar tejidos inflamados. La intensidad de expresión de la molécula CD14 en los monocitos CD16<sup>+</sup> se ve reducida por TGF- $\beta$  y aumentada por IL-10. Estas citoquinas fueron detectadas en altos niveles en muestras de sangre periférica de pacientes con AR con alta frecuencia de monocitos CD16<sup>+</sup>. Por lo tanto, la expansión de monocitos CD16<sup>+</sup> observada en AR activa, podría ser inducida por un efecto del exceso de citoquinas, entre ellas TGF- $\beta$ , M-CSF e IL-10. En resumen, los monocitos sanguíneos CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> con elevada expresión de CCR1, CCR5 e ICAM-1, están aumentados en AR activa. Este aumento está asociado a un exceso de citoquinas en las articulaciones inflamadas. La maduración de los monocitos a células CD16<sup>+</sup> que infiltran tejidos antes de la entrada a la articulación, contribuiría a la inflamación sinovial crónica. Por todo esto, los monocitos CD16<sup>+</sup> son, potencialmente, el blanco más atractivo para el tratamiento de AR.

Los pacientes con enfermedades autoinmunes sistémicas, tales como la artritis reumatoidea (AR), tienen índices de morbilidad y mortalidad elevados causados por infecciones. Más allá de que este riesgo aumentado de infección se atribuyó inicialmente a inmunosupresión terapéutica, existen reportes sobre función fagocítica deficiente de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en estos pacientes y en modelos experimentales. TGF- $\beta$  parece jugar un papel esencial en la adquisición de esta sensibilidad disminuida por parte de los PMN (46). Por otra parte, TGF- $\beta$  es capaz de ejercer efectos patogénicos en el TS, donde los PMN representarían una fuente significativa del TGF- $\beta$  presente en los derrames sinoviales (25). Además, se ha puesto en evidencia que TGF- $\beta$ 1 ejerce un efecto quimiotáctico sobre los PMN, tanto *in vitro* como *in vivo*. (25,47) De modo adicional, Brandes y col. (48), demostraron que los neutrófilos expresan receptores de TGF- $\beta$  ( $350 \pm 20$  receptores/célula), los cuales presentan una elevada afinidad por su ligando y son, principalmente, receptores de tipo I. A diferencia de lo que ocurre con estos receptores en monocitos, los receptores de TGF- $\beta$  en neutrófilos no ven disminuida su expresión al ser expuestos a los mediadores inflamatorios mencionados anteriormente. Esta expresión estable de los receptores de TGF- $\beta$  en los neutrófilos y, la capacidad de dicha citoquina de estimular la quimiotaxis de los neutrófilos, sugieren que los efectos pro-inflamatorios de TGF- $\beta$  están mediados, en parte, por este tipo celular.

TGF- $\beta$  es conocido como el inhibidor endógeno más potente de la función linfocitaria. Se ha demostrado que TGF- $\beta$  es ca-

paz de inhibir completamente la proliferación de células CD4<sup>+</sup> o células T de ayuda (Th o *helper*), y, parcialmente (31,1%) de los linfocitos CD8<sup>+</sup> en LS, indicando que este factor de crecimiento sería un modulador importante de respuesta inmune en sinovitis (49). Además, se sabe que el LS reumatoide suprime directamente la función de los linfocitos T y la señalización con Células Dendríticas (CD). Esta inhibición es llevada a cabo, principalmente, por TGF- $\beta$ , y pareciera alterar indirectamente la regulación de las moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 en CD. (50) Estos resultados, y el hecho de que la neutralización del TGF- $\beta$  reduce significativamente la severidad de la artritis en un modelo de rata, sugieren que el TGF- $\beta$  del LS sería un componente principal involucrado en perpetuar la enfermedad clínica al suprimir la señalización CD-linfocito T.

Durante años se ha insistido arbitrariamente en asignar un rol preponderante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes y en particular en la RA, a un solo subgrupo de células CD4<sup>+</sup>, las de tipo Th1. El reciente descubrimiento de células Th17 productoras de la citoquina IL-17 y el consecuente hallazgo de su papel en la RA desafían las hipótesis de modelos simples para explicar el mecanismo de esta enfermedad (51). Las células T CD4<sup>+</sup> *naïve* cuando son activadas por antígenos pueden adoptar varios fenotipos dependiendo fundamentalmente del microambiente de citoquinas (52). El continuo descubrimiento de nuevos subgrupos de células Th efectoras muestra la complejidad de los mecanismos involucrados (53). En este sentido, cabe la posibilidad de brindar diversas respuestas aceptables a la pregunta sobre cuál es el rol específico para cada subgrupo efector, sin embargo estas a menudo resultan insatisfactorias. No obstante, es claro que diversos subgrupos de células Th efectoras pueden promover daño tisular mediado por células, mientras que células T regulatorias (Treg) podrían limitarlo. Sin embargo, anomalías genéticas como así también agentes ambientales pueden alterar mecanismos moleculares o celulares de las células Treg provocando o predisponiendo a la autoinmunidad.

Las células Treg naturales son normalmente generadas en el timo pero pueden también provenir de células T *naïve* periféricas, denominadas células Treg inducidas. Modulando la actividad de las células Th efectoras descritas más arriba, las células Treg juegan un rol muy importante en la tolerancia inmune a antígenos propios en diversas enfermedades autoinmunes, incluida la RA. El rol de las células Treg ha sido demostrado en pacientes y en modelos experimentales de RA. Fundamentalmente, se cree que aunque en muchos casos el número total de células Treg se encuentra disminuido en la RA, la funcionalidad en términos de la capacidad inmunosupresora de estas células está comprometida (54,55).

Se cree que cambios en el balance del número y/o actividad entre estas subpoblaciones de linfocitos Th1/Th2 y/o Th17/Treg serían los responsables de la iniciación y mantenimiento de la respuesta inflamatoria descontrolada en la RA. Poco

se conoce hasta el momento, del sitio donde ocurren estos cambios en el número y actividad de los distintos subgrupos Th, aunque se especula que la membrana sinovial reumatoide podría brindar un microentorno adecuado (56).

El factor de transcripción Foxp3 controla el desarrollo de las células Treg naturales. Aunque recientes estudios demuestran que la función principal de Foxp3 no es determinar el linaje final de los precursores tímicos hacia Treg, sino estabilizar la función de las Treg una vez el linaje Treg está definido (57).

Las células Treg inducidas, que también expresan Foxp3 y comparten las funciones inmunosupresoras con las Treg naturales, son generadas en la periferia por el TGF- $\beta$  y el ácido retinoico. Sin embargo, también ha sido descrita una población de células Treg con ausencia de expresión del factor Foxp3. Estas, además de su función supresora, se caracterizan por la superproducción de IL-10, y son denominadas Tr1 (58).

El TGF- $\beta$  juega un rol clave dirigiendo el destino final que adoptarán las células T CD4+ activadas por antígenos. Se conoce que la/s citoquina/s que acompañan al TGF- $\beta$  en el microambiente de reconocimiento de antígenos por las células T CD4+ *naïve* determinan el linaje final de estas. De esta manera, por ejemplo, células T CD4+ estimuladas en presencia de IL-6 y TGF- $\beta$  generan células Th17. Por otra parte, la presencia simultánea de IL-27 y TGF- $\beta$  generan células Tr1. También, IL-4 en presencia de TGF- $\beta$  genera células efectoras Th9. Aunque diversos factores contribuyen a la generación de Treg inducibles, la importancia del TGF- $\beta$  es indiscutible. A partir de este escenario resulta difícil predecir cuál es el rol que cumple esta citoquina pleiotrópica en el inicio y/o desarrollo de la RA. En este sentido, se debería analizar cuidadosamente la bibliografía existente para evitar la extrapolación inadecuada de resultados hacia el humano, generalmente obtenidos en modelos murinos experimentales de la RA. Por ejemplo, se sabe que en humanos el TGF- $\beta$  puede inhibir la diferenciación hacia el fenotipo Th17 (59-60). Tal vez, especial importancia debería aplicarse a los efectos del TGF- $\beta$  a nivel sistémico, modificando y dirigiendo la diferenciación del linaje Th y su acción local de reparación en el tejido dañado durante la RA.

Las drogas modificadoras de la enfermedad en AR (DMARDs por sus siglas en inglés) incluyendo el metotrexate, son agentes terapéuticos disponibles para la enfermedad, aunque poco se sabe sobre su mecanismo íntimo de acción. En un estudio reciente, Smith y col. han observado que en un grupo de pacientes con AR quienes lograron la remisión de la enfermedad basados en los criterios ACR (American College of Rheumatology), existe una reducción en la producción de citoquinas anti-inflamatorias tales como el TGF- $\beta$  en biopsias de membrana sinovial (61). En otro estudio del mismo grupo de investigación, se ha demostrado que el tratamiento exitoso en pacientes con AR produce un efecto substancial sobre el contenido de macrófagos de la membrana sinovial, con un efecto menos pronunciado sobre los linfocitos T me-

moria, sugiriendo que el efecto principal de los DMARDs están dirigido a los macrófagos, con la consecuente disminución de citoquinas pro y anti-inflamatorias tales como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$  (62).

## Células Madre y TGF- $\beta$ en RA

Las células madre mesenquimales o MSCs (del inglés *Mesenchymal Stem Cells*) son células multipotentes que pueden definirse de acuerdo a su origen mesenquimal y a su capacidad de auto-renovación, y generación de proge-nie diferenciada (63).

Las MSCs desempeñan un papel importante en reumatología, teniendo en cuenta su potencial de diferenciación a cartílago/hueso, y su capacidad para modular la angiogénesis, fibrosis, y respuestas inmunes del huésped (64). Originalmente descubiertas en la médula ósea, actualmente se ha identificado a las MSCs en varios tejidos, entre ellos en diferentes tejidos que forman parte de las articulaciones, incluyendo al tejido adiposo articular, el periostio, la membrana sinovial, el líquido sinovial, y el cartílago (65).

Se ha comprobado la existencia de MSCs en el líquido sinovial de pacientes con artritis (66), y se ha sugerido que estas células, denominadas MSCs del líquido sinovial o SF-MSc (del inglés *Synovial Fluid-Mesenchymal Stem Cells*), son derivadas principalmente de la membrana sinovial (67); si bien existe la posibilidad de que las MSCs se movilicen desde otros tejidos, como la médula ósea, y ligamentos. Sin embargo se necesitan mayores estudios para identificar el verdadero origen de las SF-MSCs.

Se ha postulado que es posible la redirección de las MSCs sinoviales desde la membrana sinovial hacia el cartílago como estrategia potencial para la reparación del cartílago en AR, aunque se demostró que la diferenciación condrogénica de las MSCs sinoviales en un ambiente no-condrogénico, no es estable *in vivo* (68). También es importante, en AR, considerar los efectos del medio inflamatorio asociado a la enfermedad, ya que es sabido que algunas citoquinas inflamatorias suprimen la diferenciación de BMSCs (MSCs derivadas de la médula ósea) a condrocitos (69). En el trabajo publicado por Jones y col., se señaló la relación negativa existente entre el grado de inflamación sinovial y la capacidad regenerativa de la membrana sinovial en AR, en términos del número de MSCs residentes *in vivo*, y de su multipotencialidad reducida en cultivo (70).

Song y col., en el año 2010, demostraron que el líquido sinovial de pacientes con AR estimula la migración *in vitro* de BMSCs, a través de un mecanismo mediado por el ácido lisofosfatídico (LPA) (71). Asimismo, se sabe que las MSCs derivadas de tejido adiposo pueden diferenciarse a células positivas para  $\alpha$ -SMA ( $\alpha$ -actina de músculo liso), en respuesta al tratamiento con LPA o TGF- $\beta$ 1 (72). De esta manera, los niveles aumentados de TGF- $\beta$ 1 en el microambiente sinovial

de pacientes con AR puede afectar la diferenciación de las MSCs que residen en el tejido dentro de la articulación. La importancia de TGF- $\beta$ 1 en AR ya fue expuesta anteriormente, no obstante es importante mencionar que TGF- $\beta$ 1 está involucrado en los patrones de vascularización de la membrana sinovial (73), y que además, la hipótesis inflamatoria de enfermedades cardiovasculares en AR implica que mediadores originados desde el tejido sinovial inflamado pueden tener respuestas vasculares sistémicas, modulando el estado de diferenciación de las MSCs. No obstante, son necesarios mayores estudios para clarificar la importancia patofisiológica de la diferenciación de las MSCs estimulada por el líquido sinovial de AR y la participación de TGF- $\beta$ 1 en la diferenciación de las MSCs *in vivo*.

Estos antecedentes señalan en forma fehaciente que la inflamación en la articulación no sólo conlleva a la destrucción de la articulación, sino que también afecta el potencial de regeneración intrínseco de las MSCs en AR. Cualquier intervención, utilizando MSCs sinoviales autólogas para inducir neocondrogénesis en AR, debería incluir una supresión efectiva de la inflamación local como primer paso fundamental.

Aunque, aún no está definitivamente establecido el mecanismo de acción de TGF- $\beta$  en AR, se postulan diversos mecanismos

por los cuales esta citoquina puede regular la patogénesis en el curso de la enfermedad. 1) TGF- $\beta$  puede modular la expresión de citoquinas inflamatorias tales como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (74); 2) se sabe que TGF- $\beta$  también regula la producción de metaloproteasas (MMPs) (75); 3) TGF- $\beta$ 1 es un factor fuertemente quimiotáctico pudiendo atraer células inflamatorias del tejido sinovial (26); 4) TGF- $\beta$  puede acelerar la hipertrofia sinovial induciendo la proliferación de fibroblastos (74) e incluso puede modular la apoptosis de los fibroblastos sinoviales; 5) TGF- $\beta$  puede inducir fuertemente la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular endothelial growth factor*), contribuyendo de esta manera indirectamente a la angiogénesis de la membrana sinovial artrítica (76).

En resumen, TGF- $\beta$  es considerada como una citoquina importante en AR con propiedades pro y anti-inflamatorias. Tiene efectos regulatorios sobre macrófagos, linfocitos, neutrófilos, células dendríticas, osteoblastos y células madre mesenquimales, con considerable impacto en la patogénesis de la AR. Aunque son necesarios estudios adicionales, la modulación de TGF- $\beta$  y sus receptores en distintos tipos celulares involucrados en la patogénesis de AR, podría ofrecer una opción terapéutica válida para el tratamiento eficaz de esta enfermedad.

## Referencias

- 1 Brennan F, Beech J. Update on cytokines in Rheumatoid Arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2007; 19:296-301.
- 2 Matthey DL; Nixon N; Dawes PT et al. association of polymorphism in transforming growth factor  $\beta$ 1 gene with disease outcome and mortality in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005; 64:1190-94.
- 3 Mantel P, Schmitt Weber C. Transforming growth factor beta: recent advances on its role in immune tolerance. In: Cuturi MC, Anegón I, editors. *Suppression and Regulation of immune Responses. Methods and Protocols*. Springer, Chapter 21. 2011. Vol 677.
- 4 Govinden R, Bhoola K. Genealogy, expression and cellular function of transforming growth factor beta. *Pharmacol Ther*. 2003; 98:257-65.
- 5 Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al. Targeted disruption of the mouse TGF- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 1992; 359:693-99.
- 6 Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, et al. TGF-beta 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGF-beta knockout phenotypes. *Development*. 1997; 124:2659-70.
- 7 Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, et al. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF- $\beta$ 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nature Genet*. 1995; 11:415-21.
- 8 ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH. Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr. Opin. Cell Biol*. 1996; 8:139-45
- 9 Massague J. Receptor for the TGF-beta family. *Cell*. 1992; 69:1067-70.
- 10 Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF- $\beta$  family and its composite receptors. *Trends Cell Biol*. 1994; 4:172-78.
- 11 Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, et al. Cloning of TGF- $\beta$  type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- $\beta$  type II receptor. *Cell*. 1993; 75:681-92.
- 12 Lin HY, Wang X-F, Ng-Eaton E, et al. Expression cloning of the TGF- $\beta$  type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell*. 1992; 68:775-85.
- 13 Kingsley DM. The TGF- $\beta$  superfamily : new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev*. 1994; 8:133-46.
- 14 Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, et al. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell*. 1992; 71 :1003-14.
- 15 Carcamo J, Zentella A, Massague J. Disruption of transforming growth factor beta signaling by a mutation that prevents transphosphorylation within the receptor complex. *Mol. Cell. Biol*. 1995; 15:1573-81.
- 16 Souchelnsky S, ten Dijke P, Miyazono K, et al. Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta-induced cellular responses. *EMBO J*. 1996; 15:6231-40.
- 17 Lin HY, Moustakas A, Knaus P, et al. The Soluble Exoplasmic Domain of the Type II Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$  Receptor. *J Biol Chem*. 1995; 270:2747-54.
- 18 Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, et al. Requirement of type III TGF- $\beta$  receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science*. 1999; 283:2080-82.
- 19 Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J. Betaglycan presents ligand to the TGF- $\beta$  signaling receptor. *Cell*. 1993; 73:1435-44.
- 20 Kim SY, Han SW, Kim GW, et al. TGF- $\beta$ 1 polymorphism determines the progression of joint damage in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 2004; 33:389-94.
- 21 Schlaak JF, Pfers I, Meyer Zum KH, et al. Different cytokines profiles in the synovial fluid of patient with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondyloarthropathies. *Clin Exp Rheumatol*. 1996; 14:155-62.
- 22 Szekanecz Z, Haines K, Harlow L, et al. Increased synovial expression of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  Receptor endoglin and TGF- $\beta$ 1 in rheumatoid arthritis: possible interactions in the pathogenesis of the disease. *Clin immunol immunopathol*. 1995; 76:187-94.
- 23 Mieliauskaitė D, Venalis P, Dumalakiene I, et al. Relationship between serum levels of TGF- $\beta$ 1 and clinical parameters in patients with rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome secondary to rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*. 2009; 42:356-8.
- 24 Brandes ME, Allen JB, Ogawa Y, et al. Transforming growth factor beta 1 suppresses acute and chronic arthritis in experimental animals. *J Clin Invest*. 1991; 87:1108-13.
- 25 Fava RA, Olsen NJ, Postlethwaite AE, et al. Transforming growth factor beta 1 (TGF beta-1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues implications for TGF-beta driven synovial inflammation and hyperplasia. *J Exp Med*. 1991; 173:1121-32.
- 26 Allen JB, Manthey CL, Hand AR, et al. Rapid onset synovial inflammation and hyperplasia induced by transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 1990; 171:231-47.
- 27 Wahl SM, Allen JB, Costa GL, et al. Reversal of acute and chronic synovial inflammation by anti-transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 1993; 177:225-30.
- 28 Lafyatis R, Thompson NL, Remmers EF, et al. Transforming growth factor beta production by synovial tissues from rheumatoid patients and streptococcal cell wall arthritic rats. Study of secretion by synovial fibroblast-like cells and immunohistologic localization. *J Immunol*. 1989; 143:1142-8.
- 29 Chu CQ, Field M, Abney E, et al. Transforming growth factor beta-1 in rheumatoid synovial membrane and cartilage-pannus junction. *Clin Exp Immunol*. 1991; 86:380-6.
- 30 Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, et al. Expression and regulation of aggrecanase in arthritis. The role of TGF- $\beta$ 1. *J Immunol*. 2002; 168:1405-12.
- 31 Bira Y, Tani K, Nishioka Y, et al. Transforming growth factor beta stimulates rheumatoid synovial fibroblasts via the type II receptor. *Mod Rheumatol*. 2005; 15:108-13.
- 32 Thorbecke G, Shah R, Leu C, et al. Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor- $\beta$  during induction of collagen type II arthritis in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1992; 89:7375.
- 33 Wahl S, Allen J, Costa G, et al. Reversal of the acute and chronic synovial inflammation by antitransforming growth factor beta . *J Exp Med*. 1993; 177:225.
- 34 Eriksson P, Andersson C, Ekerfelt C, et al. relationship between serum levels of IL-18 and IgG1 in patient with primary SS, RA and healthy controls. *Clin Exp Immunol*. 2004; 137:617-20.
- 35 Muñoz-Valle JF, Torres-Carrillo NM, Guzman-Guzman IP, et al. The functional class evaluated in rheumatoid arthritis is associated with soluble TGF- $\beta$ 1 serum levels but not with G915C (Arg25Pro) TGF- $\beta$ 1 polymorphism. *Rheumatol Int*. 2010 Nov 25 (Epub ahead to print).
- 36 Fitzgerald O, Bresnihan B. Synovial membrane cellularity and vascularity. *Ann Rheum Dis*. 1995; 54:511-5.
- 37 Firestein GS. Cytokine networks in rheumatoid arthritis: Implications for therapy. *Agents Actions*. 1995; 47(Suppl.):37-51.
- 38 Szekanecz Z, Koch AE, Kunkel SL, et al. Cytokines in rheumatoid arthritis. Potential targets for pharmacological intervention. *Drugs Ageing*. 1998; 12:377-90.
- 39 Koch AE, Kunkel SL, Chensue SW, et al. Expression of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist by human rheumatoid synovial tissue macrophages. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992; 65:23-9.
- 40 Deleuran BW, Chu CQ, Field M et al. Localization of TNF receptors in the synovial tissue and cartilage/pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1992; 35:1170-8
- 41 Brennan FM, Gibbons DL, Cope AP, et al. TNF inhibitors are produced spontaneously by rheumatoid and osteoarthritic synovial joint cell cultures: Evidence of feedback control of TNF action. *Scand J Immunol*. 1995; 42:158-65
- 42 Cronstein BN, Weissmann G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis Rheum*. 1993; 36:147-57.
- 43 Mojcić CF, Shevach E. Adhesion molecules. A rheumatologic prospective. *Arthritis Rheum*. 1997; 40:991-1004.
- 44 Kinne RW, Brauer R, Stuhlmüller B, et al. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000; 2:189-202.
- 45 Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, et al. CD14+, CD16+ blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 2002; 46:2578-86.
- 46 Gresham HD, Ray CJ, O'Sullivan FX. Defective neutrophil function in the autoimmune mouse strain MRL/lpr. Potential role of transforming growth factor-beta. *J Immunol*. 1991; 146:3911-21.
- 47 Reibman J, Meixler S, Lee TC, et al. Transforming growth factor  $\beta$ 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88:6805-09.
- 48 Brandes ME, Mai UE, Ohura K, et al. Type I transforming growth factor- $\beta$  receptors on neutrophils mediate chemotaxis to transforming growth factor- $\beta$ . *J Immunol*. 1991; 147:1600-06.
- 49 Lotz M, Kekow J, Carson DA. Transforming growth factor- $\beta$  and cellular immune responses in synovial fluids. *J Immunol*. 1990; 144:4189-94.
- 50 Summers KL, JL OD, Heiser A, et al. Synovial fluid transforming growth factor beta inhibits dendritic cell-T lymphocyte interactions in patients with chronic arthritis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42:507-18.
- 51 Hirota K, Yoshitomi H, Hashimoto M, et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J Exp Med*. 2007; 204:2803-12.

- 52 Palmer MT, Weaver CT. Autoimmunity: increasing suspects in the CD4+ T cell lineup. *Nat. Immunol.* 2010; 11:36-40.
- 53 Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3- effector T cells. *Nat. Immunol.* 2008; 9:1347-55.
- 54 Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNF alpha therapy. *J Exp Med.* 2004; 200:277-85.
- 55 Van Amelsfort JM, van Roon JA, Noordegraaf M, et al. Proinflammatory mediator-induced reversal of CD4+, CD25+ regulatory T cell-mediated suppression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:732-42.
- 56 Raza K, Falciani F, Curnow SJ, et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7:R784-95.
- 57 Lin WD, Haribhai LM, Relland N, et al. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat. Immunol.* 2007; 8:359-68.
- 58 Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4 T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 1997; 389:737-42.
- 59 Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, et al. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 2007; 8:942-9.
- 60 Wilson, NJ, Boniface, K, Chan, JR et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007; 8:950-57.
- 61 Smith MD, Kraan MC, Slavotinek J, et al. Treatment induced remission in rheumatoid arthritis patients is characterised by a reduction in macrophage content of synovial biopsies. *Rheumatology.* 2001; 40:367-74.
- 62 Smith MD, Slavotinek J, Weedon V, et al. Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression. *Rheumatology.* 2001; 40:965-77.
- 63 Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005; 7:393-95.
- 64 Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, et al. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 2009; 5:392-9.
- 65 Bouffi C, Djouad F, Mathieu M, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit? *Rheumatology.* 2009; 48:1185-9.
- 66 Jones EA, English A, Henshaw K, et al. Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:817-27.
- 67 Morito T, Muneta T, Hara K, et al. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology.* 2008; 47:1137-43.
- 68 De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP. Failure of in vitro-differentiated mesenchymal stem cells from the synovial membrane to form ectopic stable cartilage in vivo. *Arthritis Rheum.* 2004; 50:142-50.
- 69 Lories RJ, Derese I, de Bari C, Luyten F.P. Evidence for uncoupling of inflammation and joint remodeling in a mouse model of spondylarthritis. *Arthritis Rheum.* 2007; 56:489-97.
- 70 Jones E, Churchman SM, English A, et al. Mesenchymal stem cells in rheumatoid synovium: Enumeration and functional assessment in relation to synovial inflammation level. *Ann Rheum Dis.* 2009; 69: 450-57.
- 71 Song HY, Lee MJ, Kim MY, et al. Lysophosphatidic acid mediates migration of human mesenchymal stem cells stimulated by synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801:23-30.
- 72 Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, et al. Cancer-derived lysophosphatidic acid stimulates differentiation of human mesenchymal stem cells to myofibroblast-like cells. *Stem Cells.* 2008; 26:789-97.
- 73 Salvador G, Sanmarti R, Gil-Torregrosa B, et al. Synovial vascular patterns and angiogenic factors expression in synovial tissue and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2006; 45:966-71.
- 74 Derynck R, Choy L. Transforming growth factor-beta and its receptors. In: Thomson A, ed. *The cytokine handbook*, 3rd edn. San Diego:Academic Press, 1998:593-636.
- 75 Edwards DR, Leco KJ, Beaudry PP, et al. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in young and old human fibroblasts. *Exp Gerontol.* 1996; 31:207-23.
- 76 Berse B, Hunt JA, Diegel RJ et al. Hypoxia augments cytokine (transforming growth factor-beta and IL-1)-induced vascular endothelial growth factor secretion by human synovial fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* 1999; 115:176-82.