



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA [ò\*] Facultat de Farmàcia

## Programa de Doctorado en Biomedicina y Farmacia

***Efectos inmunomoduladores y antirresortivos de  
osteostatina en artritis experimental y en células  
humanas***

Tesis Doctoral presentada por:  
**Josep Nacher Juan**

Directoras:  
María José Alcaraz Tormo  
María Luisa Ferrándiz Manglano

*Valencia, 2020*





Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Dña **María José Alcaraz Tormo** Catedrática de la Universitat de València y Dña **María Luisa Ferrándiz Manglano** Catedrática de la Universitat de València ,

**CERTIFICAN:**

Que el trabajo presentado por el graduado **Josep Nacher Juan**, titulado "*Efectos inmunomoduladores y antirresortivos de osteostatina en artritis experimental y en células humanas*", para obtener el grado de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis, para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmamos en Valencia diciembre de 2020

María José Alcaraz Tormo

María Luisa Ferrándiz Manglano



Dedicado a mis padres Reyes y Vicent por una vida de sacrificio, de madrugadas y trabajo. Una vida de dedicación para que la mía fuese mejor.



Es difícil agradecer a todo el mundo lo que te han dado y han supuesto para la realización de esta tesis doctoral. Siempre te olvidas de alguien cuando la intención es de acordarte de todos. Así que empiezo esto con mis más sinceras disculpas si ocurre.

En primer lugar quiero agradecer el apoyo de Sara porque, aunque llegó en los minutos finales del partido, ha hecho este final mucho más dulce.

También quiero agradecer este trabajo a mis 2 directoras de tesis porque sin ellas esto no habría salido adelante: a María José Alcaraz por toda su sabiduría y a Marisa Ferrándiz porque si dicen que el tiempo es oro el suyo es diamante, así que muchas gracias por sacar ese tiempo para mí aunque tuvieras que trabajar hasta los fines de semana. No obstante, no puedo olvidarme de alguien sin la ayuda de quién no sabría coger una pipeta, mi tercera directora. Esa persona es Mari Carmen Terencio, una persona humilde, llena de bondad que nunca tiene un no en la boca. Este mundo necesita más gente como ella.

Un proyecto como la tesis doctoral requiere de sacrificios y momentos duros en los que piensas en tirar la toalla pero todas estas situaciones se llevan mejor cuando el Máster te da gente como Silvia, Toni, Asun, Arturo, Gabriela y Lucía con los que he compartido viajes, fiestas y miles de cafés y cervezas en las que hemos ahogado las penas.

No puedo olvidarme de todos mis compañeros de laboratorio de los que he aprendido tanto y, espero, haberles enseñado algo. Por ello agradecer todo lo que han hecho por mí a Laura Catalán, Carmen, Miguel, Cristina, Fermín, Andrea y María. También debo acordarme de Laura Vila, Mamen, Álvaro, María José, Patrice, Sandra y todos los miembros del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia.

Tampoco puedo obviar a gente que sin haber pertenecido al mundo científico han estado ahí en todos esos momentos duros y, como no, también en los buenos. Gracias a Ana, Alejandra, Toni y Andreu.

Una última mención necesaria y quizás la más importante de esta lista. Gracias abuela. Por todos esos *“ai fill, vals molt”* o *“¿qué estàs estudiant lo de dins?”* (mientras se acaricia la tripa y me miraba como a un Dios). En parte esta tesis es tuya por la devoción por mí siempre mostrada.

Y finalmente, aunque suene como una frase llena de ego, me dedico esta tesis a mí pues desde pequeño es lo que quería. Siempre recordaré cuando les decía a mis padres, y espero que lo recuerden, que descubriría la vacuna contra el SIDA. No ha sido posible pero en pequeño formato espero haber contribuido a la ciencia.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
RESUMEN .....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Artritis reumatoide.....	3
1.1.1 La artritis reumatoide y su impacto en la sociedad .....	3
1.1.2 Factores de riesgo.....	5
1.1.3 Fisiopatología.....	7
1.1.3.1 Artritis reumatoide preclínica.....	7
1.1.3.2 Desarrollo de la artritis temprana y artritis establecida.....	10
1.1.3.3 Respuesta celular .....	10
1.1.3.4 Citocinas y mediadores implicados.....	27
1.1.3 Tratamiento farmacológico y pautas terapéuticas.....	31
1.2 PTHrP .....	36
1.3 Péptidos derivados de PTHrP .....	37
2. OBJETIVOS .....	41
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45
3.1 Artritis inducida por colágeno en ratón (CIA) .....	45
3.1.1 Animales.....	45
3.1.2 Protocolo experimental.....	46
3.1.3 Grupos experimentales y tratamiento.....	47
3.1.4 Puntuación macroscópica de la artritis.....	47
3.1.5 Análisis histológico.....	48
3.1.5.1 Tinción TRAP.....	49
3.1.5.2 Tinción Safranina-O.....	51
3.1.5.3 Tinción Hematoxilina-Eosina .....	52

3.1.6	Determinación de mediadores en homogenados de pata.....	53
3.1.7	Medida de analitos en suero .....	54
3.1.8	Actividad mieloperoxidasa .....	55
3.1.9	Aislamiento, ensayo de proliferación y determinación de citocinas en células de ganglio linfático .....	56
3.1.10	Citometría de flujo de las células de ganglio linfático de ratón .....	57
3.1.11	Análisis de rayos X.....	58
3.2	Métodos de estudio en células humanas .....	58
3.2.1	Experimentos con monocitos humanos.....	58
3.2.1.1	Separación de monocitos y diferenciación a osteoclastos.	58
3.2.1.2	Tinción TRAP y contaje de osteoclastos .....	61
3.2.1.3	Análisis de la expresión génica .....	61
3.2.2	Experimentos con linfocitos humanos .....	63
3.2.2.1	Análisis de las poblaciones linfocitarias humanas mediante citometría de flujo.....	63
3.2.2.2	Proliferación de linfocitos humanos .....	64
3.3.	Análisis estadístico .....	64
4.	RESULTADOS .....	67
4.1	Efectos de la osteostatina en el modelo CIA.....	67
4.1.1	Evolución de la artritis.....	67
4.1.1.1	Niveles de mediadores en pata .....	69
4.1.2	Actividad MPO en pata .....	71
4.1.3	Niveles de mediadores en suero .....	72
4.1.4	Proliferación celular de linfocitos de ganglio linfático .....	74
4.1.5	Caracterización de las poblaciones celulares de ganglio linfático.....	75
4.1.6	Determinación de la degradación ósea.....	77
4.1.7	Análisis histológico.....	78
4.1.7.1	Tinción de la actividad TRAP de osteoclastos .....	78

4.1.7.2	Análisis tisular de la migración celular y degradación del cartílago.....	80
4.2	Trabajo experimental en células humanas .....	82
4.2.1	Diferenciación de monocitos a osteoclastos .....	82
4.2.2	Expresión génica de los preosteoclastos.....	83
4.2.2.1	Expresión génica a dos días de estimulación.....	84
4.2.2.2	Expresión génica a siete días de estimulación.....	86
4.2.3	Efecto de osteostatina en linfocitos humanos .....	88
4.2.3.1	Efecto del péptido en la proliferación celular.....	88
4.2.3.2	Modificación de las poblaciones linfocitarias por osteostatina .....	89
5.	DISCUSIÓN .....	93
6.	CONCLUSIONES.....	105
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	109
8.	ANEXOS.....	131
8.1	Autorización del procedimiento para el trabajo con animales de experimentación utilizado en la presente tesis .....	131



## ABREVIATURAS

ACPA	anticuerpos antipéptidos citrulinados
ACR	Colegio Americano de Reumatología
AFF3	miembro 3 de la familia AF4/FMR2
AINE	antiinflamatorio no esteroideo
ANKRD55	dominio repetido anquirina-55
AP-1	proteína activadora 1
AR	artritis reumatoide
BCR	receptor de células B
bDMARDs	DMARDs biológicos
BLK	linfocito B quinasa
BMP	proteína morfogénica ósea
boDMARDs	DMARDs biológico originales
BrdU	bromodesoxiuridina
Breg	linfocitos B reguladores
bsDMARDs	DMARDs biosimilares
CD	cúmulo de diferenciación
CDAI	índice clínico de la actividad de la enfermedad
CIA	artritis inducida por colágeno
COX-2	ciclooxigenasa 2
CPA	células presentadoras de antígeno
csDMARDs	DMARDs sintéticos convencionales
CSF1R	receptor del factor estimulador de colonias de monocitos 1
Ct	ciclo umbral
CTLA-4	antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos

DAP-12	proteína activadora DNAX de 12kDa
DKK1	proteína relacionada con Dickkopf 1
DMARDs	antirreumáticos modificadores de la enfermedad
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EULAR	Liga Europea Contra el Reumatismo
ERK	quinasa regulada por señales extracelulares
FcR $\gamma$	subunidad gamma del receptor de la fracción constante de inmunoglobulinas
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU
FOXP3	<i>forkhead box P3</i>
FR	factor reumatoide
FRPs	familia de proteínas <i>frizzled</i>
GAPDH	gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GC	glucocorticoides
GM-CSF	factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
GRZB	granzima B
HLA-DRB1	cadena beta del complejo mayor de histocompatibilidad
IFN $\gamma$	interferón $\gamma$
IL	interleucina
IL2RA	cadena alfa del receptor de interleucina 2
IL6ST	transductor de señal de interleucina 6
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
JAK	quinasas Janus
MAPK	proteín quinasas activadas por mitógeno
MCSF	factor estimulador de colonias de monocitos
MED 24	subunidad 24 del complejo mediador

MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
MMP	metaloproteinasa de matriz
MPO	mieloperoxidasa
MTX	metotrexato
NF1A	factor nuclear 1 A
NFATc1	factor nuclear de células T activadas 1
NF-κB	factor nuclear kappa B
NK	células <i>natural killer</i>
NO	óxido nítrico
OC	osteocalcina
OPG	osteoprotegerina
OSCAR	receptor asociado a osteoclastos tipo inmunoglobulina
OT	osteostatina
PAR2	receptor activado por proteasa 2
PBS	tampón fosfato salino
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E <sub>2</sub>
PPARγ	receptor activado por proliferadores de peroxisomas y
PRL	prolactina
PTH	paratohormona
PTH1R	receptor de paratohormona 1
PTHrP	péptido relacionado con la paratohormona
PTPN22	proteín tirosín fosfatasa no receptor tipo 22
RANKL	ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
ROI	región de interés
RORγT	receptor nuclear huérfano γT relacionado con el receptor de ácido retinoico

RT	transcripción inversa
SDAI	índice simplificado de la actividad de la enfermedad
SOST	esclerostina
SPAG9	antígeno 9 relacionado con el esperma
STAT6	transductor de señal y activador de la transcripción 6
Tc	linfocitos T citotóxicos
TCR	receptor de células T
TF	linfocitos T foliculares
TGF $\beta$	factor de crecimiento transformante $\beta$
Th	linfocitos T cooperadores
TNFAIP3	proteína 3 inducida por factor de necrosis tumoral
TNF $\alpha$	factor de necrosis tumoral $\alpha$
TRAF6	factor 6 asociado al receptor de TNF
TRAP	fosfatasa ácida resistente a tartrato
TMB	tetrametilbencidina
Treg	linfocitos T reguladores
TREM-2	receptor gatillo expresado en células mieloides 2
tsDMARDs	DMARDs sintéticos dirigidos

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema general del avance de la artritis reumatoide en sus diferentes fases.....	7
<b>Figura 2:</b> Esquema representativo del desarrollo de la artritis.....	9
<b>Figura 3:</b> Relación entre las células clave en la patología de la AR.....	18
<b>Figura 4:</b> Esquema de los procesos celulares en la activación y diferenciación de monocitos para transformarse en osteoclastos.....	23
<b>Figura 5:</b> Algoritmo terapéutico para el tratamiento de la AR.....	35
<b>Figura 6:</b> Estructura molecular de osteostatina.....	38
<b>Figura 7:</b> Esquema del CIA.....	46
<b>Figura 8:</b> Esquema de la separación y siembra de monocitos de sangre humana para la diferenciación de osteoclastos.....	60
<b>Figura 9:</b> Evolución de la artritis.....	68
<b>Figura 10:</b> Niveles de las principales citocinas proinflamatorias en homogenado de pata medido por ELISA.....	69
<b>Figura 11:</b> Niveles de citocinas en homogenado de pata medido por ELISA.....	71
<b>Figura 12:</b> Actividad mieloperoxidasa.....	72
<b>Figura 13:</b> Niveles séricos de IgG2a y metabolitos de hueso DKK-1, SOST y OC.....	73
<b>Figura 14:</b> Proliferación y diferenciación de linfocitos T.....	75
<b>Figura 15:</b> Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos del ganglio linfático.....	76
<b>Figura 16:</b> Análisis por rayos X de las patas traseras y delanteras.....	77

<b>Figura 17:</b> Tinción TRAP de cortes de tobillo.....	79
<b>Figura 18:</b> Puntuación macroscópica de cortes teñidos de tobillo.....	80
<b>Figura 19:</b> Imágenes representativas de cada grupo experimental de la articulación.....	81
<b>Figura 20:</b> Imágenes representativas de cada grupo experimental de osteoclastos teñidos.....	82
<b>Figura 21:</b> Descenso relativo de células TRAP+.....	83
<b>Figura 22.</b> Expresión de los genes implicados en la diferenciación y actividad de osteoclastos (CSF1R, RANK, NFATc1, OSCAR, Catepsina K y MED24) a dos días.....	85
<b>Figura 23:</b> Expresión de los genes implicados en la diferenciación y actividad de osteoclastos (CSF1R, RANK, NFATc1, OSCAR, Catepsina K y MED24) a siete días.....	87
<b>Figura 24:</b> Proliferación celular de los linfocitos de sangre humana medidos por incorporación de BrdU.....	88
<b>Figura 25:</b> Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos humanos estimulados.....	90

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Principales tipos linfocitarios que participan en la artritis.....	14
<b>Tabla 2:</b> Células secretoras e implicación de diferentes citocinas en la AR.....	30
<b>Tabla 3:</b> Clasificación de los fármacos utilizados para el tratamiento de la AR.....	33
<b>Tabla 4:</b> Kits comerciales usados para la detección de distintos analitos en suero y en homogenados de pata.....	54
<b>Tabla 5:</b> Protocolo experimental para la determinación de mieloperoxidasa.....	56



## RESUMEN

La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria y autoinmune crónica que afecta principalmente a las articulaciones. Se produce una inflamación articular que daña las diferentes estructuras deformándolas, llegando a incapacitar al paciente. Se caracteriza por inflamación de la membrana sinovial con infiltración de células inmunes, degradación del cartílago, con muerte de condrocitos, y destrucción del hueso por desregulación del mecanismo de degradación-reparación. La activación aberrante de las células presentadoras de antígeno frente a antígenos propios modificados inicia una cascada inflamatoria que lleva a la activación linfocitaria contra este antígeno, la proliferación de linfocitos B y la producción de autoanticuerpos, y a la liberación de mediadores proinflamatorios tanto en el foco inflamatorio como en la circulación general. Esto lleva a la hiperactivación osteoclástica e inhibición osteoblástica produciendo la degradación del hueso subcondral. Esta respuesta inflamatoria está mediada por linfocitos Th1, Th2 y Th17, entre otros. No obstante, para compensar este aumento de linfocitos proinflamatorios, el organismo activa la vía resolutive a través de los linfocitos T reguladores FOXP3+ que fracasan en su intento por paliar la inflamación. Así, el proceso se retroalimenta positivamente hasta la degradación completa de las articulaciones.

Hoy en día existen muchos tratamientos para combatir la enfermedad, pero se centran exclusivamente en frenar su avance y paliar los síntomas dolorosos. Además, no se ha conseguido revertir la degradación ya producida. En este sentido, es importante continuar investigando tanto la enfermedad como posibles vías y dianas terapéuticas. Así, en los últimos años han aparecido diversas terapias biológicas capaces de mejorar la enfermedad,

pero no son efectivas en todos los casos o pueden acabar fracasando por tolerancia o por incompatibilidad con nuestro propio sistema inmune.

La proteína relacionada con la paratohormona (PTHrP) y sus derivados peptídicos han sido estudiados recientemente como tratamiento para las enfermedades óseas. Uno de ellos, osteostatina (PTHrP(107-111)), ha mostrado propiedades antiinflamatorias y antisenescentes en osteoblastos y también antiosteoclastogénicas. El objetivo del presente estudio ha sido profundizar en el conocimiento farmacológico de este péptido, determinando sus efectos en un modelo animal de artritis reumatoide y en células humanas.

Se empleó el modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones DBA/1. Después del inicio de la artritis, se administró osteostatina a 80 µg/kg o 120 µg/kg por vía subcutánea durante 13 días. A día 14 se sacrificaron los animales y se les extrajeron los ganglios linfáticos para la caracterización de las poblaciones linfocitarias por citometría de flujo y para ensayos de proliferación celular. Unas patas fueron seccionadas y homogenizadas para determinar mediadores, otras se emplearon en el estudio histológico de la articulación y otras para determinar la densidad ósea mediante rayos X. También se cuantificaron diversos mediadores en el suero de los ratones.

Osteostatina fue capaz de reducir los signos clínicos de la artritis, así como los principales mediadores inflamatorios locales como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6. Además, aumentó la principal citocina antiinflamatoria IL-10. Todo ello acorde con los resultados obtenidos con la citometría de flujo de los linfocitos de ganglio linfático donde se observó un aumento de la población FOXP3+ respecto a la ROR $\gamma$ T+. Los cortes histológicos mostraron una reducción de la degradación del cartílago y de la destrucción ósea que se confirmó con el análisis de rayos X.

Por otro lado, se separaron monocitos de sangre humana para su posterior diferenciación a osteoclastos y estudiar la capacidad de osteostatina de reducir este proceso. Se utilizaron las concentraciones de 100 nM, 250 nM y 500 nM. Tras 2 o 7 días de diferenciación, se lisaron las células y se midieron distintos genes implicados en la diferenciación de osteoclastos por RT-qPCR. También se separaron los linfocitos, se trataron con osteostatina a 100 nM y 500 nM y se caracterizaron las poblaciones por citometría de flujo.

Se observó que osteostatina es capaz de bloquear la diferenciación osteoclástica a partir de monocitos humanos mediante la disminución de la expresión de genes clave como RANK, OSCAR y catepsina K, sobre todo en los primeros estadios de diferenciación. Además, el péptido provocó un aumento de los linfocitos FOXP3<sup>+</sup> en comparación con los RORγT en los linfocitos extraídos de sangre humana.

Así puede concluirse que osteostatina tiene un perfil inmunomodulador, antiinflamatorio y antirresortivo, demostrado tanto en CIA como en células humanas. Sería interesante seguir profundizando en el estudio de esta molécula para desarrollar posibles tratamientos en enfermedades inflamatorias crónicas articulares como es la artritis reumatoide.



# INTRODUCCIÓN



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Artritis reumatoide

### 1.1.1 La artritis reumatoide y su impacto en la sociedad

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune crónica e inflamatoria que afecta principalmente a las articulaciones, tanto las superiores como las inferiores y espinales. Además de causar inflamación, dolor y rigidez, se produce una degradación progresiva de las articulaciones provocando deformidades, pérdida de funcionalidad e inmovilidad.

Es una enfermedad de distribución mundial, con mayor prevalencia en mujeres que en hombres en una proporción 3:1. En España, tiene una prevalencia del 0,5% y su incidencia es de 8,3 nuevos casos por cada 100.000 habitantes y año, siendo también mayor en mujeres que en hombres (García y Loza, 2018)

El elevado impacto de la artritis en la sociedad viene de que es una enfermedad incapacitante, por lo que afecta no solo al individuo sino también a todo su entorno. Desde su productividad laboral, a los cuidados y condiciones especiales que necesita y su estado mental.

El desarrollo autoinmune de la AR lleva a un proceso inflamatorio iniciado en las articulaciones y que tiene repercusión en todo el organismo. Esto último provoca diferentes comorbilidades tanto por la enfermedad como por los tratamientos utilizados. Las comorbilidades más frecuentes a causa de la enfermedad son la enfermedad cardíaca relacionada con aterosclerosis, trastornos pulmonares, alteraciones digestivas, osteoporosis, infecciones y

cáncer. Las alteraciones digestivas, que pueden llegar a la producción de hemorragias y úlceras, se han asociado con el uso de antiinflamatorios no esteroídicos (AINEs) y dosis altas de glucocorticoides (GC) que serían responsables además de un mayor riesgo de osteoporosis e infecciones. Además, el uso de fármacos anti-factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) aumentaría el riesgo de sufrir infecciones, sobre todo tuberculosis (Dougados, 2016).

Debido al dolor crónico e incapacidad que provoca la AR, es común que los pacientes presenten problemas psiquiátricos como depresión (17% de pacientes) o ansiedad (25%) (Matcham et al, 2018).

Se calcula que en España hay 300.000 afectados por esta enfermedad y los costes medios al año son 24.291€ por paciente (Leon et al, 2018) lo que supone un impacto directo sobre la sanidad de 7.287 millones, que derivan principalmente del elevado precio de los nuevos fármacos biológicos. Sin embargo, el uso de estos hace que disminuya el gasto en cirugías, otras especialidades y pruebas complementarias.

Pero este impacto económico no queda aquí. A la anterior cifra habría que sumarle los costes indirectos, es decir, pérdida de productividad, discapacidades y muerte prematura. En la pérdida de productividad se encuentra el llamado presentismo, es decir, la pérdida de condiciones para desarrollar tu actividad laboral causando una pérdida a la empresa o administración pública sin estar de baja (García y Loza, 2018).

### 1.1.2 Factores de riesgo

No se conoce la causa de la AR, pero existen muchos factores de riesgo relacionados con su desarrollo, entre los que se incluyen la genética, el sexo o factores ambientales como la exposición al humo, etc. (Smolen et al, 2018).

Los factores genéticos representan un componente mayoritario. De hecho, se estima que la herencia es un 60% como factor de riesgo para desarrollar la enfermedad (MacGregor et al, 2000). Existen genes como los codificantes para el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que se sabe a ciencia cierta que están implicados en el desarrollo de la AR. No obstante, se han reconocido hasta 100 genes codificantes por todo el genoma cuyas variantes pueden llevar a la expresión de la AR. Las proteínas que se generan a partir de ellos, podrían ser dianas terapéuticas (Okada et al, 2014). Con la mutación de diferentes genes se ha observado que incluso se pueden diferenciar las artritis entre anticuerpo antipéptidos citrulinados (ACPA)-positivas o ACPA negativas. Por ejemplo, las variantes en los genes HLA-DRB1 (cadena beta del complejo mayor de histocompatibilidad), PTPN22 (proteína tirosín fosfatasa no receptor tipo 22), BLK (linfocito B quinasa), ANKRD55 (dominio repetido anquirina-55) e IL6ST (transductor de señal de interleucina 6) no tienen relación con la serología de ACPA. Por otro lado, las modificaciones en AFF3 (miembro 3 de la familia AF4/FMR2), CD (cúmulo de diferenciación)-28 y TNFAIP3 (proteína 3 inducida por factor de necrosis tumoral) solo se encuentran en las artritis seropositivas a ACPA, mientras que PRL (prolactina) y NF1A (factor nuclear 1 A) solo están modificadas en AR seronegativas (Viatte et al, 2012; Viatte et al, 2016).

La severidad también está relacionada con variantes genéticas, como por ejemplo las modificaciones de HLA-DRB1, IL2RA (cadena alfa del receptor de interleucina 2), DKK1 (proteína relacionada con Dickkopf 1), GRZB

(granzima B), metaloproteínasa de matriz (MMP)-9 y SPAG9 (antígeno 9 relacionado con el espermatozoide). Además, se ha observado que las variantes epigenéticas son clave en muchos pacientes con AR. La metilación de regiones del ADN es un mecanismo por el cual los factores ambientales pueden producir cambios en la actividad celular. Así, por ejemplo, el nivel de metilación del gen HLA-DRB1 de pacientes artríticos es mayor en fumadores que en no fumadores (Smolen et al, 2018).

El sexo también es un factor de riesgo importante. Las mujeres tienen de 2 a 3 veces más de posibilidades de desarrollar una AR (Ngo et al, 2014). En mujeres la AR aparece normalmente a mediana edad o tras la menopausia, mientras que en los hombres suele aparecer a edades avanzadas y con concentraciones más elevadas de factor reumatoide (FR) y ACPA (Alamanos et al, 2006).

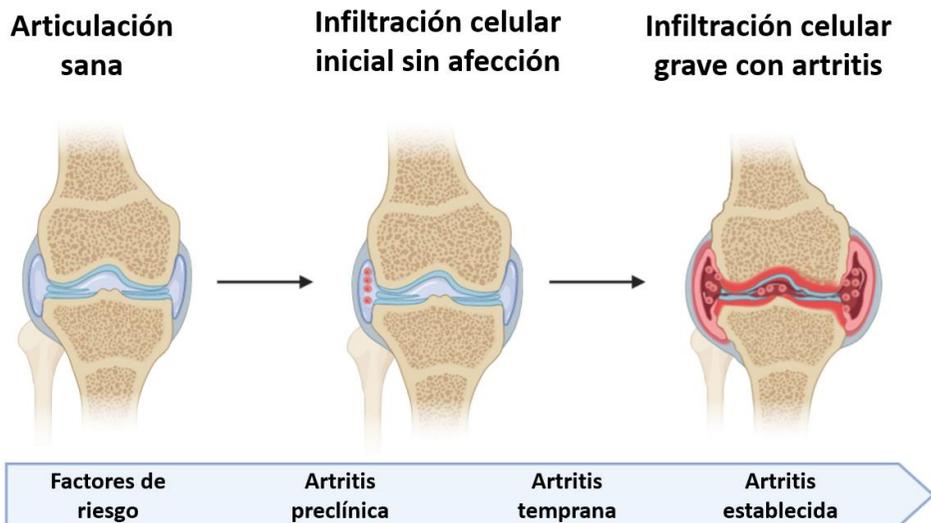
La relación del tabaquismo con diferentes enfermedades se conoce desde hace mucho tiempo. En el caso de la AR se ha observado que los fumadores de 20 cajetillas o más al año doblan el riesgo de padecer la enfermedad (Sugiyama et al, 2010) y en las personas que pueden desarrollar una artritis ACPA-positiva se llega a multiplicar el factor de riesgo por 20 si fuman (Källberg et al, 2011).

Otros factores relacionados con el desarrollo de la AR son la inhalación de partículas de sílice y otros materiales, el déficit de vitamina D (Smolen et al, 2018), las infecciones periodontales (Hajishengallis, 2015) y la obesidad (Ljung y Rantapää-Dahlqvist, 2016).

### 1.1.3 Fisiopatología

#### 1.1.3.1 Artritis reumatoide preclínica

En la mayoría de los pacientes, la AR comienza hasta 10 años antes del inicio de los síntomas de la enfermedad. Esta comienza con un periodo de alta susceptibilidad basado principalmente en los factores genéticos. Esta fase de alto riesgo se inicia con la participación de agentes ambientales. Finalmente, la AR se establece en aquellas personas que no son capaces de resolver este punto (Figura 1).



**Figura 1: Esquema general del avance de la artritis reumatoide en sus diferentes fases**

No se sabe claramente cómo los factores ambientales afectan la AR. A pesar de ello, parece ser que, por ejemplo, los agentes tóxicos del tabaco son capaces de actuar sobre las células de la mucosa y promover una conversión post-traducciona de argininas en citrulinas en un grupo de proteínas, incluyendo proteínas de matriz (como fibronectina, colágeno, fibrinógeno o vimentina) o proteínas intracelulares como las histonas. Este proceso de citrulinación está promovido por la inducción de la enzima peptidil-arginina-deaminasa por estos componentes tóxicos (Makrygiannakis et al, 2008). Otro ejemplo de agentes capaces de inducir la citrulinación de proteínas son algunas bacterias causantes de infecciones gingivales a través de la producción directa de peptidil-arginina-deaminasa (Dissick et al, 2010) o por toxinas capaces de inducir la enzima en neutrófilos (König et al, 2016).

Las células presentadoras de antígeno (CPA) presentan estos péptidos a través del MHC mutado a los linfocitos T, que finalmente estimulan a los linfocitos B para que produzcan anticuerpos contra proteínas propias (Figura 2), siendo el FR y los ACPA los ejemplos más importantes de estos autoanticuerpos (Smolen et al, 2018).

Los ACPA así como el FR y citocinas y quimiocinas proinflamatorias se pueden detectar hasta 10 años antes del inicio de la enfermedad. Pero la presencia de ACPA sola es insuficiente para causar la AR, es necesario otro estímulo como la formación de inmunocomplejos o la activación del complemento para que se inicie la sinovitis con su migración celular y expresión de citocinas proinflamatorias (Arend y Firestein, 2012).

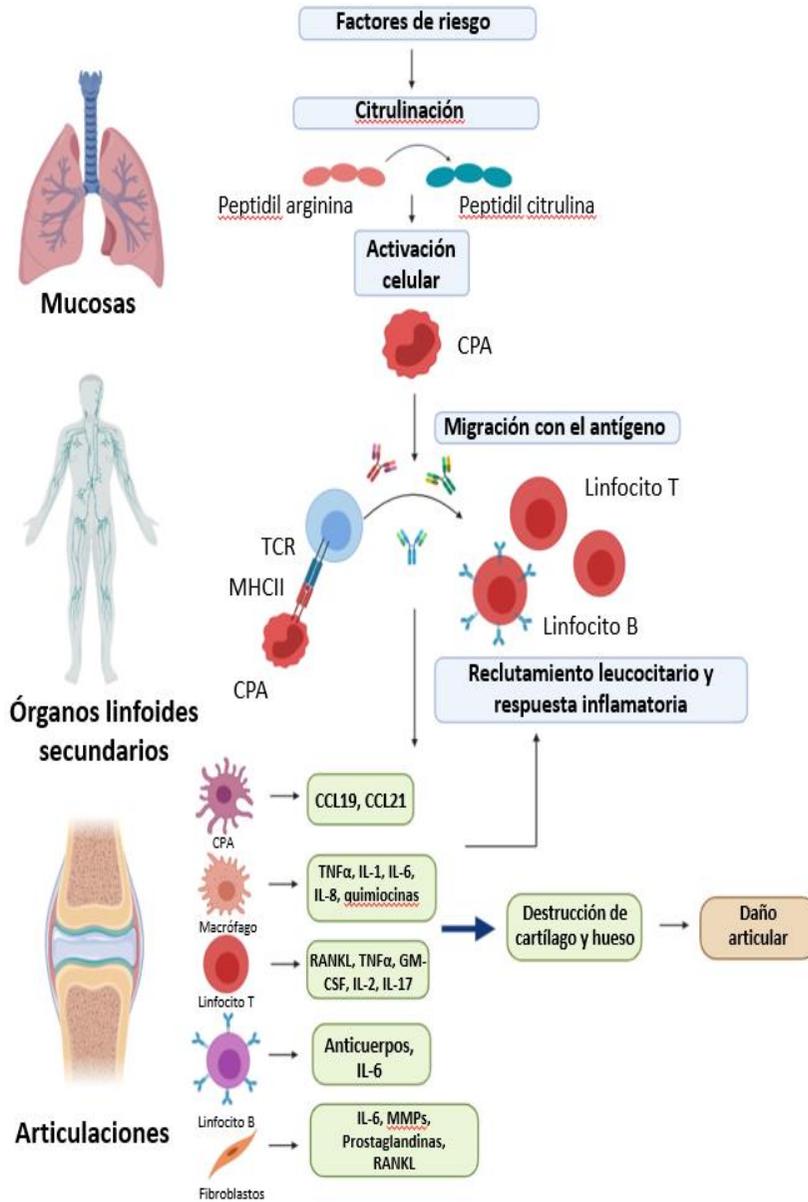


Figura 2: Esquema representativo del desarrollo de la artritis (Modificada de Smolen, et al 2018)

### 1.1.3.2 Desarrollo de la artritis temprana y artritis establecida

El sinovio es una estructura delicada formada principalmente por sinoviocitos fibroblásticos y macrófagos que forman una delgada línea que no tiene función barrera. Las funciones del sinovio son varias, entre las cuales están la producción de lubricante para las superficies del cartílago y el aporte de nutrientes a sus células. La artritis temprana se caracteriza por una inflamación sinovial basada en una infiltración celular mononuclear dominada por macrófagos y linfocitos T CD4+ junto con una activación moderada de las células del estroma. Las vías patogénicas en el sinovio parece ser que se establecen en los primeros estadios de la enfermedad y permanecen estables durante el resto de la vida del paciente aunque se han descubierto algunas diferencias (Smolen et al, 2018). Los niveles de ACPA se disparan antes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Cuando ya está establecida, las concentraciones de los distintos anticuerpos (ACPA, FR y otros) decrecen, siendo el FR el que en más proporción cae (Böhler et al, 2013). En el sinovio, los linfocitos T presentan mayor expansión clonal durante la fase temprana de la AR respecto a la enfermedad establecida (Klarenbeek et al, 2012). También los patrones de metilación de los sinoviocitos son diferentes entre la artritis temprana y la ya establecida (Ai et al, 2015).

### 1.1.3.3 Respuesta celular

La composición celular responsable del proceso artrítico es muy variada y abarca a muchas células de la inmunidad innata (monocitos, células dendríticas, mastocitos...) y de la inmunidad adquirida (linfocitos Th1, Th17, células B y células plasmáticas). Aparte del sistema inmune, también tienen una importante participación en la enfermedad las células propias del sinovio. Durante la AR se produce la activación de los dos tipos celulares sinoviales,

con la liberación de citocinas proinflamatorias, prostaglandinas y leucotrienos (Bartok y Firestein, 2010). Además, los sinoviocitos fibroblásticos desarrollan un fenotipo invasivo que es responsable del daño en el cartílago. A este tejido aberrante e invasivo se le llama *pannus*. Pero no solo actúa a nivel local. Los sinoviocitos fibroblásticos activados diseminan la enfermedad a las otras articulaciones (Lefèvre et al, 2009). Otro cambio importante asociado con la AR es la infiltración celular en la cavidad sinovial. Hasta un 50% de estas células son linfocitos T CD4+ de memoria que mantienen la enfermedad o producen centros germinales ectópicos donde los linfocitos B proliferan (Humby et al, 2009). En este infiltrado celular también se encuentran en gran número CPA, mientras que las proporciones de neutrófilos se ven muy disminuidas. La activación y cambio de fenotipo de los fibroblastos sinoviales a tejido invasivo desemboca en la degradación de la matriz extracelular. Esto provoca la activación de los condrocitos con la liberación de mediadores catabólicos y osteoclastogénesis sinovial, lo que conduce a la destrucción del cartílago y hueso (Smolen et al, 2016).

El daño en el hueso y cartílago articulares por la invasión sinovial es una de las características principales de la AR. Las células de la inmunidad innata contribuyen al daño articular pero los actores principales en la degradación de la articulación son los sinoviocitos tipo fibroblasto, que producen colagenasas y otras MMPs (Kiener et al, 2009). Además, los genes implicados en distintas vías que participan en la AR, como la vía de señalización de citocinas tipo interleucina (IL)-6, se encuentran más metilados en sinoviocitos tipo fibroblasto de pacientes con AR que en los osteoarthríticos, lo que lleva a pensar que los sinoviocitos artríticos tienen un fenotipo más agresivo (Ai et al, 2016). La destrucción ósea viene dada por la activación de los osteoclastos por los niveles elevados de RANKL (ligando del receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B) producido por linfocitos T, osteoblastos, macrófagos y sinoviocitos tipo fibroblasto (Schett and Gravallese, 2012).

### - Células del sistema inmune

Probablemente el componente más importante en el desarrollo del proceso artrítico es la pérdida de la tolerancia de las células inmunitarias ante los propios antígenos, es decir, el sistema inmune empieza a atacar al propio organismo. El MHCII es la proteína a través de la cual las CPA indican a las células efectoras los antígenos a los que deben atacar. Los alelos de MHCII con alto riesgo de que el paciente sea seropositivo para AR son MHC-DRB1\*04:01, \*04:04, \*04:05 y 01:01, mientras que el alelo MHC-DRB1\*03:01 representa un riesgo medio (Wehr et al, 2019). Estas mutaciones son importantes en el proceso de selección linfocitaria en el timo. Aquí, las CPA presentan los antígenos propios a los linfocitos inmaduros a través del MHC para que los que los reconocen entren en anergia y mueran (Huang et al 2012). Sin embargo, en la AR estos linfocitos contra los propios antígenos sobreviven y se liberan al torrente sanguíneo y a los ganglios linfáticos iniciando el ataque contra el propio organismo.

En un primer momento, las células dendríticas fagocitan los restos celulares de la homeostasis en el sinovio, para migrar después a los ganglios linfáticos y presentar estos antígenos a los linfocitos presentes. Sin embargo, estos cuerpos apoptóticos provocan la inactivación de las células dendríticas por la estimulación de la liberación del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ), la supresión de la maduración de las células dendríticas, el aumento de los linfocitos T reguladores específicos de los antígenos propios y la disminución de la proliferación de los linfocitos CD8+ citotóxicos (Tc) (Wehr et al, 2019). Durante la AR, las CPA del sinovio (macrófagos, sinoviocitos, células dendríticas, etc) aumentadas en número, presentan a través del MHCII mutado los antígenos de diferentes péptidos propios como vimentina, agregano o colágeno tipo II a las células T de memoria ya generadas por las células dendríticas y migradas al foco inflamatorio (Yu y Langridge, 2017). Esta

activación provoca la liberación masiva de mediadores inflamatorios que producen, prologan y empeoran la inflamación en el foco. Además, estas citocinas y mediadores provocan la diferenciación de linfocitos a sus formas proinflamatorias, entrando así en una retroalimentación positiva que lleva a la destrucción de la articulación.

Tanto los linfocitos B como los linfocitos T son actores principales en el desarrollo de la AR. Los primeros son responsables de la liberación de anticuerpos contra distintos antígenos muy presentes en la articulación. Y, por otra parte, las células T son las encargadas de mantener la respuesta inflamatoria en la articulación. Se caracterizan por expresar el antígeno CD3, coestimulador del receptor de células T (TCR). Los linfocitos T pueden subdividirse en dos poblaciones principales: los linfocitos T CD4+ (Th o cooperadores) que reconocen el MHCII y los linfocitos T citotóxicos o CD8+ capaces de reconocer el MHCI.

Los linfocitos T CD4+ pueden diferenciarse en distintos fenotipos que secretan patrones característicos de citocinas y promueven el desarrollo de la respuesta inmune. Los principales tipos celulares implicados en la AR son Th1, Th2, Th17, Th17 tipo Th1 y Treg (Tabla 1). Sin embargo, existen otros fenotipos presentes que participan en la inmunopatogénesis pero no a nivel de los anteriores. Estos son Th3, Th9, Th22 y linfocitos T foliculares (TF).

**Tabla 1: Principales tipos linfocitarios que participan en la artritis**

Subtipo de linfocitos	Factores de diferenciación	Principales citocinas	Factores de transcripción
<b>Th1</b>	INF $\gamma$ , IL-12	INF $\gamma$ , IL-12, TNF $\alpha$ , IL-2	T-bet
<b>Th2</b>	IL-4, IL-2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-13	GATA3, STAT6
<b>Th17</b>	IL-6, TGF $\beta$ , IL-23, IL-1 $\beta$	IL-17, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , GM-CSF	ROR $\gamma$ T
<b>Th1/Th17</b>	IL-12	IL-17, INF $\gamma$	ROR $\gamma$ T
<b>Treg CD4+</b>	TGF $\beta$ , IL-12	IL-10, TGF $\beta$	FOXP3, FOXO1
<b>Tc</b>	TNF $\alpha$ , INF $\gamma$	IL-6, TNF $\alpha$	-
<b>Treg CD8+</b>	IL-10	IL-4, IL-10	FOXP3
<b>B</b>	Contacto célula-célula (MHCII-TCR)	IL-10	-

Los linfocitos Th1 son el subtipo más frecuente de las células T. Se encargan de reaccionar ante patógenos intracelulares y de ayudar a los linfocitos B a producir anticuerpos. Su diferenciación viene dada por el estímulo de IL-12 e interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y su proliferación descontrolada es una de las causas de la autoinmunidad, a través de la liberación de mediadores

como  $TNF\alpha$ , IL-2, IL-12, linfotóxina e  $IFN\gamma$  (Ma y Phan, 2017; Jäger et al, 2009). Por otro lado, los Th2 se encargan de favorecer la resolución de la inflamación promoviendo la reparación de los tejidos y liberando IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. Sin embargo, su presencia excesiva puede llevar a enfermedades inflamatorias crónicas. Para ello, las citocinas IL-2 e IL-4, encargadas de su diferenciación, deben estar sobreexpresadas (Walker y McKenzie, 2018).

Los Th17 son un subtipo de linfocitos T cooperadores cuyo papel es el de promover la inflamación en los tejidos, que es la característica principal de las enfermedades inflamatorias crónicas como la AR. Ejercen esta función liberando IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22,  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  y el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) a través de la activación del receptor nuclear huérfano  $\gamma T$  relacionado con el receptor de ácido retinoico (ROR $\gamma T$ ). De hecho, ratones knock out en ROR $\gamma T$  son incapaces de producir Th17 (Ivanov et al, 2006). Las citocinas IL-6,  $TGF\beta$ , IL-23 e IL-1 $\beta$  tienen un importante papel en la diferenciación de los linfocitos Th17 (Van Hamburg y Tas, 2018). Una peculiaridad de los linfocitos Th17 descubierta recientemente es que son capaces de transdiferenciarse en condiciones inflamatorias a Th1, Th2 o Treg (antiinflamatorios). Durante las enfermedades inflamatorias crónicas y más en concreto la AR, las células transformadas en Th1 desde Th17 están incrementadas (Bazzazi et al, 2018). Durante esta transformación coexiste la activación de ROR $\gamma T$  junto con la expresión de Runx1 y T-bet, creando las Th17 tipo Th1 capaces de secretar IL-17 e  $IFN\gamma$ . Para la diferenciación a estas células es necesario que los linfocitos Th17 estén sometidos a la activación de IL-23, IL-12, IL-1 $\beta$  y concentraciones bajas de  $TGF\beta$  (Kamali et al, 2019).

Los linfocitos Treg también participan en la evolución de la AR. Estos linfocitos se encargan del mantenimiento de la tolerancia y de poner freno a la activación de las células inflamatorias como los otros linfocitos T. Se

caracterizan por la expresión del factor de transcripción *forkhead box P3* (FOXP3) que desencadena la liberación de IL-10 y TGF $\beta$ , dos mediadores antiinflamatorios potentes (Duggleby et al, 2018), la dependencia de IL-2, la sobreexpresión del antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4), receptor de membrana capaz de frenar la actividad linfocitaria T (Kondo et al, 2018), y la liberación de granzimas capaces de hacer entrar en apoptosis a las células efectoras del sistema inmune (Lu et al, 2017). Los linfocitos Treg son capaces de inhibir la expresión de ROR $\gamma$ T. Sin embargo, en un ambiente inflamatorio, los linfocitos Treg son capaces de expresar ROR $\gamma$ T e inhibir FOXP3 de tal manera que se convierten en Th17 (y viceversa) (Lee et al, 2016) siendo capaces de liberar IL-17 y TNF $\alpha$ , dos de las principales citocinas proinflamatorias (Jung et al, 2019a). Este hecho da mucha importancia al equilibrio entre células CD4+ROR $\gamma$ T+ y células CD4+FOXP3+.

Fisiológicamente, los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos propios alterados o partículas de antígenos intracelulares extraños, como virus presentados a través de MHCI, presente en todas las células del organismo. Durante el proceso artrítico los autoantígenos presentados en MHCI son reconocidos como extraños y las células son atacadas por los linfocitos T citotóxicos. Estas células son capaces de liberar citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF $\alpha$ , lo que les confiere un importante papel en la enfermedad. De hecho, se ha observado una relación entre el número de Tc y los distintos estadios de la enfermedad o durante la remisión de los brotes, tanto en sangre como en sinovio (Coulthard et al, 2012). Además de las células Treg CD4+, existen células reguladoras CD8+, CD25+, FOXP3+, que tienen la capacidad de inhibir *in vitro* la proliferación de las células T efectoras, de manera similar o incluso superior a las Treg CD4+. Aunque las células Treg CD8+ son menos sensibles que las Treg CD4+ a la activación por IL-2 *in vitro*, presentan una mayor sensibilidad a esta citocina *in vivo* (Churlaud et al, 2015). Además, la estimulación con IL-2 provoca una expansión mucho más elevada de estas

células en comparación con las CD4+ lo que les da un carácter interesante como terapia combinada con los Treg CD4+ para enfermedades autoinmunes (Tao et al, 2017).

Las células Treg CD8+ producen citocinas antiinflamatorias, expresan proteínas de membrana inhibitorias, liberan enzimas citotóxicas y degradan el ATP extracelular. Así, su función reguladora está determinada por la producción de IL-10 y TGF $\beta$  y la expresión de CTLA-4 en la membrana (Petrelli y van Wijk, 2016).

La otra gran familia, los linfocitos B, desempeña un papel clave en el progreso de la AR. La función básica de estas células es la neutralización, a través de anticuerpos, de antígenos extraños. Estos anticuerpos son capaces de reclutar células del sistema inmune, así como de activar el complemento para provocar la destrucción de patógenos. En la AR estas células también pierden la tolerancia ante antígenos propios. Se hipotetiza que la pérdida de esta tolerancia viene dada por diferentes alelos de MHCII en las CPA, por la hiperglicosilación de la inmunoglobulina formadora del receptor de células B (BCR) o por ambas a la vez (Volkov et al 2020). Esta estimulación de los linfocitos B con la ayuda de las células T desencadena una expansión de las células plasmáticas y la liberación masiva de autoanticuerpos (Scherer et al, 2018). Los anticuerpos más estudiados son el FR y los ACPA, capaces de inducir, a través de diferentes vías, un cambio fenotípico en las diferentes células del sistema inmune y del sinovio. Por ejemplo, activan la proliferación de osteoclastos, inducen la liberación de citocinas proinflamatorias en macrófagos guiándolos a un fenotipo M1 proinflamatorio y favorecen la activación del complemento (Dong et al, 2018; Alivernini et al, 2019) (Figura 3).

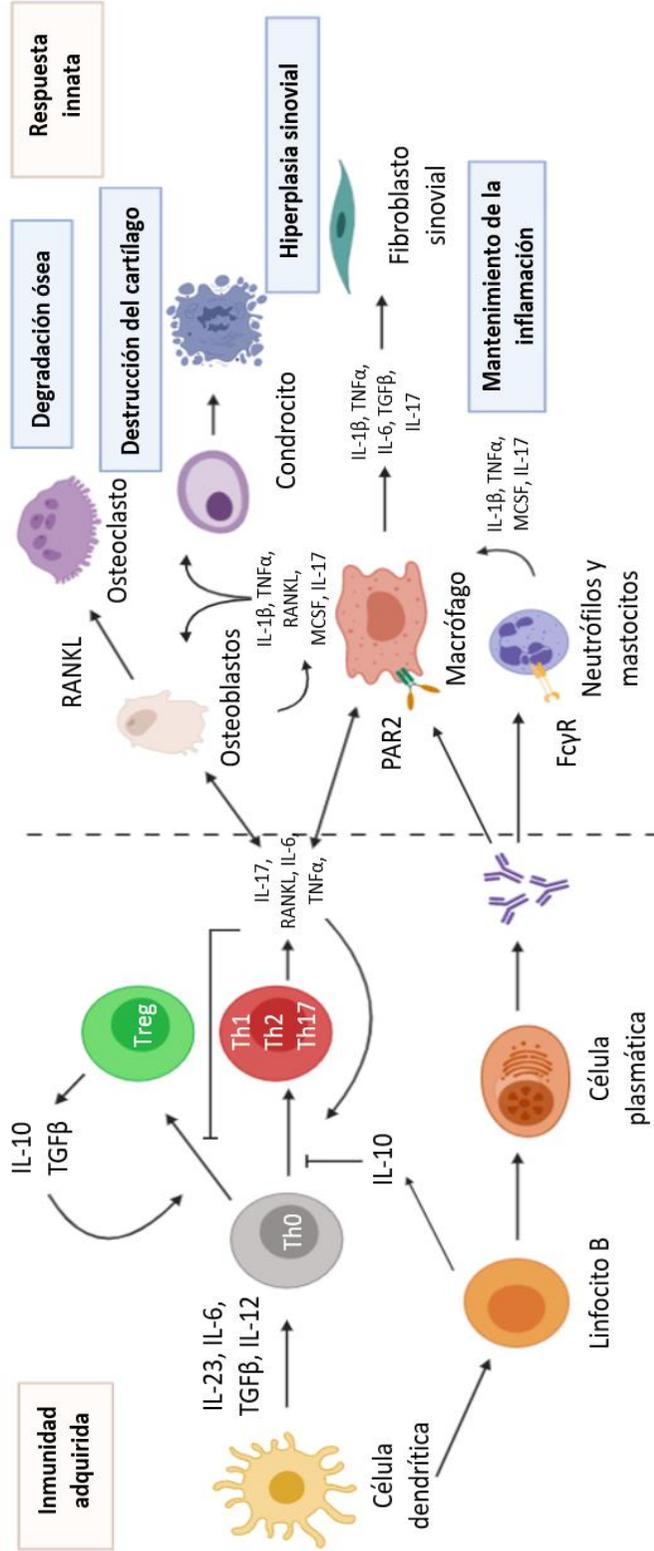


Figura 3: Relación entre las células clave en la patología de la AR. PAR2= receptor activado por proteasas 2 (Modificada de McInnes y Schett, 2007).

### **-Condrocitos**

Las articulaciones diartrodiales unen dos superficies óseas cubiertas por un cartílago hialino que proporciona una interfaz de fricción baja. La matriz extracelular del cartílago está compuesta por colágenos de tipo II, IX y XI, que aportan resistencia al impacto y promueven la retención de los proteoglicanos (Otero y Goldring, 2007).

Los condrocitos tienen una función homeostática en el cartílago y mantienen un equilibrio estable entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz, respondiendo rápidamente a la carga o al daño producido (Sherwood et al, 2014). En condiciones normales, la proliferación de condrocitos es limitada y la penetración de otras células del sinovio y del sistema inmune es escasa. Por ello, los condrocitos obtienen los nutrientes por difusión de la superficie articular o del hueso subcondral.

La destrucción durante el proceso artrítico aparece en primer lugar en las zonas límite con el tejido aberrante llamado *pannus*, donde se genera el mayor daño al cartílago. Estas zonas son ricas en MMPs, secretadas por las células formadoras del tejido aberrante.

Los productos de la degradación del cartílago pueden utilizarse como marcadores de la lesión y podrían ser autoantígenos potenciales en la inducción y mantenimiento de la inflamación artrítica sinovial. Además, esta degradación provoca una alteración en los componentes de la matriz del cartílago, que se enriquece, además de las MMPs, de distintas citocinas durante la AR. IL-1 $\beta$  tiene la capacidad de estimular la producción de la mayoría de las MMPs. TNF $\alpha$  produce los mismos efectos que IL-1 $\beta$ , incluyendo la estimulación de la producción de MMPs y la supresión de la síntesis de la matriz (Otero y Goldring, 2007).

Ambas citocinas estimulan la producción de otras citocinas como IL-6 e IL-17. Esta última es un potente inductor del catabolismo de los condrocitos por ella misma o en combinación con las demás citocinas proinflamatorias (Roeleveld y Koenders, 2015). Además, es capaz de unirse a sus receptores en las células madres mesenquimales del cartílago artrítico, inhibiendo su potencial condrogénico, y reduciendo por tanto la capacidad de reparación del cartílago en la AR (Schminke et al, 2016) (Figura 3).

Además, de la producción de proteinasas, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  inducen la producción de óxido nítrico (NO) y de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) por el aumento de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), respectivamente. También inducen la liberación de la quimiocina IL-8.

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina aumenta la diferenciación de los osteoblastos y suprime la diferenciación de los condrocitos a partir de las células progenitoras comunes. Durante la condrogénesis, Wnt/ $\beta$ -catenina actúa a dos niveles. A concentraciones bajas promueve la diferenciación, pero a concentración muy elevada provoca la osificación por diferenciación hipertrófica (Otero y Goldring, 2007).

En la AR, un inhibidor de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, proteína relacionada con DKK-1, se encuentra muy expresado en el sinovio inflamado, bloqueando la diferenciación tanto de osteoblastos como de condrocitos. Es decir, la capacidad reparadora del cartílago y del hueso está inhibida (Harre y Schett, 2017). Existe otro inhibidor de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, esclerostina (SOST). Tanto en la AR como en la artritis idiopática juvenil sus niveles están aumentados en suero y en sinovio. Se ha observado que su neutralización mejora la pérdida ósea a nivel sistémico en la artritis inducida por colágeno en ratón (Marenzana et al, 2013). También se ha descrito que la administración de anticuerpos anti-esclerostina previene la erosión ósea y la degradación del

cartílago en ratones transgénicos que expresan TNF $\alpha$  humano, sin modificar la inflamación articular (Chen et al, 2013)

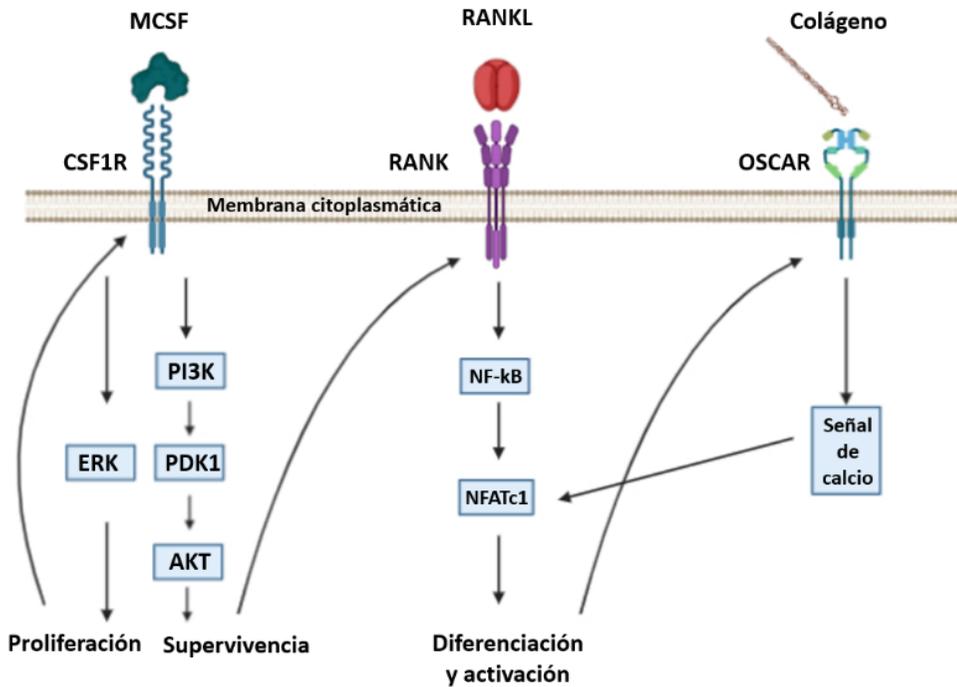
### **-Osteoclastos**

Los osteoclastos son células multinucleadas derivadas de la línea hematopoyética mieloide que se encargan, junto a los osteoblastos, del remodelado óseo. Su activación provoca la degradación del hueso y en enfermedades inflamatorias crónicas como la AR, la estimulación de estas células es continua y la degradación del hueso es masiva en la zona articular provocando invalidez funcional.

El origen de los osteoclastos es principalmente del sistema monocito-macrófago. Sin embargo, no se ha dilucidado todavía la procedencia de estos en el *pannus* y en el tejido sinovial. La membrana sinovial de pacientes con AR contiene dicho tipo celular (Schett, 2007) pero también las células dendríticas, muy presentes en la articulación durante la AR, son capaces de diferenciarse en osteoclastos (Rivollier et al, 2004). Además, se ha visto que existen zonas fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP) positivas en la médula ósea de los huesos subcondrales, indicando que estos osteoclastos proceden de la médula (Bugatti et al, 2005).

La activación de los osteoclastos en condiciones fisiológicas se lleva a cabo por dos señales distintas: la primera se da por la activación del receptor RANK por su ligando endógeno RANKL, secretado por osteoblastos en función de las necesidades del organismo. RANK, activado, recluta el factor 6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) y este, a su vez, activa los factores de transcripción factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y proteína activadora 1(AP-1) (c-fos y c-jun) que llevan a la transcripción del gen factor nuclear de células T activadas 1 (NFATc1), indispensable para la diferenciación y activación de osteoclastos. La

segunda vía de activación de osteoclastos se da por las distintas señales de las concentraciones de calcio en el organismo. A través del receptor asociado a osteoclastos tipo inmunoglobulina (OSCAR) o el receptor gatillo expresado en células mieloides 2 (TREM-2) activan la subunidad gamma del receptor de la fracción constante de inmunoglobulinas (FcR $\gamma$ ) y la proteína activadora DNAX de 12kDa (DAP12) que provocan la translocación de NFATc1 por su defosforilación. Este receptor se activa al contacto con colágeno tipo I y tipo II, los más presentes en cartílago y hueso articular. En ambas vías la activación de NFATc1 provoca un ciclo de retroalimentación positiva sobre su propio gen, amplificando la señal. De esta manera, la cadena de los principales genes de proliferación y activación de los osteoclastos empieza con la expresión aumentada del receptor RANK en monocitos cuando es activado el receptor (CSF1R) del factor estimulador de colonias de monocitos (MCSF). La activación de RANK lleva a la activación de NFATc1 que provoca la sobreexpresión de OSCAR (Kim y Kim, 2016) (Figura 4). Además de activar la expresión de RANK en el monocito, la activación de CSF1R activa la vía de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) que lleva al aumento de la proliferación de los monocitos. En esta vía un factor importante es MED24 (subunidad 24 del complejo mediador) que es fosforilado por ERK y activa la transcripción de los genes proliferativos (Hamilton et al, 2019) que a su vez estimulan la expresión de CSF1R.



**Figura 4: Esquema de los procesos celulares en la activación y diferenciación de monocitos para transformarse en osteoclastos.** PI3K= fosfoinositol-3 quinasa, PDK1=proteín quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositida, AKT= proteín quinasa B (Modificada de Kim y Kim, 2016).

En la AR la presencia en el sinovio de diferentes citocinas proinflamatorias liberadas durante la enfermedad lleva a la diferenciación y activación de las células multinucleadas por diferentes vías aparte de las ya descritas. TNF $\alpha$  junto con IL-1 $\beta$  e IL-6 promueven la diferenciación a osteoclastos aumentando la actividad de NF- $\kappa$ B, AP-1 (c-fos, c-jun) y proteín quinasa activadas por mitógeno (MAPK) y, estos, a su vez, activan NFATc1, desencadenando la amplificación de la señal antes descrita. Sin embargo, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6 actuando individualmente no son capaces de promover esta respuesta. Es necesaria la combinación de varias señales para que se

desarrollen los osteoclastos (Jung et al, 2019b).  $TNF\alpha$  a concentraciones muy altas es capaz de producir la diferenciación de los osteoclastos pero no son resorptivos (Kobayashi et al, 2000).  $TNF\alpha$  a menor concentración junto con IL-6 la promueven en médula ósea independientemente de RANKL (O'Brien et al, 2016), al igual que con IL-1 $\beta$  (Kobayashi et al, 2000). También IL-1 $\beta$  e IL-6 en presencia de concentraciones bajas de RANKL son capaces de desencadenar la cascada hasta la activación de NFATc1. En definitiva, la hiperproducción de citocinas proinflamatorias durante la AR provoca la proliferación excesiva de los osteoclastos y como consecuencia la destrucción ósea.

Durante la AR se liberan diferentes autoanticuerpos capaces de inducir y empeorar la enfermedad. Uno de ellos son los ACPA, capaces de unirse a la vimentina citrulinada de la membrana de los precursores de osteoclastos y osteoclastos maduros. La unión determina la activación celular incluso cuando no existe inflamación, induciendo la producción de IL-8 por los osteoclastos y por ende, la migración leucocitaria. Por ello, se especula que el inicio de la inflamación articular podría estar relacionado con la activación de los osteoclastos por los ACPA producidos en pulmón o intestino. Así podría explicarse la afectación articular pero no sistémica en la fase inicial de la AR (Krishnamurthy et al, 2016). La presencia de IL-8 en la articulación provoca la migración de neutrófilos capaces de estimular la respuesta inflamatoria en la zona a través de la liberación de citocinas proinflamatorias.

No obstante, el mantenimiento y retroalimentación de la enfermedad inflamatoria en la AR no podría ocurrir sin la implicación de los linfocitos T, capaces de modificar el contexto inflamatorio a través de las citocinas liberadas por sus diferentes poblaciones. Este ambiente inflamatorio afecta la diferenciación de los osteoclastos. El IFN $\gamma$ , secretado principalmente por los linfocitos Th1 es capaz de suprimir la diferenciación a osteoclastos a través de la degradación de TRAF6 y el bloqueo de la expresión de catepsina K (Pang et

al, 2005). Por otro lado, la citocina más característica de los linfocitos Th2, IL-4, activa el receptor activado por proliferadores de peroxisomas  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) y el transductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT6) provocando la supresión de la diferenciación de los osteoclastos (Abu-Amer, 2001; Bendixen et al, 2001). Pero no son los únicos linfocitos capaces de bloquear la diferenciación de los osteoclastos, ya que los linfocitos T reguladores la bloquean por contacto directo vía CTLA-4 y no a través de IL-10 y TGF $\beta$  (Zaiss et al, 2007). Sin embargo, otros tipos de linfocitos pueden promover la diferenciación osteoclástica. De esta forma, los linfocitos Th17, a través de la producción de IL-17, IL-21 e IL-22, son causantes directos de la degradación del hueso durante la AR (Kim et al, 2015).

### **-Osteoblastos**

Las células formadoras de hueso son los osteoblastos y se originan a partir de las células madre mesenquimales. Los progenitores de osteoblastos expresan dos factores de transcripción clave: Runx2 y osterix (Komori, 2018; Wang et al, 2016). Una de las vías más importantes en la diferenciación de estas células es la vía canónica de Wnt/ $\beta$ -catenina. Durante su maduración, los osteoblastos ganan la capacidad de formar matriz ósea y su mineralización.

Los osteoblastos maduros, junto con otras células, liberan osteoprotegerina (OPG), un receptor soluble de RANKL, que impide que se una a su receptor RANK y así provocan la inhibición de los osteoclastos. Durante la AR el ratio RANKL/OPG se dispara, induciendo la degradación pronunciada del hueso (Van Tuyl et al, 2010).

La vía Wnt/ $\beta$ -catenina se activa por los ligandos Wnt y promueve la transcripción de los genes de diferenciación y maduración de los osteoblastos, favoreciendo así la formación del hueso. Para regular esta vía existen 3 tipos

de antagonistas endógenos principales: DKK-1, SOST y la familia de proteínas *frizzled* (FRPs). El receptor de los ligandos Wnt es el LRP5/6. DKK-1 se une a los dominios BP1, BP3 y kremen provocando la internalización del receptor. Esclerostina se une a la subunidad BP1 compitiendo con los ligandos Wnt. Y finalmente, las proteínas FRPs actúan como receptores solubles de Wnt produciendo su inactivación (Maeda et al, 2019). Durante la AR hay un aumento de la expresión de estos inhibidores tanto en el sinovio como en suero, provocando que la formación del hueso quede inhibida.

Además de esta vía, las diferentes citocinas liberadas durante la AR son capaces de producir la depleción de los osteoblastos. TNF $\alpha$  disminuye la expresión de Runx2 y osteocalcina (OC) en los osteoblastos maduros contribuyendo a la inhibición de la diferenciación de los pre-osteoblastos. IL-1 $\beta$  disminuye la producción de fosfatasa alcalina y colágeno tipo II lo que lleva a una disminución de la densidad ósea. IL-17 actúa en los fibroblastos articulares y en los osteoblastos induciendo la expresión de RANKL y de PGE $_2$ , lo que determina la activación de los osteoclastos (Shim et al, 2018). Por su parte, IL-6 inhibe las proteínas morfogénicas óseas BMP-2 y BMP-7, así como la diferenciación de los osteoblastos (Panagopoulos y Lambrou, 2018).

El desequilibrio en el ratio RANKL/OPG, la alteración de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y la acción de las diferentes citocinas en el osteoblasto y en el osteoclasto provocan la desmineralización del hueso subcondral y la pérdida de la funcionalidad de las articulaciones durante la AR (Figura 3).

### 1.1.3.4 Citocinas y mediadores implicados

Las células del sistema inmune tienen la necesidad de estar en continuo contacto y comunicación a través de diversas señales capaces de activar diferentes tipos de respuesta según la necesidad del momento. A estos mediadores se les llama citocinas y cuando se produce la desregulación de su equilibrio durante la AR son capaces de agravar la patología de la enfermedad. En este sentido, existen citocinas proinflamatorias, que empeorarán los síntomas de la enfermedad y citocinas antiinflamatorias, cuyo aumento llevará a la mejoría de esta. No obstante, diferentes citocinas pueden actuar de diversas formas según la enfermedad.

#### **-Citocinas proinflamatorias**

Durante la AR existe un desequilibrio de la inmunidad que dirige la respuesta a través de citocinas hacia un carácter proinflamatorio. Así, las principales citocinas proinflamatorias que se ven aumentadas son IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ . La primera es capaz de aumentar la liberación de citocinas fibroblásticas y monocíticas, así como MMPs, especies oxigenadas o nitrogenadas reactivas y prostaglandinas (McInnes y Schett, 2007). El TNF $\alpha$  dirige la activación de leucocitos, su migración y adhesión, la activación endotelial y angiogénesis y provoca la disminución de la síntesis de colágeno (McInnes et al, 2016). IL-6 también tiene un importante papel, aumentando la proliferación de linfocitos B y la liberación de anticuerpos, así como la diferenciación, proliferación y citotoxicidad de los linfocitos T (McInnes y Schett, 2007). Además, IL-6 es capaz de provocar los mismos efectos en el sinovio que los inducidos por TNF $\alpha$  y es la citocina que guía la fase aguda de la AR (McInnes et al, 2016). La IL-17 tiene un papel fundamental en la patología de la enfermedad. Liberada por los linfocitos Th17 al ser estimulados por IL-23, aumenta la liberación de las demás citocinas proinflamatorias por los linfocitos y las células residentes del

sinovio. También favorece la osteoclastogénesis y disminuye la síntesis de colágeno. Por otro lado, el IFN $\gamma$  (tipo II) es liberado por los linfocitos T CD4+ y por las células “*natural killer*” (NK) y provoca el aumento de la fagocitosis.

Además de las citocinas que afectan de forma amplia a la mayoría de las células implicadas en la enfermedad, existen algunas que van dirigidas a tipos celulares concretos. Una de ellas es RANKL, que es liberada por los linfocitos T, osteoblastos y células sinoviales. RANKL induce la diferenciación y la activación de los osteoclastos y estimula, así, la resorción ósea (McInnes y Schett, 2011). También es necesaria la participación de GM-CSF para la diferenciación osteoclástica a partir de monocitos. Durante la AR este factor está aumentado, provocando la diferenciación excesiva de este tipo celular a perfiles proinflamatorios y, en presencia de RANKL, a osteoclastos (McInnes y Schett, 2007).

Finalmente, existen otros factores que fomentan el aumento de la inflamación local como es el caso de la quimiocina IL-8, que es liberada por las células de la inmunidad innata y es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos. IL-8 favorece la expresión de moléculas de adhesión y estimula la angiogénesis. Además de IL-8, el factor de crecimiento vascular endotelial tiene un importante papel en la formación de nuevos vasos en el sinovio y también aumenta la permeabilidad vascular (Maruotti et al, 2006).

#### **-Citocinas antiinflamatorias**

En situaciones fisiológicas las citocinas antiinflamatorias o inmunomoduladoras contrarrestan los efectos de las proinflamatorias para controlar la inflamación y, en último término, favorecer la resolución del proceso. Sin embargo, en una enfermedad crónica como es la AR la producción de estos mediadores es insuficiente para controlar la inflamación masiva.

La IL-4 es una potente citocina antiartrítica liberada por los linfocitos Th2. Es capaz de suprimir la degradación del cartílago articular, así como, la osteoclastogénesis. Además, disminuye la liberación de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  de los macrófagos sinoviales. Por otro lado, la citocina inmunomoduladora por excelencia es la IL-10 que, liberada por los linfocitos Treg CD4+, Treg CD8+, B reguladores (Breg) y macrófagos M2, es capaz de bloquear la respuesta inflamatoria. Ambas citocinas se encuentran sobreexpresadas durante la enfermedad articular sin que se sepa claramente por qué. Sin embargo, no son capaces de bloquear la respuesta inflamatoria. Finalmente, TGF $\beta$  promueve la diferenciación de Treg junto a IL-10 (Chen et al, 2019) (Tabla 2).

**Tabla 2: Células secretoras e implicación de diferentes citocinas en la AR**

Citocina	Células secretoras	Implicación en AR
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Monocitos, linfocitos B, sinoviocitos fibroblásticos y condrocitos	Aumento de la liberación de citocinas, quimiocinas, enzimas degradativas y otros mediadores por monocitos y fibroblastos
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Monocitos, linfocitos T, linfocitos B, NK, polimorfonucleares, mastocitos, fibroblastos y osteoblastos	Aumento de la liberación de citocinas, quimiocinas, enzimas degradativas y otros mediadores por monocitos y fibroblastos. Aumento del estrés oxidativo por polimorfonucleares
<b>RANKL</b>	Osteoblastos, linfocitos T	Estimula la degradación ósea a través de la diferenciación y activación de los osteoclastos. Modula la interacción entre linfocitos T y células dendríticas
<b>IL-17</b>	Th17, fibroblastos sinoviales	Aumenta la liberación de citocinas y MMPs por los sinoviocitos. Estimula la osteoclastogénesis. Aumenta la liberación de citocinas proinflamatorias por leucocitos. Disminuye la síntesis de colágeno por condrocitos
<b>IL-23</b>	Macrófagos y células dendríticas	Proliferación de Th17
<b>IL-10</b>	Monocitos, Treg, linfocitos B, células dendríticas y células epiteliales	Disminuye la activación de células T, células dendríticas, fibroblastos sinoviales y provoca cambio de isotipo de células B.
<b>IL-6</b>	Monocitos, fibroblastos sinoviales, linfocitos B y T	Aumenta la proliferación de células B y T. Estimula la liberación de anticuerpos y aumenta la diferenciación y citotoxicidad de los linfocitos T
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Monocitos, linfocitos T, plaquetas y sinoviocitos fibroblásticos	Activación de la inflamación y posterior resolución

### 1.1.3 Tratamiento farmacológico y pautas terapéuticas

La farmacoterapia actual de la AR está basada en la estrategia “Treat-to-target”. Esta estrategia propone como meta terapéutica la remisión clínica de la enfermedad o un estado de bajo nivel de actividad clínica. Se hace una evaluación del paciente en cada visita médica y, según si se ha llegado a un objetivo o no, se ajusta o cambia el tratamiento (Cardiel, 2013).

Para evaluar la progresión o remisión de la AR, la Liga Europea Contra el Reumatismo (EULAR) junto con el Colegio Americano de Reumatología (ACR) proponen dos índices para medir esta remisión: el índice clínico de la actividad de la enfermedad (CDAI) e índice simplificado de la actividad de la enfermedad (SDAI). Ambos son la suma de ciertas variables y puntuaciones. Así, el objetivo de los profesionales sanitarios es conseguir la remisión de la enfermedad o, al menos, una baja actividad. Las cifras para considerar que se ha conseguido la meta son  $\leq 2,8$  para CDAI o  $\leq 3,3$  para SDAI. Cualquier tratamiento debe conseguir, al menos, el 50% de la disminución de la actividad en los 3 primeros meses (Smolen et al, 2018) y el objetivo en máximo 6 meses (Smolen et al, 2020). Si no se llega al primer 50% de disminución de la actividad, es muy improbable que se llegue al objetivo final en los 6 meses por lo que es recomendable cambiar el tratamiento (Aletaha et al, 2016).

Desde 2014 se propuso cambiar la nomenclatura de los grupos de fármacos para la terapia de la AR. Smolen y colaboradores reunieron todos los fármacos en la gran familia de fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs) menos los GC y AINEs. Los DMARDs los clasifican en sintéticos y biológicos. Los primeros, a su vez se subdividen en convencionales (csDMARDs) y en dirigidos (tsDMARDs). Los segundos se agrupan en dos

grupos: derivados biológicos originales (boDMARDs) y biosimilares (bsDMARDs) (Smolen et al, 2014).

En el grupo de los csDMARDs se encuentran el metotrexato (MTX), leflunomida, sulfasalazina e hidroxicloroquina. En los tsDMARDs podemos distinguir los inhibidores de las JAK (Janus quinasas) baricitinib, tofacitinib y upadacitinib. Seguidamente, los boDMARDs incluyen los inhibidores del TNF $\alpha$  adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab e infliximab; los inhibidores del receptor del IL-6 sarilumab y tocilizumab; los inhibidores de la coestimulación de linfocitos como el abatacept; y el rituximab como bloqueante de CD20 en linfocitos B. Finalmente, los bsDMARDs engloban adalimumab, etanercept, infliximab que, a la vez, son boDMARDs. Todos los biológicos se consideran bDMARDs (Tabla 3) (Smolen et al, 2020).

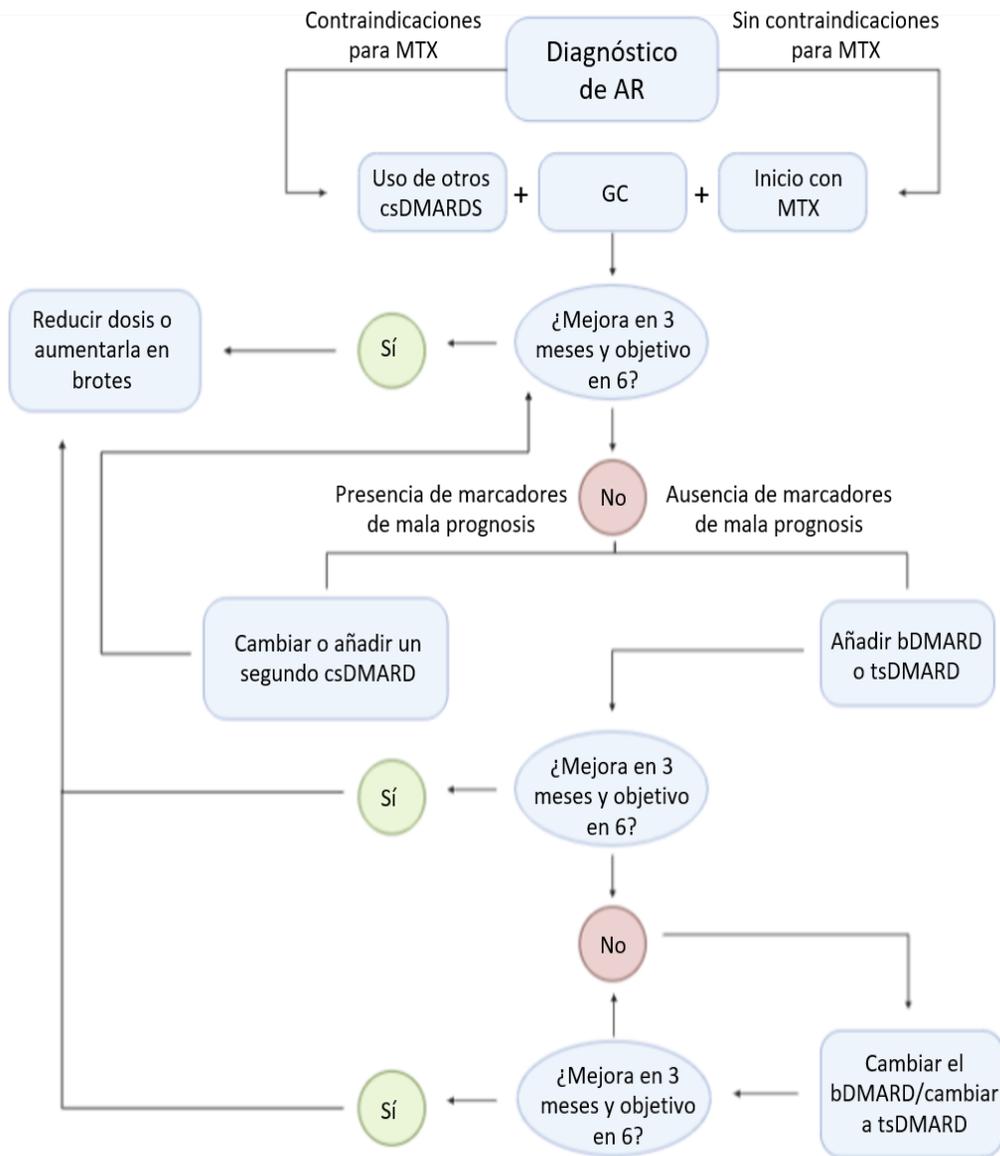
El tratamiento debe iniciarse tan pronto como se diagnostique la enfermedad y con el objetivo de reducir la actividad de la enfermedad al máximo. Se monitoriza al paciente con visitas cada 1 a 3 meses. En el caso de que no se alcance el objetivo a los 6 meses, hay que cambiar el tratamiento. El tratamiento para la AR hay que iniciarlo siempre con MTX si no hay contraindicaciones. La dosis se aumenta 0,3 mg/kg cada semana durante 4-6 semanas para conseguir una mayor tolerancia hasta conseguir 20-25 mg por semana (Gaujoux-Viala et al, 2017). En el caso de que haya contraindicaciones para el MTX se utilizará en su lugar leflunomida o sulfasalazina, reservando la hidroxicloroquina para casos leves de la enfermedad. Junto con uno de estos fármacos se recomienda administrar GC cuya dosis debe retirarse poco a poco a la vez que se aumenta la de los csDMARDs. En el caso de que no se alcancen los objetivos con el primer tratamiento, pero no haya una mala prognosis, puede considerarse el uso de otro csDMARD.

**Tabla 3: Clasificación de los fármacos utilizados para el tratamiento de la AR**

DMARDs sintéticos		DMARDs biológicos
Convencionales	Dirigidos	
<p>MTX</p> <p>Leflunomida</p> <p>Sulfasalazina</p> <p>Hidroxicloroquina</p>	<p>Baricitinib</p> <p>Tofacitinib</p> <p>Upadacitinib</p>	<p><b>Derivados biológicos originales:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Inhibidores de TNF:</b> Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Golimumab e Infliximab</li> <li>- <b>Bloqueantes del receptor de IL-6:</b> Sarilumab y Tocilizumab</li> <li>- <b>Inhibidores de la coestimulación de linfocitos:</b> Abatacept</li> <li>- <b>Anti-CD20:</b> Rituximab</li> </ul> <p><b>Biosimilares:</b> Adalimumab, Etanercept, Infliximab, Rituximab</p>

En el caso de que la prognosis sea mala hay que considerar el inicio de tratamiento con tsDMARDs o bDMARDs poniendo por delante el uso de los primeros ya que, administrados junto con MTX, se han visto que son más eficaces que el adalimumab con MTX (Taylor et al, 2017; Fleischmann et al, 2019). No obstante, se han observado reacciones adversas en forma de tromboembolismo pulmonar en pacientes con tsDMARDs por lo que hay que

ir con mucho cuidado con los pacientes con riesgo de eventos trombóticos. Se ha observado también que el uso concomitante de MTX con tsDMARDs o bDMARDs aumenta la eficacia de los DMARDs (Maini et al, 1998) por lo que esta estrategia es muy recomendable ya que estos efectos se observan a dosis de MTX de 10 mg/semana (Burmester et al, 2015). En el caso de que el tratamiento no funcionara, debe sustituirse el fármaco utilizado hasta el momento por otro DMARD con diferente mecanismo de acción entre los tsDMARD o bDMARD. Finalmente, en el caso de que se consiga el objetivo, durante el primer tratamiento con GC, estos pueden ser retirados progresivamente y si se mantienen los objetivos, se puede considerar la retirada progresiva de los DMARDs. Por todo ello el tratamiento elegido debe ser una consideración entre eficacia, coste y seguridad y se realizará de manera individual (Smolen et al, 2020) (Figura 5).



**Figura 5: Algoritmo terapéutico para el tratamiento de la AR (Modificada de Smolen et al, 2020)**

Realmente, en la actualidad, no existe ningún tratamiento capaz de curar la AR. Los tratamientos empleados se basan en disminuir la inflamación sinovial para evitar o disminuir el daño en la articulación y se le da mucha importancia al diagnóstico precoz para tener una buena prognosis, hasta el

punto de que se está estudiando el uso de los fármacos antiartríticos como prevención ante una posible AR y así evitar la degradación articular que ya no se recupera (Smolen et al, 2018). Sin embargo, parece ser que el único fármaco capaz de prevenir el desarrollo de la AR en parte de la población es el metotrexato, solo (van Aken et al, 2014) o en combinación con infliximab (Stamm et al, 2018). Por ello, y porque no todos los pacientes son respondedores a las terapias actuales (Smolen et al, 2016), es necesario seguir investigando tanto en la búsqueda de nuevas dianas, fármacos y estrategias terapéuticas que frenen el avance de la enfermedad e incluso que pudieran revertir el daño ya provocado a nivel articular.

## 1.2 PTHrP

La historia de PTHrP se remonta a 1941 cuando se observó que los pacientes oncológicos presentaban niveles de calcemia muy elevados y niveles de fosfatemia muy disminuidos. Esto fue asociado a que los tumores producían PTH, ya que cursaba con los signos de hiperparatiroidismo. Sin embargo, con el avance de las técnicas de detección se determinó que los niveles de paratohormona (PTH) eran normales, y además, se vio por inmunohistoquímica que estos tumores eran negativos a PTH pero favorecían la resorción ósea. Más adelante se observó que la actividad similar a PTH liberada por los tumores *in vitro* era inhibida por antagonistas de PTH, de tal forma que los tumores liberaban una molécula capaz de activar los receptores PTH, pero no era PTH (Martin, 2016). Así, se le asignó el nombre de péptido relacionado con PTH (PTHrP).

Con el paso de los años se secuenciaron PTH y PTHrP y se pudo observar que tenían homología en la región N-terminal 1-34. También se determinó que la región N-terminal 1-13 estaba relacionada con la activación del receptor de paratohormona 1 (PTH1R) y la 29-34 era imprescindible para su unión (Esbrit

y Alcaraz, 2013). De aquí los efectos homólogos de PTH y PTHrp. Además, se observó que esta proteína estaba presente en muchos tejidos, lo que indicaba que debería tener otras funciones aparte de las derivadas de la activación del receptor de PTH a nivel óseo. Se continuaron haciendo estudios y se pudo ver que la región C-terminal, más en concreto la 107-139, reducía la actividad de los osteoclastos y aumentaba la de los osteoblastos. Finalmente, se observó que este efecto estaba provocado por la región 107-111, a la que se le llamó osteostatina (OT) (Martin, 2016).

Es importante destacar que osteostatina es invariable en las especies animales más cercanas a los humanos, por lo que podría ser una terapia bien tolerada en humanos después de los estudios en animales (Martin, 2016).

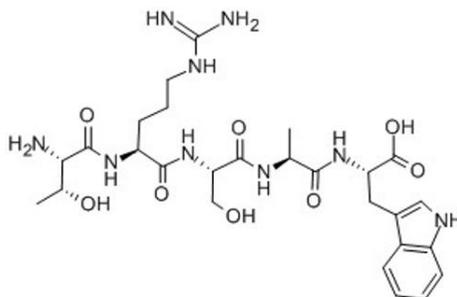
La AR se caracteriza por una alteración importante en la homeostasis del hueso derivando a ésta hacia la resorción ósea (Scholtysek et al, 2012). La presencia de altas concentraciones de PTHrP en las articulaciones de pacientes artríticos hace pensar que esta proteína participa en la regulación de las diferentes células articulares como condrocitos, osteoblastos o linfocitos (Kohn et al, 1997).

### 1.3 Péptidos derivados de PTHrP

Los péptidos derivados de PTHrP han sido estudiados para el posible tratamiento de enfermedades en las que existe un catabolismo del hueso. De esta manera, por ejemplo, abaloparatida o PTHrP(1-34) humana ha sido aprobada por la FDA ya que se ha observado que disminuye el riesgo de fractura en mujeres post-menopáusicas con riesgo de fractura grave por osteoporosis (Leder et al, 2020). No obstante, podría ser que la actividad de PTHrP no estuviera restringida al fragmento N-terminal, sino que también la presentara el C-terminal. De hecho, en estudios con ratones se ha visto que la administración subcutánea de PTHrP (107-139) (C-terminal) durante 2-4

semanas es capaz de reducir la pérdida de masa ósea en animales ovariectomizados (De Castro et al, 2012), con tratamiento de GC (De Castro et al, 2009) o en modelos de osteopenia inducida por diabetes (Lozano et al, 2011).

Fue en 1999 cuando la OT se patentó como molécula capaz de inhibir la osteoclastogénesis (Kemp et al, 1999). Así, OT (PTHrP (107-111)), péptido formado por treonina-arginina-serina-alanina-triptófano (Figura 6), ha sido ensayado en implantes cargados con el péptido y ha demostrado tener propiedades osteogénicas (Ardura et al, 2016; Lozano et al, 2010) e incluso es capaz de potenciar algunas terapias para aumentar la formación de hueso (Lozano et al, 2012) y se ha patentado su uso en artrosis por sus propiedades antihipertróficas en condrocitos (Esbrit et al, 2017). Además, se ha observado que su administración en modelos de retraso de crecimiento en ratones palía los efectos en el hueso (Rodríguez-de la Rosa et al, 2014). Recientemente, estudios *in vitro* han demostrado que en ambientes proinflamatorios es capaz de reducir la senescencia de osteoblastos, la producción de metabolitos proinflamatorios como IL-6, PGE<sub>2</sub> y TNF $\alpha$ , la activación de la vía NF- $\kappa$ B (Platas et al, 2016) y el estrés oxidativo (Portal-Núñez et al, 2018). A pesar de estos estudios, todavía no se ha determinado si este péptido es capaz de controlar las condiciones inflamatorias articulares.



**Figura 6: Estructura molecular de osteostatina (OT)**

# OBJETIVOS



## 2. OBJETIVOS

La artritis reumatoide es una de las enfermedades autoinmunes inflamatorias con más prevalencia a nivel mundial. Sus manifestaciones articulares causan molestias, dolor, deformaciones e incapacidad, lo que lleva a un impacto personal y económico importante en la sociedad. A pesar de la batería de tratamientos actuales entre los que se incluyen los nuevos fármacos biológicos que consigue mejorar la calidad de vida de los pacientes, ninguno es capaz de parar el avance de la enfermedad y, además, carecen de la capacidad de recuperar la degradación producida en las articulaciones. Es por ello que es necesario continuar investigando en esta enfermedad y sus posibles tratamientos.

La respuesta inflamatoria e inmune desregulada y la afectación de los diferentes tejidos articulares hacen necesaria una actuación conjunta a todos estos niveles para lograr una alternativa terapéutica eficaz. En estudios previos, el péptido OT ha demostrado propiedades osteogénicas y antiosteoclásticas. También es capaz de disminuir la liberación de mediadores inflamatorios en osteoblastos y de ejercer efectos antihipertróficos en condrocitos. Todo ello sugiere su posible capacidad de mejorar los signos y síntomas de una enfermedad articular que engloba además de alteraciones del sistema inmune, la respuesta inflamatoria y la degradación condral y ósea. En la presente Tesis Doctoral se han empleado el modelo animal de artritis inducida por colágeno (CIA) y ensayos *in vitro* con células humanas para determinar los efectos de OT en una serie de procesos determinantes para la patología de la artritis reumatoide.

Así pues, los **objetivos de esta Tesis Doctoral** son:

- Estudiar el efecto de OT en el modelo CIA de artritis reumatoide.

- Determinar si este péptido puede controlar las respuestas inmune e inflamatoria en dicho modelo y si posee un efecto inmunomodulador en linfocitos humanos.
- Establecer la capacidad de OT de reducir la degradación ósea *in vivo* durante la artritis del modelo CIA, así como su actividad antiosteoclastogénica en células humanas.

# MATERIAL Y MÉTODOS



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

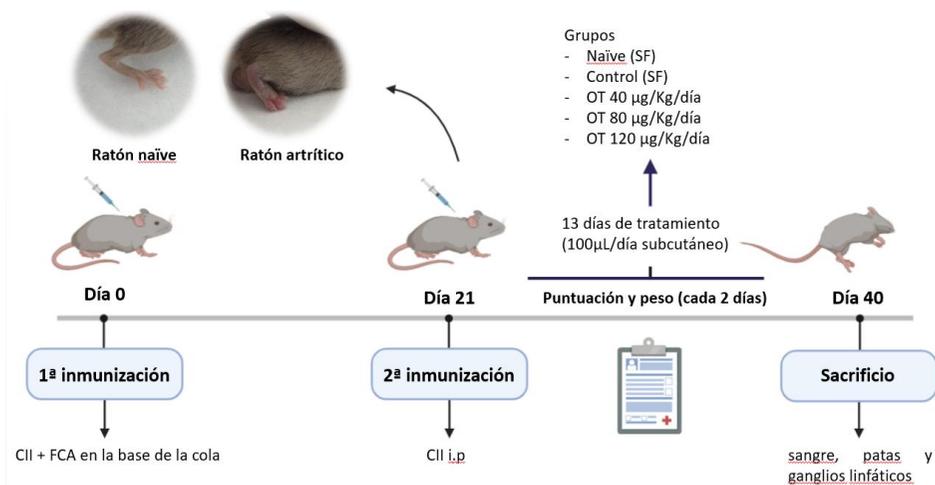
### 3.1 Artritis inducida por colágeno (CIA) en ratón

#### 3.1.1 Animales

Se usaron ratones DBA/1 machos (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, Francia) de entre 10 y 12 semanas (20-25 g) para todos los experimentos. Los ratones se estabularon en cajas de plástico (4 ratones por caja) con virutas de madera como cama y en sala silenciosa con 12h de luz y 12h de oscuridad. La temperatura se mantuvo constante en  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Todos los animales tuvieron agua y comida *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron en concordancia con los estándares europeos de regulación para el manejo de animales de laboratorio (Directiva 2010/63/EU y R. D. 53/2013 para España). El Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia aprobó los protocolos (ANEXOS).

### 3.1.2 Protocolo experimental

Para la inducción de la artritis se administró una emulsión formada por colágeno bovino tipo II (2 mg/ml) y adyuvante completo de Freund (BD, Franklin Lakes, New Jersey, EEUU) con *Mycobacterium tuberculosis* inactivado (BD), en la base de la cola por vía subcutánea. A día 0, los ratones fueron inmunizados con 100  $\mu$ l de la emulsión en la base de la cola. A día 21, se inyectó vía intraperitoneal una solución de colágeno tipo II (2 mg/ml, 100  $\mu$ l). Se disolvió el colágeno tipo II en suero fisiológico estéril (Figura 7) (Ferrándiz et al, 2008).



**Figura 7: Esquema del CIA.** CII = colágeno tipo 2, FCA = adyuvante completo de Freund, SF = suero fisiológico.

La artritis se manifiesta por la aparición de edema en las extremidades, tanto delanteras como traseras, que llega a afectar a diferentes zonas de las patas, incluyendo los compartimentos del tobillo. En estadios posteriores aparece enrojecimiento severo así como úlceras y deformación de las extremidades.

### 3.1.3 Grupos experimentales y tratamiento

Los ratones se repartieron aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales: grupo naïve, el cual no recibió ninguna inmunización (n=8); el grupo control, que se inmunizó pero no recibió tratamiento alguno (n=12); OT80, en el cual fueron inmunizados y recibieron la dosis de 80 µg/kg/día de OT (Bachem AG, Bubendorf, Suiza) en suero fisiológico (n=12); y OT120 los ratones que recibieron la dosis de 120 µg/kg/día (n=12). La dosis y frecuencia de administración se seleccionaron en experimentos piloto previos y se administró OT vía subcutánea.

Tras el inicio de la enfermedad (día 28), se les administró a los ratones tratados dosis diarias de 100µl de fármaco mientras que a los grupos naïve y control se le administró 100µl de suero fisiológico estéril. Este tratamiento se mantuvo durante 13 días. El día 40 los animales fueron sacrificados por dislocación cervical sacándoles previamente sangre del plexo retroorbital. Se extrajeron los ganglios linfáticos y las patas fueron quirúrgicamente seccionadas. Las patas traseras se procesaron para análisis histológico y un grupo de estas se homogeneizó para medir mediadores inflamatorios. Las patas delanteras se utilizaron para medir densidad ósea por rayos X.

### 3.1.4 Puntuación macroscópica de la artritis

La inflamación de las articulaciones se valoró visualmente pata a pata en una escala de 0-2 en función de la inflamación sufrida. 0 se consideró no inflamado, 1 inflamación suave, 1,5 inflamación marcada y 2 inflamación severa. Esta escala está hecha en base a los cambios en rubor, inflamación y ulceración de las patas. La valoración se realizó cada día por dos observadores

entrenados e independientes del experimento. Estos, además, eran ciegos al grupo experimental. El peso de los ratones también se evaluó para controlar su evolución.

### 3.1.5 Análisis histológico

Los tobillos se mantuvieron en paraformaldehído 4% en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,4 durante 3 semanas. Pasado este tiempo, se descalcificaron con Osteosoft<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 4 semanas. Las extremidades fueron deshidratadas y embebidas en parafina. Una vez endurecida, se hicieron secciones laterales del tejido (7  $\mu\text{m}$ ) con micrótopo Leica y se montaron en portaobjetos SuperFrost (Menzel-Gläser/Thermofisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU). Para determinar el grado de degradación articular se realizaron 3 tinciones: Hematoxilina-eosina, para estudiar la inflamación; Safranina O- Fast Green, para determinar la depleción del cartílago; y tinción TRAP, para evaluar la actividad osteoclástica.

La severidad de la inflamación se midió observando la migración celular en los cortes teñidos con Hematoxilina-eosina con la siguiente escala: 0 cuando no existen células infiltradas en la articulación, 1 cuando existe una migración ligera, 2 para una infiltración moderada y 3 cuando la migración celular ha sido masiva.

La depleción del proteoglicano se analizó mediante el uso de una escala de 0 a 3 en función de la intensidad de la tinción de safranina O que se une al proteoglicano del cartílago articular. La puntuación de 0 corresponde a la tinción máxima y 3 a la tinción mínima que corresponde a la depleción máxima de proteoglicano. La erosión del cartílago se determinó también con una escala de 0 a 3 donde 0 implica un cartílago normal y 3 la degradación total de éste. La muerte de condrocitos se evaluó contando los huecos formados por

la muerte celular. Para determinar la erosión ósea se realizó la tinción TRAP que detecta la actividad de la enzima TRAP presente en osteoclastos y liberada por estos.

Todas las medidas se realizaron por dos observadores independientes al experimento. La medida es la media de 3 cortes de cada ratón. Estos cortes se analizaron con el microscopio DM IL LED (Leica®, Wetzlar, Alemania) y las imágenes se tomaron con la cámara Leica® DFC 450 C.

### 3.1.5.1 Tinción TRAP

Mediante esta tinción los osteoclastos se tiñen de violeta y el resto de tejido óseo se teñirá de verde azulado. Para llevarla a cabo se prepararon las siguientes soluciones y se siguió el protocolo abajo descrito.

#### 1. MEDIO DE INCUBACIÓN BÁSICO TRAP

Acetato de Sodio Anhidro..... 9,2 g

Ácido tartárico (tartrato)..... 11,4 g

Ácido Acético Glacial.....2,8 ml

Agua destilada.....950 ml

Disolver todo lo anterior y ajustar el pH a 4,7-5 con 5M de NaOH o con más ácido Acético Glacial (para aumentar o disminuir el pH).

#### 2. 5M NaOH

Hidróxido Sódico lentejas..... 50 g

Agua destilada..... 250 ml

3. Mezcla Sustrato Fosfato Naftol AS-MX

Naftol AS-MX Fosfato (almacenado a -20°C).....	20 mg
Agua destilada .....	1 ml

4. Solución Tinción TRAP

Medio de incubación básico TRAP.....	200 ml
<i>Fast Red Violet LB Salt</i> .....	120 mg
Mezcla Sustrato Fosfato .....	1ml

5. 0,02% Fast Green

<i>Fast Green</i> .....	0,05 g
Agua destilada.....	250 ml

- 1) Poner Solución Tinción TRAP a 37°C en un baño de agua.
- 2) Rehidratación de las muestras con gradiente decreciente de etanol acabando en PBS.
- 3) Poner en los portaobjetos la Solución de Tinción pre- calentada a 37°C durante 2 horas.
- 4) Sumergir en agua destilada.
- 5) Cubrir con 0,02% Fast Green durante 2 minutos y sumergir rápidamente en agua destilada.
- 6) Deshidratar:
  - EtOH 70%
  - EtOH 96%
  - EtOH 100%
  - Xileno
  - Xileno

Pero sumergiendo brevemente en cada cubeta (5 segundos cada una).

7) Tras deshidratar procedemos a montar los portaobjetos con un medio de montaje no acuoso DPX (Panreac, Barcelona, España). Se observa al microscopio.

### 3.1.5.2 Tinción Safranina-O

Esta tinción la empleamos para la visualización del cartílago. La safranina tiñe de rojo el cartílago y las zonas de crecimiento del hueso. Así:

- 1) Se desparafina y rehidrata con un gradiente decreciente de concentraciones de alcohol y acabando en PBS.
- 2) Los cortes se limpian con agua ultrapura.
- 3) Se tiñen los cortes con safranina O 0,1% en agua ultrapura (5 minutos).
- 4) Se limpian con agua ultrapura.
- 5) Seguidamente, se procede a la deshidratación secuencial de las muestras con un gradiente creciente de etanol, finalizando con xileno:
  - Enjuague en etanol 50%.
  - Etanol 70% durante 2 minutos.
  - Etanol 96% durante 2 minutos.
  - Etanol 100% durante 2 minutos.
  - Xileno durante 2 minutos.
  - Xileno durante 2 minutos.

6) Se montan los cubreobjetos sobre los portaobjetos con medio de montaje no acuoso DPX y se observan en el microscopio.

### 3.1.5.3 Tinción Hematoxilina-Eosina

La tinción hematoxilina/eosina es una tinción que nos permite tener una visión general de los cortes al microscopio. Con ella se consigue teñir los núcleos de las células de color azul/púrpura gracias a la hematoxilina y el citoplasma de color rosáceo. El protocolo de tinción seguido fue el siguiente:

- 1) Los cortes de 7  $\mu\text{m}$  obtenidos son desparafinados con xileno y rehidratados siguiendo un gradiente decreciente de etanol:
  - Xileno (5 minutos).
  - Xileno (5 minutos).
  - Etanol 100% (5 minutos).
  - Etanol 96% (5 minutos).
  - Etanol 70% (5 minutos).
  - Etanol 50% (5 minutos).
- 2) Se sumerge en Hematoxilina de Harris durante 1 minuto (Merck).
- 3) Se lava con agua corriente los distintos portaobjetos.
- 4) Se sumerge rápidamente en solución de diferenciación (0,25 ml de HCl concentrado + 100 ml etanol 70%).
- 5) Se lava con agua corriente los portaobjetos.
- 6) Se sumerge en solución de Eosina (Eosina  $\frac{1}{2}$  en Etanol 95%) durante 1 minuto y medio (Merck).
- 7) Se lava con agua corriente los portaobjetos.

8) Seguidamente, se hace una deshidratación secuencial de las muestras con un gradiente creciente de etanol, finalizando con xileno:

- Enjuague en etanol 50%.
- Etanol 70% durante 2 minutos.
- Etanol 96% durante 2 minutos.
- Etanol 100% durante 2 minutos.
- Xileno durante 2 minutos.
- Xileno durante 2 minutos.

9) Se montan los cubreobjetos sobre los portaobjetos con la ayuda de un medio de montaje no acuoso DPX. Se pone una gota sobre cada muestra, se coloca el cubre y se observa el resultado de la tinción al microscopio.

### 3.1.6 Determinación de mediadores en homogenados de pata

Las patas traseras se homogeneizaron en N<sub>2</sub> con 2 mL de tampón A pH 7,4 (10 mM HEPES, pH8, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM KCl, 1 mM ditiotreititol, 5 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mg/ml leupeptina, 0,1 mg/ml aprotinina y 0,5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo). El tejido homogeneizado se sónico con tres ciclos de 10 segundos de ultrasonidos y 10 segundos de descanso entre pulsos. Se centrifugó a 12000 x g, 10 minutos y 4°C. Se tomaron los sobrenadantes y se usaron para las determinaciones de citocinas por ELISA según la tabla 4 y para evaluar la actividad mieloperoxidasa (MPO), un marcador neutrofílico medido según Payá et al (1996).

### 3.1.7 Medida de analitos en suero

La sangre se recogió en tubos heparinizados a día 40. Después de centrifugar los tubos a 12000 x *g*, se separó el suero. Los analitos DKK-1, esclerostina y osteocalcina fueron determinados por ensayo de multiplex usando el kit de Merck-Millipore (con rangos de detección 15-60000 pg/ml, 3-12000 pg/ml y 146-600000 pg/ml, respectivamente) (Merck KGaA). También se determinó la concentración de IgG2a en suero por ELISA (Thermofisher Scientific Inc.)(rango de detección 0,614-150 ng/ml).

**Tabla 4: Kits comerciales usados para la detección de distintos analitos en suero y en homogenados de pata**

Analito	Rango de detección	Casa comercial
TNF $\alpha$	32-2700 pg/ml	R&D Systems*
IL-1 $\beta$	25-2000 pg/ml	R&D Systems
IL-17	10,9-700 pg/ml	R&D Systems
CXCL-1	8-1000 pg/ml	Promokine*
IL-2	2-200 pg/ml	Invitrogen, Thermofisher Scientific Inc*
IL-10	30-4000 pg/ml	Invitrogen, Thermofisher Scientific Inc
IL-6	7,8-500 pg/ml	Invitrogen, Thermofisher Scientific Inc
RANKL	2,74-2000 pg/ml	Invitrogen, Thermofisher Scientific Inc

\*R&D systems, Minneapolis, MN, EEUU. Invitrogen, Promokine, Heidelberg, Alemania, Thermofisher Scientific Inc, Waltham, MA, EEUU.

### 3.1.8 Actividad mieloperoxidasa

Parte de los efectos inflamatorios provocados por la presencia de leucocitos polimorfonucleares en los tejidos se atribuye a la liberación del contenido de sus gránulos. Estos leucocitos poseen dos tipos de gránulos: los primarios o azurófilos que contienen MPO, elastasa y otras enzimas hidrolíticas, y los secundarios o específicos, que contienen lisozima y colagenasa (Schettler et al, 1991). Así pues, los niveles de la enzima MPO son indicadores del proceso de desgranulación leucocitaria. La MPO es una enzima lisosomal presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Esta enzima utiliza el peróxido de hidrógeno, generado tras la activación del neutrófilo, para oxidar los iones  $\text{Cl}^-$  presentes en el medio y dar lugar al ácido hipocloroso, un potente agente oxidante al cual se le atribuye la capacidad bactericida del neutrófilo.



Entre las especies oxigenadas reactivas producidas por el neutrófilo se considera al ácido hipocloroso como el oxidante más reactivo; ya que es capaz de dañar las estructuras proteicas y de reaccionar con los ácidos grasos insaturados originando la desestabilización de las membranas celulares.

El protocolo, adaptado para el trabajo en microplaca, se basa en el método descrito por De Young y colaboradores (De Young et al., 1989). Los homogenados de pata se incubaron con PBS (pH 7,4) y tampón fosfato (pH 5,4). A continuación, se adicionó el peróxido de hidrógeno (0,052%). Tras incubar a 37 °C durante aproximadamente 5 minutos, se añadió el sustrato de la reacción: tetrametilbencidina (TMB) (Merck) (18mM) disuelta en dimetilformamida (8%) en agua destilada. La placa se incubó durante 3 minutos y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2 N. La absorbancia fue

cuantificada mediante un espectrofotómetro *VICTOR 2 Wallac 1420 multilabel counter* a 450 nm de longitud de onda (Tabla 5).

**Tabla 5: Protocolo experimental para la determinación de mieloperoxidasa**

	Blanco		Muestra
<b>Homogeneizado</b>	-		5 µl
<b>Tampón PBS</b>	195 µl		195 µl
<b>Tampón fosfato</b>	20 µl		20 µl
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	20 µl		20 µl
		<b>Incubar 5 minutos a 37 °C</b>	
<b>TMB</b>	20 µl		20 µl
		<b>Incubar 5 minutos a 37 °C</b>	
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	50 µl		50 µl

### 3.1.9 Aislamiento, ensayo de proliferación y determinación de citocinas en células de ganglio linfático

Los ganglios linfáticos inguinales, poplíteos, braquiales y axilares fueron extirpados y disgregados mecánicamente. Se incubaron en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado al 10 % con suero bovino fetal (SBF), estreptomina/penicilina 1%, colagenasa 1,6 mg/ml y DNasa 200 µg/ml (Merck KGaA) a 37°C durante 40 minutos. Después de filtrar la suspensión con un filtro de 40 µm, se añadió 1 ml de DMEM y se centrifugó a 500 g a 4°C, 10 minutos. Se eliminó el medio y las células se resuspendieron en DMEM suplementado con antibiótico, SBF y DNasa a las mismas concentraciones que anteriormente. Se incubó a 37°C 15 minutos. Seguidamente, se añadieron 500 µl de DMEM y se centrifugaron las células

una vez más. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS para citometría de flujo o en DMEM suplementado con SBF (10%) y estreptomycin/penicilina (1%) para el ensayo de proliferación celular con bromodesoxiuridina (BrdU).

Las células resuspendidas en DMEM se sembraron a  $2,5 \times 10^5$  células/ml. A las 24 horas se añadió la BrdU y a las 48 horas se midió la BrdU incorporada por la proliferación celular con un ensayo ELISA de Merck KGaA. Los sobrenadantes de estos linfocitos se recogieron y en ellos medimos por ELISA IL-2, IL-4 e IFN $\gamma$  con el kit Th1/Th2 *Mouse Uncoated* ELISA (Invitrogen, Thermofisher Scientific Inc.) con los límites de detección 2-200 pg/ml, 4-500 pg/ml y 15-2000 pg/ml, respectivamente.

### 3.1.10 Citometría de flujo de las células de ganglio linfático de ratón

Las células extraídas de los ganglios linfáticos no usadas para la proliferación celular fueron marcadas con los siguientes anticuerpos: antiCD3-Indo1 (ref. 563565, lote 734861, clon 145-2C11), antiCD8-FITC (ref. 564422, lote 8037507, clon 53-6.7), antiROR $\gamma$ t-Pacific blue (ref. 562894, lote 8151861, clon Q31-378), y antiFOXP3-APC y antiCD4-PerCP-Cy5.5 (*mouse* Th17/Treg kit, ref. 51-9006647, lote 8067595) (BD Biosciences Europe, Madrid, España). El ensayo de citometría de flujo se realizó con el citómetro de flujo BD LSRFORTESSA (BD Biosciences). El software usado fue FACS DIVA 7.0 (BD Biosciences) y FlowJo v9 (BD Biosciences).

### 3.1.11 Análisis de rayos X

La erosión y destrucción ósea en los miembros delanteros y traseros se midió por un análisis de rayos X llevado a cabo con microPET-CT (Albira) (Bruker, Billerica, MA, EEUU). La escala de color nos indicó la densidad ósea siendo el azul las zonas de baja densidad, amarillo/verde significaba densidad media y rojo alta densidad. Para el análisis numérico, las regiones de interés (ROI) fueron medidas con el software en 3D. Estas áreas fueron exactamente las mismas para todas las patas en los 3 ejes ( $X=138$  mm,  $Y = 2,94$  mm,  $Z = 2,8$  mm para las patas traseras y  $X = 2$  mm,  $Y = 2$  mm y  $Z = 1$  mm para las extremidades superiores) ajustadas desde el inicio del calcáneo, astrágalo y tarsos, hasta metatarsos para los miembros traseros y huesos carpales para las patas delanteras.

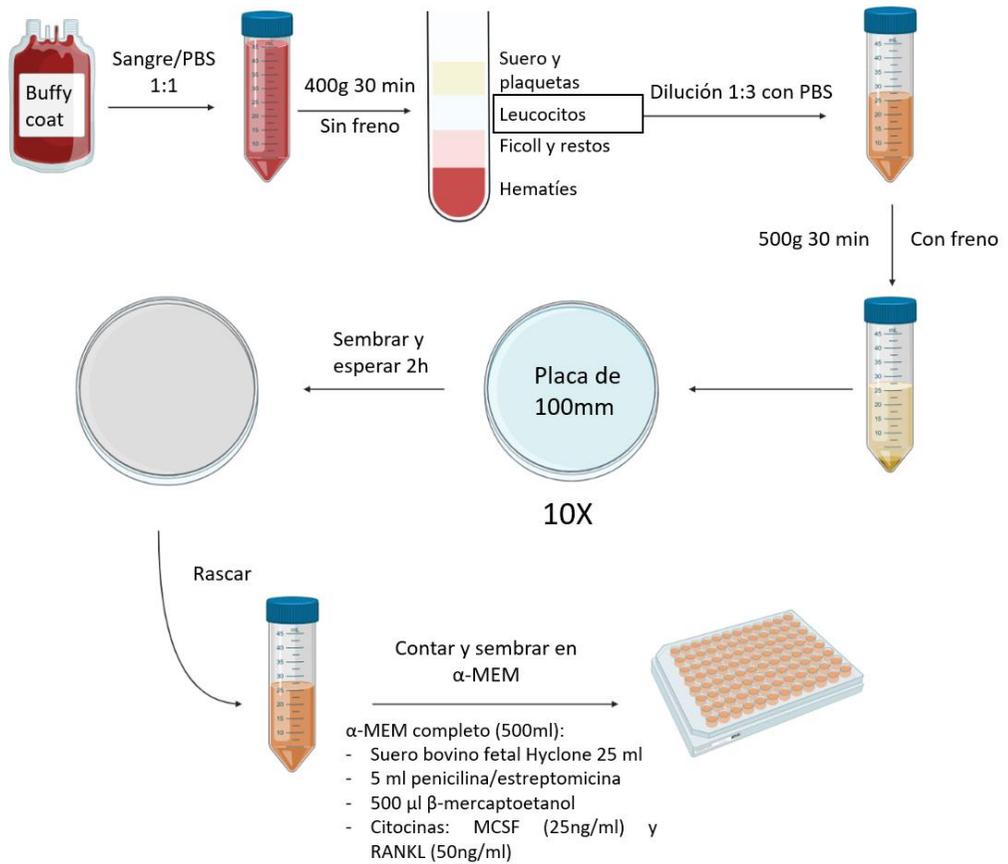
## 3.2 Métodos de estudio en células humanas

### 3.2.1 Experimentos con monocitos humanos

#### 3.2.1.1 Separación de monocitos y diferenciación a osteoclastos

La separación de los monocitos para su posterior diferenciación a osteoclastos se realizó mediante gradiente de densidad (Figura 8). Para ello se usó Ficoll-Paque PREMIUM 1.073 (GE healthcare). La sangre obtenida del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana se diluyó 1:2 con PBS y se le añadió el Ficoll-Paque en una proporción 3:7. Seguidamente, se centrifugó a 400 g durante 30 minutos y sin el freno de la centrífuga. Tras la centrifugación, se aisló el fragmento leucocitario y se sembró en su totalidad

en placas de 100 mm. Tras dos horas de espera en las cuáles los monocitos quedan adheridos a la placa, se lavó el sobrenadante con PBS y mediante rascado se obtuvieron los monocitos. Se contaron y se sembraron a  $10^5$  células por pocillo en placa de 96 pocillos. Los monocitos se cultivaron con medio  $\alpha$ -MEM (Gibco), suero bovino fetal Hyclone 5% (Thermo Fisher), penicilina/estreptomicina 1% (Gibco) y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1% (Gibco). Para inducir esta diferenciación es necesario el uso de dos citocinas: el MCSF 25 ng/ml (Peprotech) y RANKL 50 ng/ml (Peprotech). Se hicieron 4 grupos experimentales: el control (solamente citocinas) y 3 concentraciones de tratamiento (100nM, 250nM y 500nM) junto con las citocinas. El medio se cambió cada 3 días y se detuvo el experimento tras alcanzar por parte del grupo control una confluencia de osteoclastos del 80% (Figura 8).



**Figura 8: Esquema de la separación y siembra de monocitos de sangre humana para la diferenciación de osteoclastos**

### 3.2.1.2 Tinción TRAP y conteo de osteoclastos

Tras alcanzar el 80% de confluencia en osteoclastos se lavaron las células con PBS para después fijarlas con paraformaldehído 4%. Después se incubaron las células con la solución para tinción de TRAP (previamente descrita) a 37°C durante 20 minutos. Tras este periodo, se lavaron las células y se incubaron con hematoxilina de Harris durante 30 segundos para la tinción de los núcleos. Finalmente se lavó con PBS y se observaron las células en el mismo microscopio previamente mencionado.

Para el conteo de los osteoclastos, se utilizaron 4 pocillos por variable y 5 campos por pocillo. Además, se consideró osteoclasto toda aquella célula TRAP positiva y con más de 3 núcleos.

### 3.2.1.3 Análisis de la expresión génica

#### Extracción y cuantificación de ARN

Para la extracción de ARNm seguimos el protocolo anteriormente expuesto de tal manera que una vez sembradas en placa de 100mm no despegamos las células y las incubamos con las citocinas y el medio. Tomamos las muestras de las células a los 2 y los 7 días para diferenciar el posible efecto de OT en diferentes estadios de la diferenciación. La extracción de ARNm se hizo mediante el kit comercial RNeasy<sup>®</sup> plus mini kit (Qiagen) y se midió la cantidad de ARNm en cada muestra mediante NanoDrop One (Thermo Fisher). Para determinar la pureza de cada muestra se comprobó que la relación entre la densidad óptica a 260nm y a 280nm era próxima a 2, lo que indica la ausencia de contaminación proteica.

### Transcripción inversa (RT)

Para la realización de la RT para transformar el ARN obtenido en ADN, se utilizó el kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche, Basilea, Suiza). Para ello, a tubos eppendorf de 0,2 ml libres de ARNasas, se les añadió el volumen de la muestra correspondiente a 0,5 µg del ARN extraído en la fase anterior, volumen suficiente de agua libre de ARNasas para completar 12 µl y 8 µl formados por: 4 µl de tampón 5x específico para la retrotranscripción, 2 µl de una mezcla de desoxinucleótidos, 1 µl de Oligo dT *primers*, 0,5 µl de inhibidor de ARNasas y 0,5 µl de transcriptasa inversa.

Los tubos fueron introducidos en un termociclador *iCycler Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California, EE.UU) y se inició la retrotranscripción con un periodo de 10 minutos a 25°C seguido de un ciclo de 30 minutos a 55°C. Para finalizar, se inactivó la enzima elevando la temperatura a 85°C durante 5 minutos.

### PCR cuantitativa a tiempo real

Los ensayos de PCR se realizaron por duplicado en placas de 96 pocillos especiales para PCR usando el kit comercial *SYBR Green PCR Master Mix* (Bio-Rad Laboratories). Se añadieron 10 µl de este kit por pocillo, 8 µl de agua, 1 µl de los distintos cebadores por gen y 1 µl de la muestra de la transcripción inversa.

Las secuencias de los cebadores utilizados están registradas por Bio-Rad en el caso de GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), CSF1R, OSCAR, NFATc1, MED24 y RANK, y para la catepsina K por Eurofins Genomics (Luxemburgo).

La PCR se realizó en el mismo termociclador *iCycler Real-Time PCR Detection System*. Se sometió la muestra a 95°C durante 10 minutos. Seguidamente, se realizaron 36 ciclos en los que primero se desnaturalizó el

ADN a 95°C 15 segundos, después una fase de 56°C 45 segundos para conseguir la hibridación del cebador al ADNc y finalmente, una fase de elongación a 72°C durante 45 segundos en la que la ADN polimerasa sintetiza el nuevo ADN.

El análisis cuantitativo del producto se realizó mediante el estudio de la curva de amplificación que consta de tres fases: fase de latencia, fase exponencial y fase de saturación. Así, se calculó el ciclo umbral (Ct), que nos permite, mediante el método delta-delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Livak y Schmittgen, 2001), conocer el número de copias correspondientes al producto de la PCR. Para cada muestra se calcularon las diferencias en los valores de Ct ( $\Delta Ct$ ) corrigiendo el Ct del gen de interés al Ct de referencia GAPDH. La expresión génica relativa se expresó como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  respecto a las células no estimuladas.

### 3.2.2 Experimentos con linfocitos humanos

#### 3.2.2.1 Análisis de las poblaciones linfocitarias humanas mediante citometría de flujo

Recogiendo el sobrenadante de las placas de 100 mm en el protocolo de obtención de monocitos obtuvimos las demás series de leucocitos que no se adhieren a las superficies. Se usaron los anticuerpos antiCD3 $\epsilon$  (ref.16-0039-81, lote.2003124, clon.HIT3a) y antiCD28 (ref.16-0289-81, lote.2106828, clon.CD28.2) para la estimulación de la proliferación de las células. Se hicieron dos grupos de tratamiento a los que se les incluyó OT a dos concentraciones diferentes: 100nM y 500nM. Finalmente, tras 48h, marcamos estas células con los siguiente anticuerpos: antiCD3-BUV395 (ref.564001, lote.9017991, clon.SK7), antiCD4-BB700 (ref.566392, lote. 9071815, clon.SK3), antiCD8-BB515 (ref.564526, lote.8346690, clon.RPA-T8), antiFOXP3-Alexa fluor®647

(ref.560045, lote.9123843, clon.259D/C7) y antiROR $\gamma$ T-BV421 (ref.563282, lote.9093968, clon.Q21-559), todos ellos de BD Bioscience. Determinamos la población linfocitaria con el marcaje de CD3 y analizamos la capacidad de activación de FOXP3 y ROR $\gamma$ T en los diferentes linfocitos T. El ensayo de citometría de flujo se realizó con el citómetro de flujo BD LSRFORTESSA (BD Biosciences). El software usado fue FACS DIVA 7.0 (BD Biosciences) y FlowJo v9 (BD Biosciences).

### 3.2.2.2 Proliferación de linfocitos humanos

Tras la obtención de linfocitos como se ha mencionado anteriormente, se sembraron en placas de 96 pocillos de base cóncava en medio DMEM completado con suero bovino fetal y antibiótico (al igual que anteriormente). Estos linfocitos fueron estimulados con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 mencionados arriba y se probaron las 2 concentraciones mencionadas. Se realizó un test de proliferación celular de los linfocitos con el kit de BrdU usado en la proliferación celular de los ganglios linfáticos de ratón.

## 3.3. Análisis estadístico

Todos los datos están representados como media  $\pm$  SD o SEM con el número de valores ( $n$ ). Las diferencias entre los grupos experimentales se demostraron con ANOVA de dos vías con post-test de Bonferroni para la puntuación macroscópica y ANOVA de una vía con post-test de Tukey para el resto de datos. El análisis estadístico se realizó con GraphPad PRISM 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Se consideró un resultado estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$

# RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

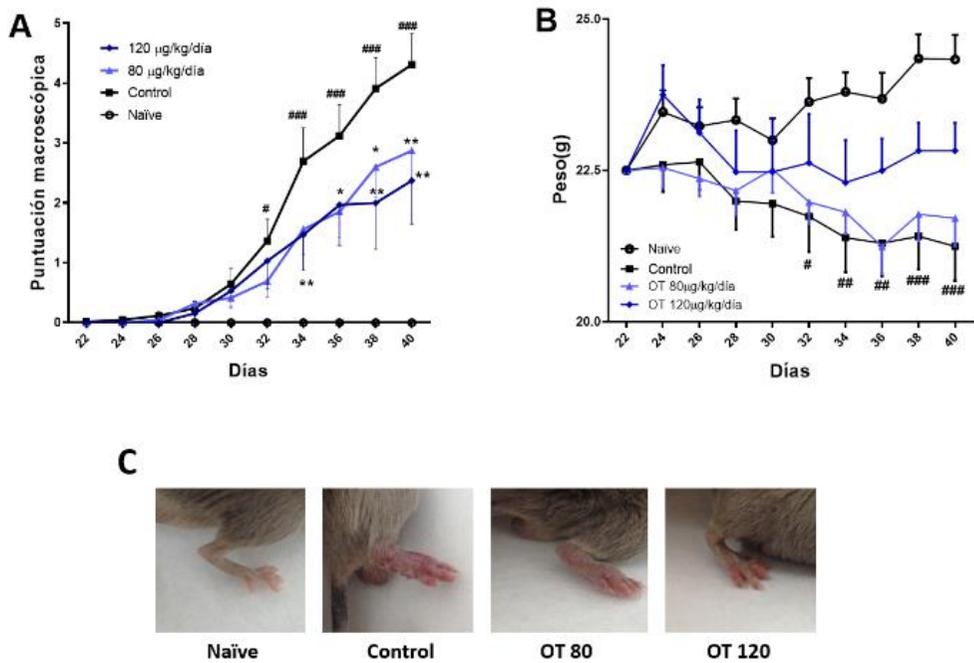
### 4.1 Efectos de la osteostatina en el modelo CIA

#### 4.1.1 Evolución de la artritis

Como se muestra en la figura 9A, la severidad de la enfermedad aumenta con el tiempo hasta el final del experimento. En el caso de los grupos de ratones tratados con OT (80  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o 120  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) se observó una reducción importante en la puntuación macroscópica que fue significativa desde el día 34 al 40.

La progresión de la artritis resultó en una pérdida de peso comparado con el grupo naïve, mientras que el tratamiento con la mayor dosis de OT tiende a normalizar el parámetro (Figura 9B).

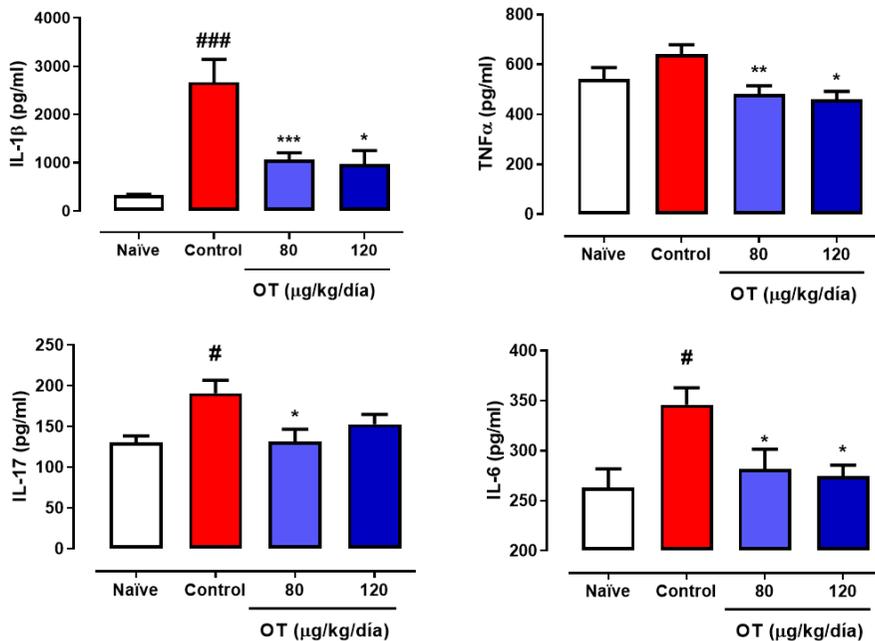
La figura 9C muestra las imágenes representativas de los grupos experimentales.



**Figura 9: Evolución de la artritis. A. Puntuación macroscópica de la artritis.** Se evaluaron las 4 patas de cada ratón (0-2/pata) a partir de la segunda inmunización el día 21. **B. Evolución del peso durante el experimento C. Imágenes representativas de las patas.** Se seleccionaron las imágenes más representativas de cada grupo experimental. Datos representados como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , frente al grupo control. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  comparado con el grupo naïve. ANOVA de doble vía en ambos gráficos (post-test de Bonferroni con  $n=8-12$ ).

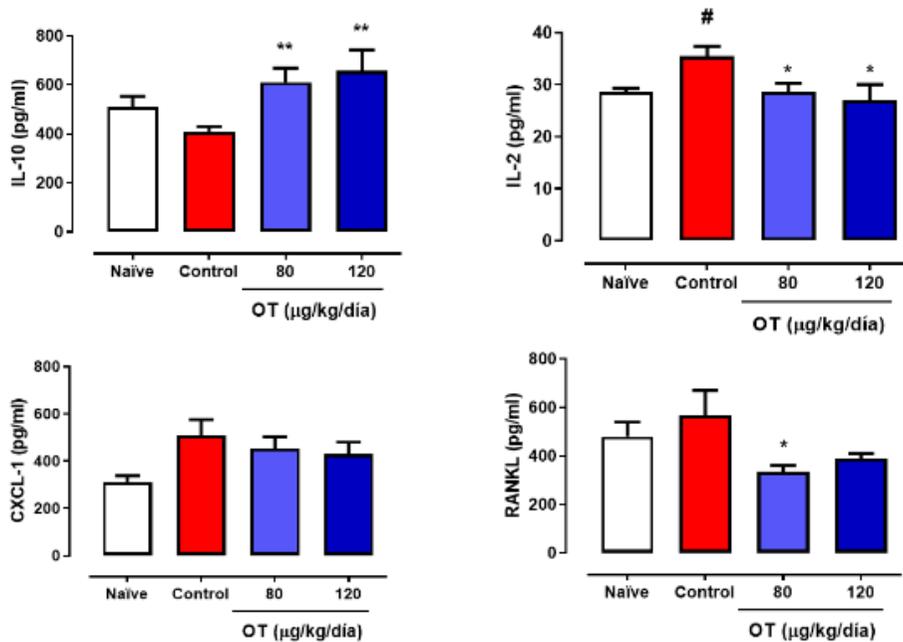
### 4.1.1.1 Niveles de mediadores en pata

Seguidamente, investigamos si OT podría regular la liberación de citocinas locales. Para ello, medimos por ELISA los niveles de las citocinas clave presentes en los homogenados de las patas posteriores al final del experimento. Respecto a las principales citocinas proinflamatorias, observamos un aumento de IL-1 $\beta$ , IL-17 e IL-6 en los ratones control respecto al grupo naïve. Sin embargo, cuando los ratones fueron tratados con OT apreciamos una disminución significativa, en ambas dosis del tratamiento, en los niveles de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  y en la dosis de 80  $\mu$ g/kg en IL-17 (Figura 10).



**Figura 10: Niveles de las principales citocinas proinflamatorias en homogenado de pata medido por ELISA.** Datos representados como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al grupo control. # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$  respecto al grupo naïve. ANOVA de una vía (post-test de Tukey con  $n = 15-25$ ).

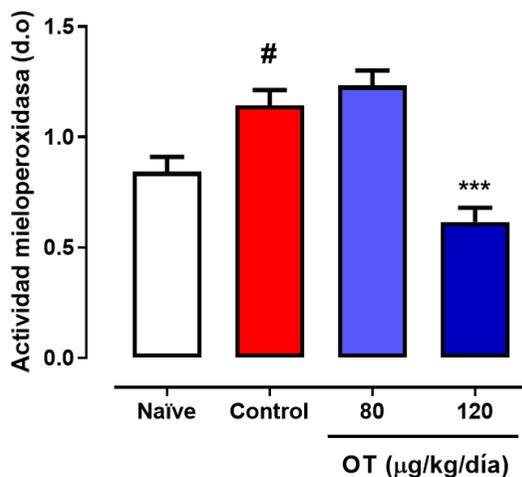
También observamos cómo la principal citocina antiinflamatoria IL-10 disminuye en los ratones control en comparación con el grupo naïve, mientras que en los dos grupos tratados con OT se produjo un aumento significativo de dicha citocina antiinflamatoria en las articulaciones. Además, hubo un aumento significativo de IL-2 en el grupo control respecto al grupo naïve que fue revertido significativamente en los grupos tratados, dejando los niveles como en los ratones naïve. Otros mediadores interesantes medidos fueron la quimiocina CXCL-1 y RANKL, como marcadores de la enfermedad artrítica. Respecto a la primera, se observó un aumento no significativo en el grupo control comparado con los ratones naïve, mientras que no se observó disminución en los ratones tratados. En cambio, el aumento observado de RANKL en el grupo control fue revertido con OT en los grupos tratados, siendo la disminución significativa en el grupo de 80 µg/kg (Figura 11).



**Figura 11: Niveles de citocinas en homogenado de pata medido por ELISA.** Datos representados como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  frente al grupo control. # $p < 0,05$  respecto al grupo naïve. ANOVA de una vía (post-test de Tukey con  $n=15-25$ ).

#### 4.1.2 Actividad MPO en pata

La actividad MPO se midió en los homogenados de pata. Como se demuestra en la figura 12 la actividad MPO aumentó en el grupo control y el efecto fue significativamente reducido con la dosis más alta de OT.



**Figura 12: Actividad mieloperoxidasa.** Datos representados como media  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,01$  frente al grupo control. # $p < 0,05$  respecto al grupo naïve. ANOVA de una vía (post-test de Tukey con  $n=15-25$ ).

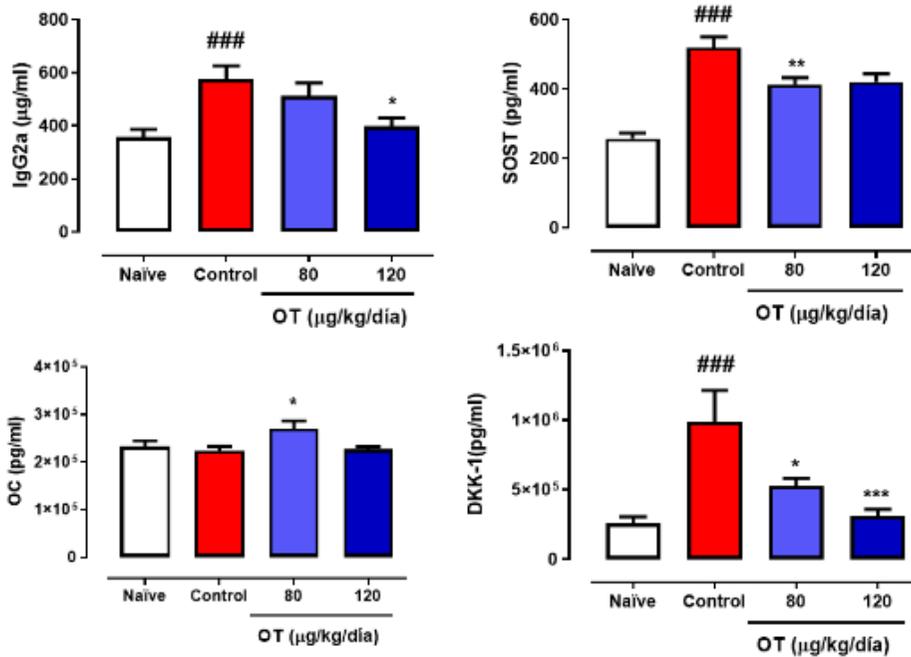
### 4.1.3 Niveles de mediadores en suero

El suero obtenido de la sangre de los ratones se utilizó para medir diferentes mediadores y metabolitos relacionados con la progresión de la enfermedad.

Existen diferentes autoanticuerpos implicados en la patogénesis de la AR. También es el caso del modelo CIA donde se ha observado que los anticuerpos IgG2a son importantes para su desarrollo (Watson y Townes, 1985). Los niveles de estos anticuerpos se vieron aumentados en el grupo control mientras que se observó una disminución en ambas dosis de OT siendo significativa a la dosis de 120 µg/kg (Figura 13).

SOST, OC así como DKK-1 son marcadores para el estudio del metabolismo óseo. En el caso de SOST se observó un aumento significativo en los ratones control y una reducción tras tratar a los ratones con las dos dosis

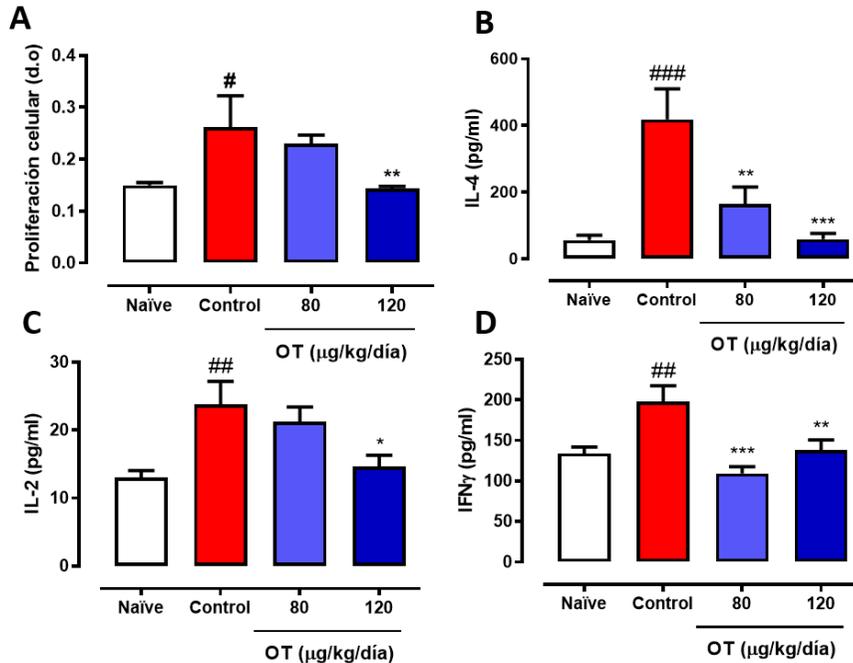
siendo estadísticamente significativa a 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . También, se observó un aumento pronunciado de DKK-1 en los ratones artríticos control mientras que tras tratarlos con OT se vio una disminución significativa en ambas dosis. Finalmente, se apreció un aumento de OC a la dosis 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .



**Figura 13: Niveles séricos de IgG2a y metabolitos de hueso DKK-1, SOST y OC.** Los analitos de hueso se midieron por multiplex e IgG2a por ELISA. Los datos se representaron como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al grupo control. ### $p < 0,001$  comparando con el grupo naïve. ANOVA de una vía con post-test de Tuckey (n=6-18).

#### 4.1.4 Proliferación celular de linfocitos de ganglio linfático

Seguidamente se determinaron los efectos de OT en linfocitos T presentes en los ganglios linfáticos del ratón. En la figura 14A puede observarse como la proliferación basal de estas células se ve aumentada en los ratones control frente a los ratones naïve. Sin embargo, cuando se trató a los grupos pudo verse cómo OT fue capaz de disminuirla, siendo un efecto significativo a la dosis alta, la cual redujo la proliferación a los niveles de los ratones naïve. Además, los linfocitos T de los controles artríticos liberaron cantidades mayores de citocinas IL-2, IL-4, e IFN $\gamma$  comparándolo con los ratones no artríticos. El tratamiento con el péptido redujo la liberación de estas citocinas claves en la proliferación de los linfocitos siendo una reducción significativa en la dosis alta para IL-2 y en ambas dosis para el resto (Figura 14 B-D).

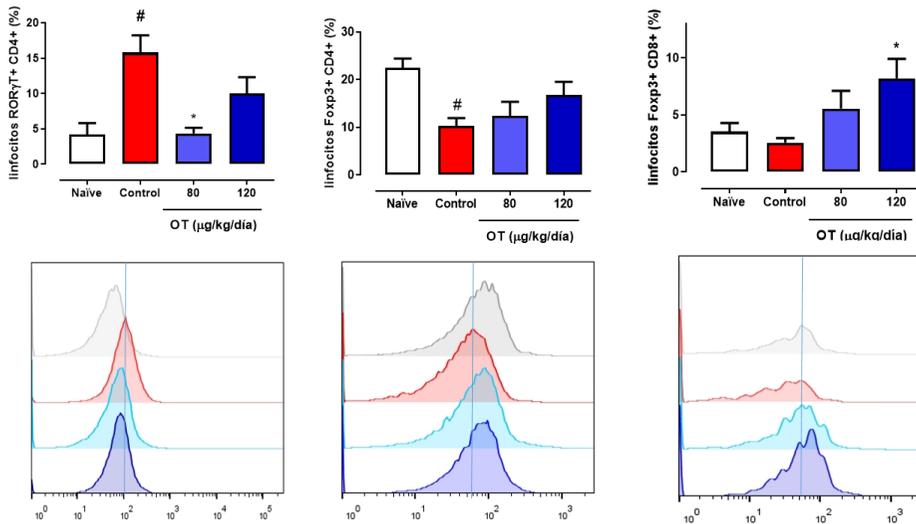


**Figura 14: Proliferación y diferenciación de linfocitos T. A. Proliferación celular de los linfocitos de ganglio linfático medidos por incorporación de BrdU. B, C y D. Niveles de las principales citocinas implicadas en la diferenciación de linfocitos T medido por ELISA. Análisis realizado en el medio acondicionado de los linfocitos de proliferación. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al grupo control. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  ### $p < 0,001$  comparado con el grupo naïve. Datos representados como la media  $\pm$  SEM (n= 9-15). ANOVA de una vía con post-test de Tuckey.**

#### 4.1.5 Caracterización de las poblaciones celulares de ganglio linfático

El análisis de las poblaciones de linfocitos T reveló que la inducción de la artritis provoca un aumento en el número de linfocitos ROR $\gamma$ TCD4+, mientras que los linfocitos FOXP3+CD4+, y en menor medida FOXP3+CD8+, vieron su población disminuida en los controles artríticos comparándola con la de los ratones naïve (figura 15). El tratamiento con OT revirtió parcialmente el efecto del CIA en linfocitos ROR $\gamma$ +CD4+ y se observó una tendencia al alza

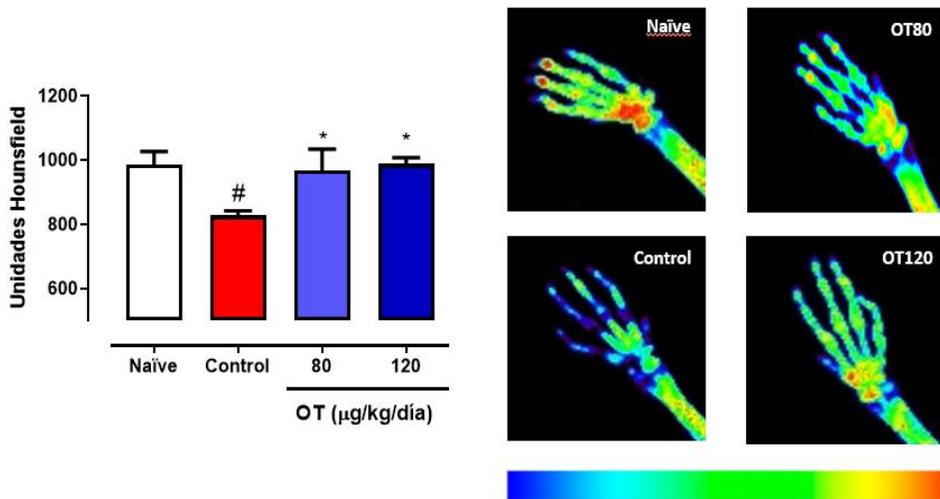
de los linfocitos FOXP3+CD4+ en los grupos tratados. También, OT incrementó el número de FOXP3+CD8+ con diferencia estadísticamente significativa a la dosis de 120µg/kg/día (Figura 15).



**Figura 15: Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos del ganglio linfático.** Representadas las poblaciones FOXP3 y RORγT. Datos representados como media ± SEM (n= 4-9). ANOVA de una vía con post-test de Tuckey. \* $p < 0,05$  frente al grupo control. # $p < 0,05$  comparado con el grupo naïve.

#### 4.1.6 Determinación de la degradación ósea

Después de observar las mejoras de las articulaciones de los tobillos tras el tratamiento con OT, se quiso evaluar si el péptido era capaz de modificar las alteraciones en el hueso artrítico. En la figura 16 puede verse la cuantificación de la densidad ósea (tanto de los miembros delanteros como los traseros) en unidades Hounsfield, así como las imágenes representativas de cada grupo experimental. La inducción de la artritis produjo una disminución significativa de la densidad ósea mientras que el tratamiento con OT normalizó estos valores.

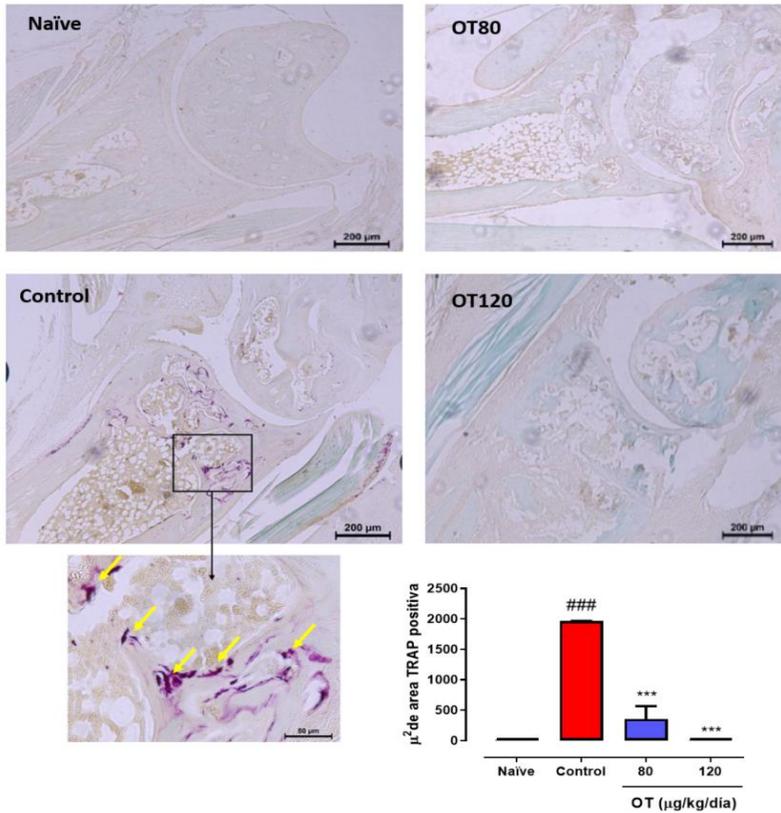


**Figura 16: Análisis por rayos X de las patas traseras y delanteras.** La densidad ósea se midió analizando una ROI (region de interés) alrededor de la muñeca y del tobillo. Los valores se representaron en unidades Hounsfield. Escala de color de la imagen: rojo, alta densidad ósea; verde/amarillo, densidad media; azul, baja densidad (n=3-4). Datos representados como la media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  frente al grupo control. # $p < 0,05$  comparado con el grupo naïve. ANOVA de una vía con post-test de Tuckey.

## 4.1.7 Análisis histológico

### 4.1.7.1 Tinción de la actividad TRAP de osteoclastos

La diferenciación de osteoclastos es clave en el proceso de erosión en el hueso en la AR (Schett y Teitelbaum, 2009). El área afectada por los osteoclastos se determinó mediante la tinción TRAP en cortes de tobillo. Los controles artríticos mostraron un aumento significativo de tinción TRAP comparado con los ratones no artríticos (Figura 17). OT redujo esta área teñida de forma dosis dependiente, devolviendo los valores a niveles de los ratones naïve, sobre todo los animales tratados con la dosis 120 µg/kg/día.

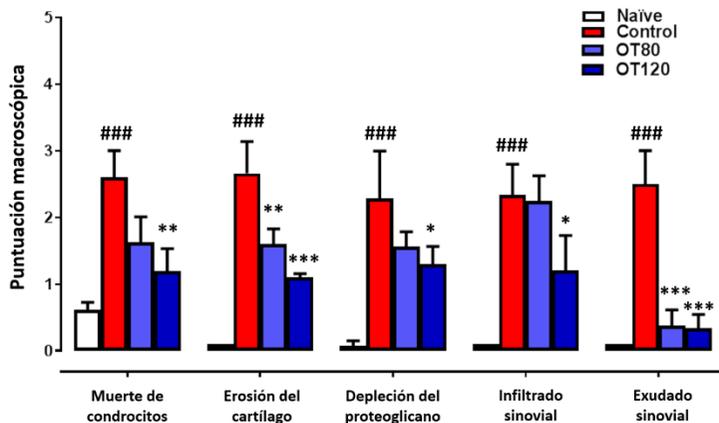


**Figura 17: Tinción TRAP de cortes de tobillo.** La tinción morada representa el área TRAP positiva asociada a la actividad de osteoclastos (n=3). Datos representados como la media  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,001$  frente al grupo control. ### $p < 0,001$  comparado con el grupo naïve. ANOVA de una vía con post-test de Tuckey.

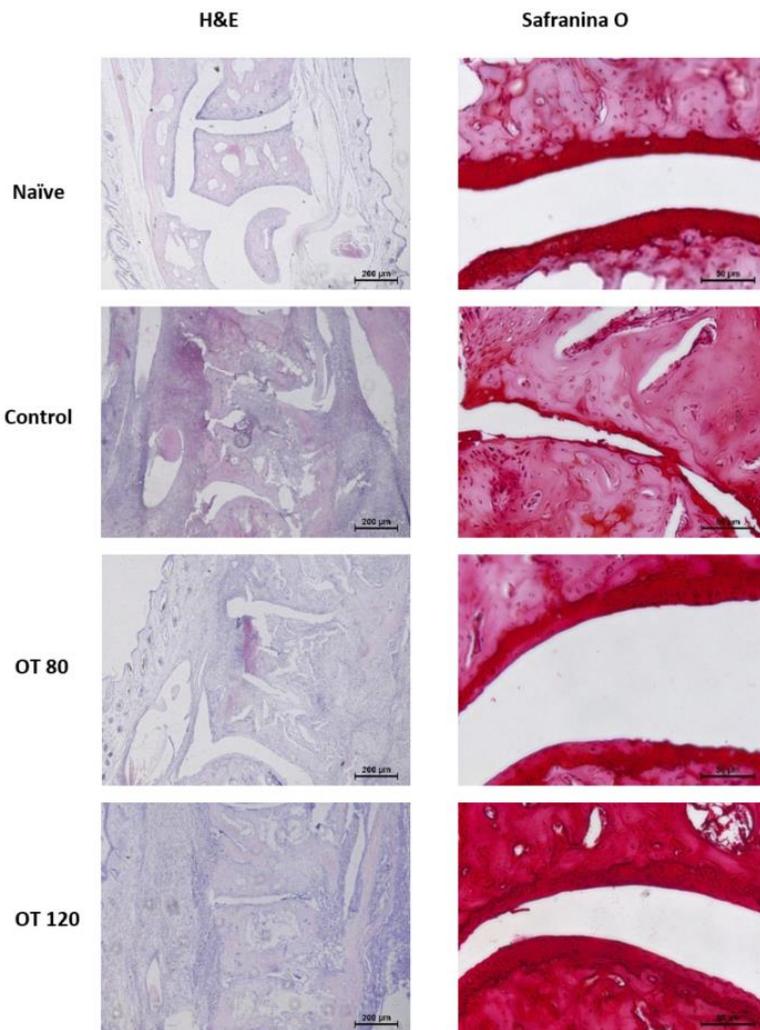
#### 4.1.7.2 Análisis tisular de la migración celular y degradación del cartílago

La degradación del cartílago y la inflamación de la articulación se determinaron por el análisis histológico en cortes de tobillos que se tiñeron con hematoxilina/eosina o safranina O. En la figura 18 está representada la puntuación macroscópica de todos estos cortes mientras que en la figura 19 se muestran cortes representativos de cada grupo.

El análisis histológico de los cortes del grupo control reveló daño en el cartílago con muerte de condrocitos, erosión del cartílago y depleción de proteoglicano, además del infiltrado y exudado sinovial. El tratamiento con ambas dosis de OT llevó a la reducción significativa de la muerte de condrocitos y depleción del proteoglicano a la dosis de 120  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y en el caso de la erosión del cartílago a ambas dosis. El exudado sinovial se redujo significativamente con el tratamiento de OT mientras que el infiltrado solo a la dosis de 120  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ .



**Figura 18: Puntuación macroscópica de cortes teñidos de tobillo.** Realizada por dos observadores independientes. Valores representados como media  $\pm$  SD (n=3) y analizados por ANOVA de una vía con post-test de Tuckey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al grupo control. #### $p < 0,001$  comparado con el grupo naïve.

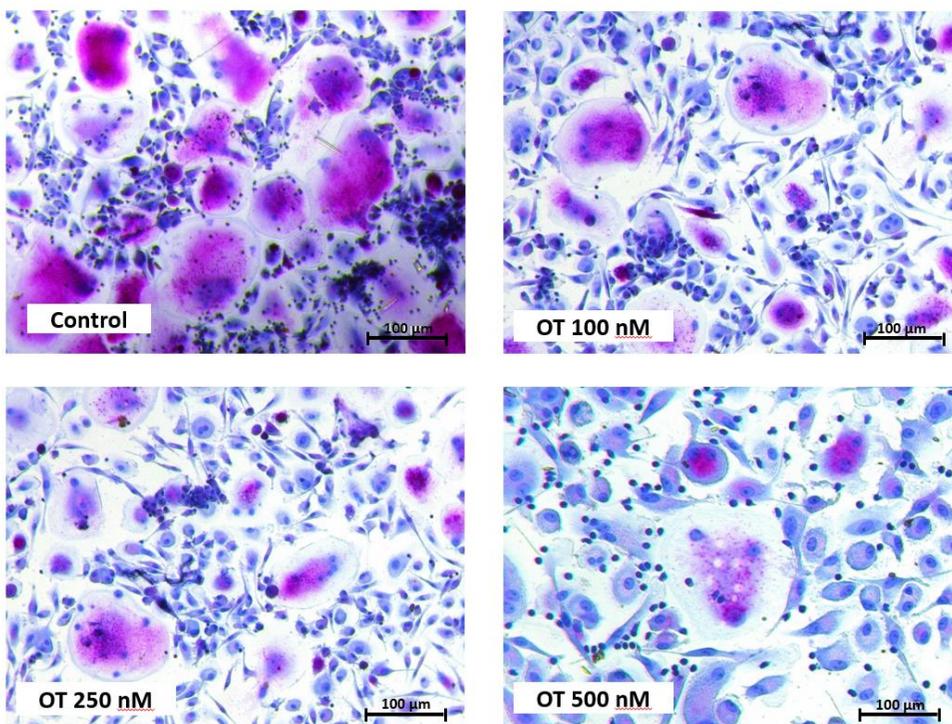


**Figura 19: Imágenes representativas de cada grupo experimental de la articulación. Cortes teñidos con Hematoxilina /eosina (x20) y safranina O (x40)**

## 4.2 Trabajo experimental en células humanas

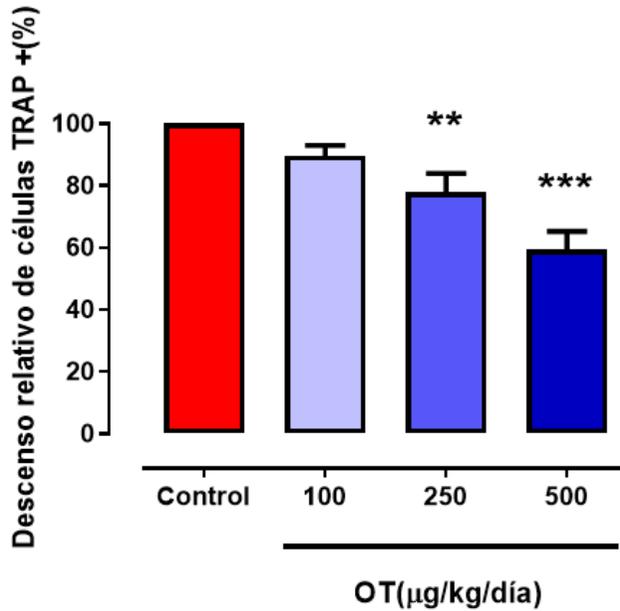
### 4.2.1 Diferenciación de monocitos a osteoclastos

El tratamiento de los monocitos humanos con MCSF y RANKL indujo la diferenciación de estos a osteoclastos, como puede observarse en la figura 20. Se consideró osteoclasto toda célula TRAP positiva con más de 3 núcleos (violeta dentro del citoplasma). Durante los días de diferenciación se trataron 3 grupos de células con las concentraciones 100 nM, 250 nM y 500 nM de OT. El último día se fijaron las células, se tiñeron para observar la presencia de TRAP y se contaron los osteoclastos por pocillo (Figura 21).



**Figura 20: Imágenes representativas de cada grupo experimental de osteoclastos teñidos (x100)**

Tras el conteo celular pudimos observar que OT redujo el número de osteoclastos por pocillo cuando los pocillos control llegaron al 80% de confluencia de osteoclastos. Así, este efecto sobre la diferenciación fue estadísticamente significativo a las concentraciones de 250nM y 500nM de OT (Figura 21).



**Figura 21: Descenso relativo de células TRAP+.**  $**p<0,01$   $***p<0,001$  comparado con el grupo control. Datos representados como media  $\pm$  SEM. Test ANOVA con post-test de Tuckey (n=9).

#### 4.2.2 Expresión génica de los preosteoclastos

Tras observar una disminución del número de osteoclastos diferenciados en los experimentos previos, se quiso determinar la modificación de la expresión de qué genes estaba detrás de este efecto. Para

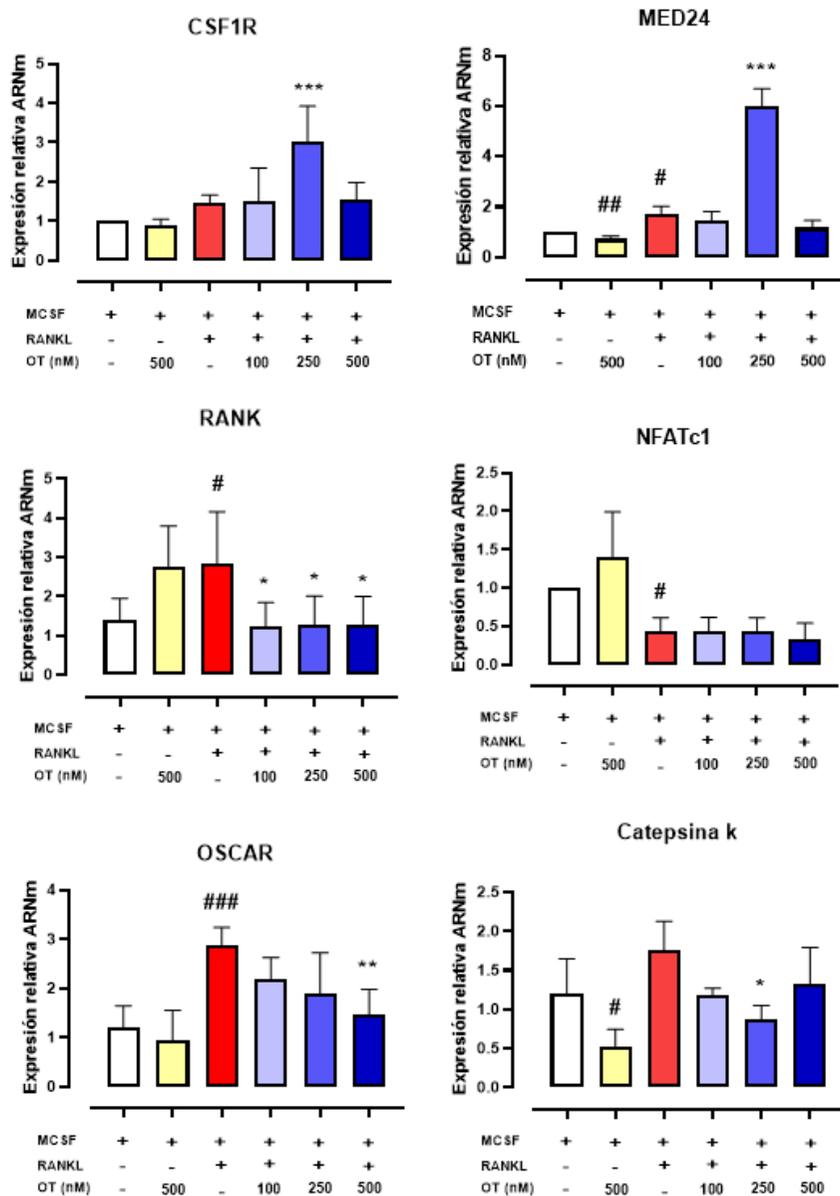
ello se decidió analizar la expresión de CSF1R, OSCAR, NFATc1, RANK, Catepsina K y MED24.

#### 4.2.2.1 Expresión génica a dos días de estimulación

Tras dos días de incubación con RANKL y MCSF pudo observarse que las citocinas fueron capaces de aumentar significativamente la expresión de MED24 (lo que podría indicar un aumento de la activación de la proliferación) (Hamilton et al, 2019) y, sobre todo, de OSCAR. Además aumentó la expresión de RANK y catepsina K mientras que se observó una disminución significativa de NFATc1.

En las células tratados con OT se observó en primer lugar que este péptido aumentó la expresión de CSF1R a la concentración 250nM que corresponde con el aumento observado en MED24. Por otro lado, OT fue capaz de reducir significativamente la expresión de RANK a todas las concentraciones. También los niveles de OSCAR fueron reducidos a las 3 concentraciones siendo significativa la reducción a 500nM.

Finalmente, se observó cómo el péptido redujo la expresión de catepsina K, siendo significativo a la concentración de 250nM (Figura 22).



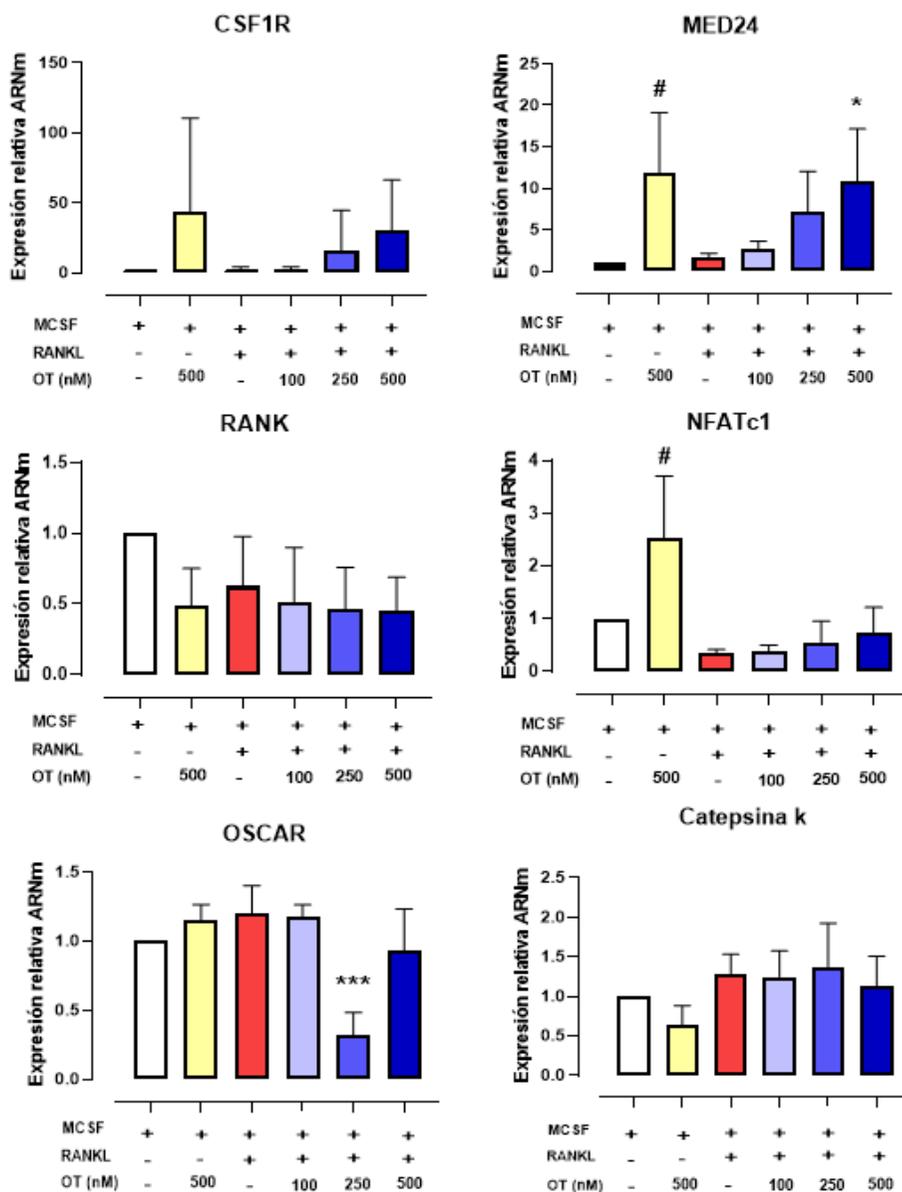
**Figura 22. Expresión de los genes implicados en la diferenciación y actividad de osteoclastos (CSF1R, RANK, NFATc1, OSCAR, Catepsina K y MED24).** Representado como expresión relativa de ARNm respecto al blanco de MCSF (2 días de estimulación). Datos representados como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  respecto al grupo control de MCSF + RANKL. # $p < 0,05$  ### $p < 0,001$  respecto al grupo blanco. ANOVA de una vía con post-test de Tuckey (n=5).

#### 4.2.2.2 Expresión génica a siete días de estimulación

Al igual que a dos días, se midió la expresión de los distintos genes implicados en la proliferación y diferenciación de monocitos a osteoclastos a 7 días.

El tratamiento con el factor de crecimiento MCSF y RANKL no provocó un aumento significativo de CSF1R ni MED24, lo que puede estar indicando que ambas citocinas actúan sobre esta vía cuando el monocito está empezando a diferenciarse y no cuando ya está en un punto más avanzado. MCSF es capaz de inducir la expresión de RANK, sin embargo, a 7 días se observa que el tratamiento con MCSF y RANKL producen una disminución de RANK probablemente porque éste se activa durante muchos días provocando una retroalimentación negativa. Se vió también como hubo un aumento de OSCAR y catepsina K en las células estimuladas con estos dos factores. Finalmente, la incubación con MCSF y RANKL redujo la expresión de NFATc1 al igual que a dos días.

El tratamiento con OT estimuló la vía proliferativa de CSF1R y ERK observándose un aumento del primero y de MED24 de forma dosis dependiente. En cuanto a RANK no se observó apenas ningún cambio, al contrario que a dos días. La expresión de OSCAR se redujo significativamente a la concentración de 250nM y no se observó ningún efecto en NFATc1 y catepsina K (Figura 23).



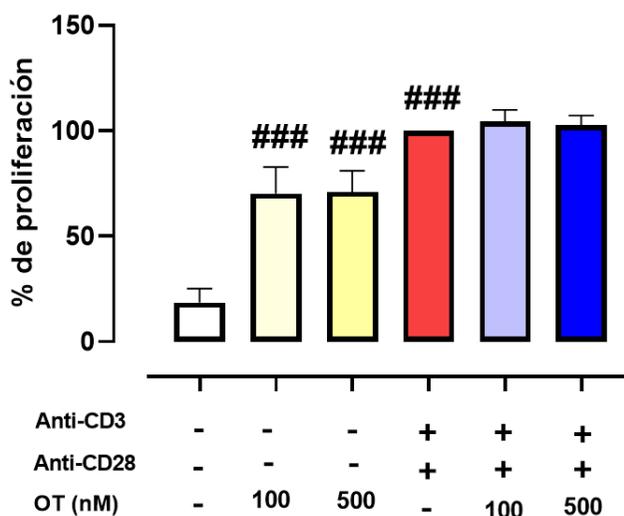
**Figura 23. Expresión de los genes implicados en la diferenciación y actividad de osteoclastos (CSF1R, RANK, NFATc1, OSCAR, Catepsina K y MED24).** Representado como expresión relativa de ARNm respecto al blanco de MCSF (7 días de estimulación). Datos representados como media  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  respecto al grupo control de MCSF + RANKL. # $p < 0,05$  respecto al grupo blanco. ANOVA de una vía con post-test de Tuckey (n=5).

### 4.2.3 Efecto de osteostatina en linfocitos humanos

Los linfocitos obtenidos de la separación de monocitos fueron estimulados con anticuerpos específicos para favorecer su proliferación. Ésta fue medida y a su vez, se usaron anticuerpos anti CD3, CD4, CD8, FOXP3 y ROR $\gamma$ T para determinar sus tipos celulares.

#### 4.2.3.1 Efecto del péptido en la proliferación celular

La estimulación de los linfocitos con los anticuerpos provocó un aumento significativo de la proliferación linfocitaria. Sin embargo, el péptido no fue capaz de disminuirla. En cambio, se observó cómo fue capaz de aumentar la proliferación de las células por sí solo a ambas concentraciones probadas (Figura 24).



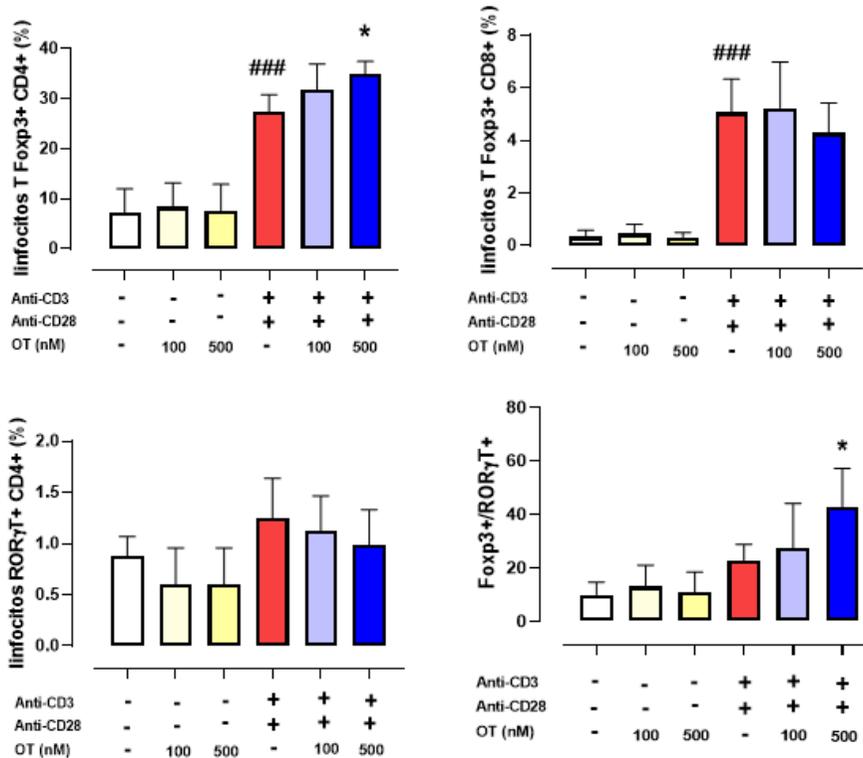
**Figura 24: Proliferación celular de los linfocitos de sangre humana medidos por incorporación de BrdU.** Datos representados como media  $\pm$  SEM (n= 4-5), ANOVA de una vía con post-test de Tuckey. ###  $p < 0,001$  respecto al grupo blanco.

#### 4.2.3.2 Modificación de las poblaciones linfocitarias por osteostatina

La estimulación con los anticuerpos antiCD3 y antiCD28 provocó el aumento de linfocitos T FOXP3+ CD4+ al igual que FOXP3+ CD8+ y RORγT CD4+. El tratamiento con OT provocó un aumento de linfocitos T Foxp3+ CD4+ a la concentración de 500 nM mientras que el péptido no tuvo ningún efecto por sí solo en esta población. Respecto a la población de FOXP3+ CD8+ no se observó ningún efecto de OT tanto en los grupos estimulados como el péptido por sí solo.

OT no fue capaz de reducir los niveles basales de la población de linfocitos RORγT CD4+. Además, se pudo observar una tendencia a disminuir el efecto provocado por la estimulación.

OT determinó el aumento de la población FOXP3+/RORγT+ en linfocitos estimulados, que fue significativo a la concentración de 500nM (Figura 25).



**Figura 25: Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de linfocitos humanos estimulados.** Representadas las poblaciones FOXP3 y RORγT. Datos representados como media ± SEM (n= 5-7), ANOVA de una vía con post-test de Tuckey. \* $p < 0,05$  frente al grupo control. ### $< 0,001$  respecto al blanco.

# DISCUSIÓN



## 5. DISCUSIÓN

En primer lugar, se ha estudiado el efecto de OT en el modelo CIA, que es el más utilizado en los estudios de nuevos fármacos antiartríticos y reproduce las fases de inducción del proceso y de destrucción articular. En este estudio mostramos que el tratamiento con OT reduce la severidad de la artritis experimental con eficacia en los signos clínicos y alteraciones estructurales en CIA, como puede observarse en los resultados obtenidos en la observación macroscópica de las patas de los ratones artríticos. Los ratones inmunizados con colágeno II desarrollaron una artritis similar a la AR humana, caracterizada por una degradación articular continua y por erosión ósea. El análisis histológico reveló una mejora significativa en la inflamación, degradación de proteoglicano y daño del cartílago por la administración de OT comparado con los ratones artríticos control.

En las articulaciones artríticas de ratones CIA hay un aumento pronunciado de citocinas proinflamatorias como ocurre en la AR. El TNF $\alpha$  es una de las citocinas con mayor relevancia en el proceso artrítico, como muestran las diferentes estrategias anti-TNF $\alpha$  capaces de disminuir la enfermedad en ratones CIA y en la AR (Williams, 2007). Otras citocinas como IL-6 e IL-1 $\beta$  también desempeñan un importante papel y son dianas para el tratamiento de la AR y otras formas de artritis, junto a otras proteínas como CD20, CD80/86 y las quinasas Janus (Smolen et al, 2020). Los resultados presentados en esta Tesis indican que el tratamiento con OT reduce la liberación de estas citocinas implicadas en la enfermedad reforzando, así, la tesis de que OT pudiera tener un papel antiinflamatorio.

Se ha observado un aumento de IL-10 en las rodillas de pacientes artríticos (Cush et al, 1995), que puede representar un intento de paliar la enfermedad por los linfocitos presente en la zona, que liberan esta citocina

inmunomoduladora. Es de destacar que el tratamiento con OT produjo un aumento significativo de IL-10 en las rodillas de los ratones artríticos, lo que puede contribuir al control de la enfermedad, al contrario de la exacerbación que provoca la disminución de esta citocina en el CIA (Finnegan et al, 2003)

Por otro lado, el componente autoinmune contra el colágeno tipo II lleva a la inducción de la artritis y puede ser determinante para la cronificación del proceso y la destrucción del cartílago (Croxford et al, 2013). También en este caso, el tratamiento con OT consiguió reducir los niveles de anticuerpos IgG2a anti-colágeno II, una subclase de anticuerpo que parece tener relevancia en el modelo CIA (Watson y Townes, 1985).

La respuesta de la inmunidad adaptativa y otros mecanismos adicionales son clave en este modelo de artritis (Plows et al, 1999). Se ha sugerido que los linfocitos T anti-colágeno II actúan en la fase efectora de la artritis llevando a la perpetuación y agravamiento de la enfermedad (Nandakumar et al, 2004). Los linfocitos T CD4+ se diferencian en varios subtipos que participan activamente en el proceso artrítico (Vyas et al, 2019). En particular los linfocitos Th17 parece que tienen un papel predominante en la artritis autoinmune ya que son capaces de liberar IL-17, citocina capaz de iniciar y mantener la inflamación (Lubberts, 2010). Los resultados obtenidos indican que OT tiene efecto sobre la inmunidad mediada por linfocitos T en el modelo CIA. De hecho, es posible que este péptido regule la actividad de los linfocitos Th17 ya que reduce el número de linfocitos T ROR $\gamma$ T+CD4+ en el ganglio linfático y los niveles de IL-17 en las articulaciones de los ratones tratados.

Además, OT contrarrestó el aumento de la producción de IL-2, IFN $\gamma$  (relacionado con la actividad Th1) e IL-4 (relacionado con la actividad Th2), inducido por el proceso artrítico. Son muchas las evidencias que indican que IL-17 tiene un papel clave en la producción de citocinas proinflamatorias

(Lubberts et al, 2004) y en la degradación del cartílago (Koenders et al, 2011). Además, esta citocina es un potente inductor de la expresión de RANKL, estimulando la osteoclastogénesis y la erosión ósea en la artritis (Lubberts et al, 2003). Sin embargo, no solo es capaz de estimular la producción de RANKL sino que se ha demostrado recientemente que facilita la diferenciación de osteoclastos y la resorción ósea directamente por activación de vías de la autofagia (Song et al, 2019). Los resultados obtenidos sugieren que OT podría inhibir la activación de linfocitos T y la subsiguiente generación de citocinas que juegan un papel crucial en la patogénesis de la artritis.

Por otro lado, se ha observado que los linfocitos Treg CD4+ están involucrados en el control de los síntomas clínicos del CIA, la producción de citocinas, la actividad de los linfocitos T citotóxicos (Cools et al, 2007) y la osteoclastogénesis (Kelchtermans et al, 2009; Notley et al, 2010). Como resultado, el aumento de la actividad T reguladora es beneficiosa para el tratamiento de la pérdida de densidad ósea inducida por la inflamación (Zaiss et al, 2010). Otra parte de nuestro estudio se ha centrado en los efectos de OT en linfocitos humanos para corroborar el comportamiento observado en la artritis experimental. Así, nuestros resultados obtenidos en la citometría de flujo de linfocitos humanos estimulados muestran que OT es capaz de aumentar la población linfocitaria Treg CD4+ lo que podría determinar la capacidad inmunomoduladora de este péptido. También se observó una disminución de la población ROR $\gamma$ T que junto al aumento de Treg CD4+ indica una modificación del perfil poblacional hacia un carácter antiinflamatorio. Además de los linfocitos Treg CD4+, los Treg CD8+ tienen funciones inmunosupresoras importantes (Yu et al, 2018) y regulan las enfermedades autoinmunes mediadas por Th17 (Nakagawa et al, 2010). Se ha observado que los linfocitos Treg CD8+ están presentes en el sinovio de los pacientes con AR y tienen la capacidad de disminuir la actividad de los linfocitos T citotóxicos, así como la producción de citocinas proinflamatorias. Todo ello sugiere un

papel fundamental de estas células en el control de la sinovitis y el potencial que tiene esta diana para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Filaci et al, 2011).

Así, los linfocitos Treg CD8+ humanos inducidos con TFG $\beta$ 1 han demostrado la capacidad de disminuir la severidad de la artritis en el modelo CIA y la expresión del ARNm de IL-17 y RANKL en las patas de ratón (Sun et al, 2019). En este estudio demostramos que OT es capaz de aumentar la población de Treg CD8+ lo que parece contribuir a la disminución de la respuesta inmunitaria al colágeno tipo II y al desarrollo de la artritis.

El control de la destrucción ósea es un objetivo relevante en el tratamiento de la AR. La erosión del hueso subcondral y cortical es común en las áreas de la hiperplasia sinovial. También, la destrucción ósea se asocia a la presencia de osteoclastos y la expresión de RANKL (Stolina et al, 2005). El análisis por rayos X de las extremidades de los ratones mostró que OT contrarrestó la pérdida de densidad ósea inducida por el proceso artrítico.

Los niveles elevados de citocinas proinflamatorias y sobre todo el TNF $\alpha$  producido en la artritis, alteran el ciclo formación-resorción necesario para la homeostasis del hueso. TNF $\alpha$  contribuye a la inhibición de la maduración de los osteoblastos y actúa directamente sobre estas células (Nanes, 2003) o sobre la modulación de la vía Wnt, decantando la balanza hacia la resorción. De hecho, TNF $\alpha$  es clave en la inducción del inhibidor de Wnt DKK-1 en artritis en ratón y en la AR humana (Diarra et al, 2007). Además de la regulación de RANKL por las citocinas proinflamatorias (Nakashima et al, 2000), se sabe que TNF $\alpha$  coopera con RANKL para la diferenciación de los osteoclastos (Nanes, 2003). TNF $\alpha$  es incluso capaz de estimular la formación de osteoclastos independientemente de RANKL (Kobayashi et al, 2000). El efecto protector de OT que se ha observado a nivel óseo podría deberse a la reducción del número de osteoclastos y la inhibición de la liberación de

citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  o RANKL, sugiriendo así que OT es capaz de inhibir la osteoclastogénesis *in vivo*, un proceso crítico en la patogénesis del daño articular. Estos resultados confirman y extienden los descubrimientos previos sobre el efecto inhibitorio de los péptidos C-terminales de PTHrP en la función osteoclástica *in vitro* (Fenton et al, 1994).

La vía Wnt tiene un papel importante en el remodelado articular. Generalmente, se acepta que algunos miembros de la familia Wnt están relacionados con la producción de citocinas proinflamatorias o enzimas catabólicas (Sen, 2005). La inhibición de esta vía provoca una supresión de la actividad normal de los osteoblastos en los sitios de erosión ósea en la AR (Diarra et al, 2007; Walsh y Gravallese, 2010) y su activación es capaz de inhibir la diferenciación de los osteoclastos (Weiboda et al, 2016). También se ha observado que DKK1 aumenta la expresión de RANKL y facilita la osteoclastogénesis (Braun y Zwerina, 2011). Es interesante señalar que los niveles de DKK-1 en suero se encuentran elevados en pacientes con AR temprana y se correlacionan con la actividad de la enfermedad (Seror et al, 2016). De hecho, algunos estudios recientes han mostrado una reducción de DKK-1 en suero de pacientes artríticos en remisión. Sin embargo, los niveles de SOST no se correlacionan con la actividad de la enfermedad y no cambian durante la remisión (Kerschhan-Shindl et al, 2019). En la artritis experimental, la neutralización de DKK-1 con anticuerpos inhibe la erosión ósea sin afectar la inflamación (Diarra et al, 2007), mientras que la neutralización de SOST mejora la pérdida de densidad ósea sistémica pero no ayuda a mejorar la severidad de la enfermedad o las erosiones óseas focalizadas en el modelo CIA (Marenzana et al, 2013). No obstante, puede empeorar la sintomatología clínica en modelos de inflamación dependientes de TNF $\alpha$  ya que SOST tiene un efecto inhibitorio en la activación de p38 dependiente de TNF $\alpha$  (Wehmeyer et al, 2016).

En la línea con estos hallazgos, observamos una inhibición intensa por OT en los niveles de DKK-1 sin una modificación significativa de los niveles de SOST en los ratones CIA, sugiriendo que la disminución de DKK-1 juega un papel importante en el bloqueo de la pérdida de hueso por el tratamiento de OT.

Vistos estos resultados decidimos profundizar en la capacidad antirresortiva de OT. Para ello se midieron por PCR la expresión de los genes implicados en la actividad y diferenciación osteoclástica CSF1R, RANK, OSCAR, NFATc1, MED24 y catepsina K.

CSF1R es vital para la supervivencia, función, proliferación y diferenciación de la línea mieloide, incluidos los monocitos y los osteoclastos (Mun et al, 2020). Su expresión es baja en los precursores mieloides inmaduros y aumenta con la maduración de las células (Tagoh et al, 2002). La señal producida por CSF1R activado induce la expresión de RANK, que es esencial para la función osteoclástica, su proliferación y diferenciación (Kim y Kim, 2016). Por ello, la evidencia expuesta de que OT es capaz de reducir los niveles de RANK (aunque a 7 días la expresión de RANK ya haya disminuido notablemente) reafirma los resultados obtenidos *in vivo*.

Es lógico pensar que un bloqueo de CSF1R puede llevar a la reducción de la actividad osteoclástica. De hecho, se están realizando ensayos clínicos en ese sentido. No obstante, no son demasiado prometedores ya que parece ser que la activación de CSF1R podría tener un papel antiinflamatorio, por lo que su bloqueo podría llevar al agravamiento de la enfermedad (Mun et al, 2020). Así, el aumento de CSF1R provocado por OT, sobre todo a tiempos largos, junto con la disminución de RANK podría explicar ambos efectos: el antirresortivo y el antiinflamatorio.

Muy relacionado con CSF1R está MED24, un factor proliferativo que es fosforilado por ERK tras activarse por la unión de MCSF a CSF1R (Hamilton et al, 2019). OT fue capaz de aumentar MED24 lo que podría explicar el aumento de la activación de ERK por OT que, además, llevaría al aumento de la proliferación celular observada también en linfocitos humanos.

OSCAR fue identificado como un receptor implicado en la maduración de los osteoclastos incluyendo la multinucleación (Kim et al, 2002). Se trata de un inmunorreceptor capaz de identificar la triple hélice del colágeno que induce una cascada de señalización intracelular (Barrow et al, 2011). Parece ser que OSCAR es necesario para una activación primaria en la médula ósea. Sin embargo, la expresión decrece en los osteoclastos maduros (Søe et al, 2019). Este hecho también se observa en nuestros experimentos ya que la expresión de OSCAR se ve disminuida a 7 días comparándola con la expresión a 2 días. Además, OT es capaz de revertir el aumento provocado por la estimulación con MCSF y RANKL. Esto, junto con los resultados obtenidos de CSF1R y RANK fortalece la hipótesis de que OT es capaz de bloquear la diferenciación de los osteoclastos.

La acción de NFATc1 en la diferenciación de estas células no se conoce completamente. Se describe generalmente que NFATc1 es clave en la diferenciación de los osteoclastos activada por NF- $\kappa$ B, OSCAR o TREM-2. Parece ser que NFATc1 es importante en los primeros estadios de la osteoclastogénesis (Asagiri y Takayanagi, 2007). Sin embargo, es posible que la diferenciación pueda darse independientemente de este factor (Russo et al, 2019). En nuestro estudio, la expresión de NFATc1 no se vió afectada por el tratamiento con OT.

La diferenciación y activación de todos estos factores lleva a formación del osteoclasto y al desarrollo de su función. Esta activación de la célula provoca la producción de catepsina K entre otras muchas moléculas

degradativas. La liberación de esta proteasa produce la degradación del colágeno de tipo I. De hecho, la cathepsina K se encuentra muy expresada en macrófagos y fibroblastos sinoviales durante la AR (Hou et al, 2001). Pero no solo se ha observado un aumento en el sinovio artrítico sino que también se han correlacionado las concentraciones en suero con la degradación radiológica observada (Skoumal et al, 2005). Además, se ha descrito una disminución de la severidad de la artritis en ratones deficientes en cathepsina K (Hao et al, 2015). Su inhibición farmacológica lleva a un aumento de la mineralización ósea y, por ende, a un aumento de la densidad del hueso. Existen algunos ensayos clínicos de diferentes moléculas cuyo objetivo es el bloqueo de su actividad. Sin embargo, se encuentran muchos efectos adversos (Drake et al, 2017; Lu et al 2018). Es por esto que quizás el enfoque de limitar la liberación de esta enzima sea más apropiado y, en este sentido, OT ha mostrado que es capaz de controlar su expresión.

Todas estas observaciones explican por qué se vio una disminución de osteoclastos tras la estimulación con MCSF y RANKL junto con el tratamiento de OT. Además, estos hallazgos refuerzan los resultados expuestos en Lozano et al, 2011 y en Ardura et al, 2016 que demuestran el efecto positivo de la fracción C-terminal de PTHrP en modelos *in vivo* de regeneración ósea. En los últimos años, gracias a los avances de la biomedicina y la biotecnología se está optando cada vez más por el estudio de nuevas terapias biológicas que sean capaces no solo de parar el avance de la AR sino también de revertir sus efectos. Algunos ejemplos pueden ser el tratamiento con células madre mesenquimales (Luque-campos et al, 2019), la aplicación de vesículas extracelulares de estas células en condiciones inflamatorias (Tofiño-Vian et al, 2018) o el estudio del plasma rico en plaquetas para frenar la degradación del hueso (Wang et al, 2018). Estas terapias presentan dificultades para su obtención, la estandarización de los preparados y su administración. Por ello, el campo de los péptidos y oligopéptidos abre la puerta a generar nuevas

terapias con capacidad de regulación biológica sin perder la importancia clínica de la dosificación controlada. En este sentido, no solo se estudian péptidos propiamente humanos para controlar los procesos implicados en una enfermedad como la artritis. También se estudian posibilidades vegetales como los péptidos de semillas de lino (Kaneda et al, 2016) u otros derivados vegetales con capacidad reguladora de la diferenciación osteoclástica (Kodama y Kaito, 2020).

Los datos obtenidos han demostrado las propiedades antiartríticas del oligopéptido OT. Es interesante remarcar que los oligopéptidos tienen algunas ventajas para el desarrollo de medicamentos comparándolo con productos de mayor peso molecular. Por ejemplo, la síntesis eficiente y su baja inmunogenicidad, así como su farmacocinética favorable. Asimismo, los estudios han mostrado que algunos oligopéptidos tienen una estabilidad e integridad suficientes, buena penetración tisular para ejercer su efecto y una baja toxicidad. También, han mostrado propiedades interesantes para incorporarlos en diferentes sistemas de liberación y son susceptibles de modificación para mejorar el perfil farmacológico (Ji et al, 2017). Todas estas propiedades son relevantes para su potencial aplicación terapéutica.

Los resultados presentados demuestran el efecto protector de OT en el modelo CIA de AR y en células humanas. Este agente disminuye las respuestas inflamatoria e inmunitaria que llevan a la reducción del cartílago y a la erosión ósea en la AR. Los efectos protectores de OT pueden ser dependientes de la inhibición de la osteoclastogénesis, que puede estar mediada por la disminución de la expresión de DKK-1 y de diferentes citocinas clave, así como de los principales genes implicados en la resorción del hueso. Estos resultados demuestran el interés de los péptidos C-terminales de PTHrP para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias articulares como la AR.



# CONCLUSIONES



## 6. CONCLUSIONES

1. En el modelo CIA en ratón, OT es capaz de controlar la progresión de la artritis y la destrucción articular, con efectos beneficiosos sobre el tejido sinovial, cartílago y hueso.
2. Este péptido ha demostrado propiedades inmunomoduladoras, actuando sobre las fases humoral y celular del proceso artrítico. Reduce la producción de autoanticuerpos frente al colágeno II y aumenta el cociente de linfocitos FOXP3+/ROR $\gamma$ T+ lo que promueve la resolución del proceso inflamatorio. En este sentido, el tratamiento con OT aumenta la población Treg CD8+ *in vivo* y Treg CD4+ en linfocitos humanos.
3. En la artritis se produce un aumento de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-17 en las articulaciones, lo que lleva a un cambio del perfil de las células residentes a un fenotipo inflamatorio y degradativo. OT produce una disminución de la liberación de estas citocinas, lo que reduce la severidad del proceso artrítico.
4. OT disminuye el número de osteoclastos en la articulación y la degradación ósea en el modelo CIA. Este efecto estaría mediado por la inhibición de RANKL (que lleva a la diferenciación y activación osteoclástica) y de DKK-1 y SOST (inhibidores de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina implicada en la activación de osteoblastos).

5. En monocitos humanos, OT inhibe la diferenciación osteoclástica y la expresión de genes como RANK, OSCAR y catepsina K, lo que confirma la capacidad antirresortiva de este péptido.
6. OT es una molécula con propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antirresortivas, que ha demostrado su potencial para el desarrollo de tratamientos en enfermedades articulares que afectan tanto al cartílago como al hueso, como es el caso de la AR.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

Abu-Amer Y. IL-4 abrogates osteoclastogenesis through STAT6-dependent inhibition of NF-kappaB. *J Clin Invest.* 2001;107(11):1375–85.

Ai R, Hammaker D, Boyle DL, Morgan R, Walsh AM, Fan S, et al. Joint-specific DNA methylation and transcriptome signatures in rheumatoid arthritis identify distinct pathogenic processes. *Nat Commun.* 2016;7:11849.

Ai R, Whitaker JW, Boyle DL, Tak PP, Gerlag DM, Wang W, et al. DNA Methylome Signature in Synoviocytes From Patients With Early Rheumatoid Arthritis Compared to Synoviocytes From Patients With Longstanding Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(7):1978–80.

Alamanos Y, Voulgari P V, Drosos AA. Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review. *Semin Arthritis Rheum.* 2006;36(3):182–8.

Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Optimisation of a treat-to-target approach in rheumatoid arthritis: strategies for the 3-month time point. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(8):1479– 85.

Alivernini S, Tolusso B, Fedele AL, Di Mario C, Ferraccioli G, Gremese E. The B side of rheumatoid arthritis pathogenesis. *Pharmacol Res.* 2019;149:104465.

Ardura JA, Portal-Núñez S, Lozano D, Gutiérrez-Rojas I, Sánchez-Salcedo S, López-Herradón A, et al. Local delivery of parathyroid hormone-related protein-derived peptides coated onto a hydroxyapatite-based implant enhances bone regeneration in old and diabetic rats. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2016;104(8):2060–70.

Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(10):573–86.

Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007;40(2):251–64.

Barrow AD, Raynal N, Andersen TL, Slatter DA, Bihan D, Pugh N, et al. OSCAR is a collagen receptor that costimulates osteoclastogenesis in DAP12-deficient humans and mice. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3505–16.

Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010;233(1):233–55.

Bazzazi H, Aghaei M, Memarian A, Asgarian-Omran H, Behnampour N, Yazdani Y. Th1-Th17 Ratio as a New Insight in Rheumatoid Arthritis Disease. *Iran J Allergy, Asthma Immunol*. 2018;17(1):68-77.

Bendixen AC, Shevde NK, Dienger KM, Willson TM, Funk CD, Pike JW. IL-4 inhibits osteoclast formation through a direct action on osteoclast precursors via peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2443–8.

Böhler C, Radner H, Smolen JS, Aletaha D. Serological changes in the course of traditional and biological disease modifying therapy of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(2):241–244.

Braun T, Zwerina J. Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):235.

Bugatti S, Caporali R, Manzo A, Vitolo B, Pitzalis C, Montecucco C. Involvement of subchondral bone marrow in rheumatoid arthritis: Lymphoid neogenesis and in situ relationship to subchondral bone marrow osteoclast recruitment. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3448–59.

Burmester G-R, Kivitz AJ, Kupper H, Arulmani U, Florentinus S, Goss SL, et al. Efficacy and safety of ascending methotrexate dose in combination with adalimumab: the randomised CONCERTO trial. *Ann Rheum Dis*.

2015;74(6):1037–44.

Cardiel MH. Treat to Target Strategy in Rheumatoid Arthritis: Real Benefits. *Reumatol Clin*. 2013;9(2):101–5.

Chen X-X, Baum W, Dwyer D, Stock M, Schwabe K, Ke H-Z, et al. Sclerostin inhibition reverses systemic, periarticular and local bone loss in arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2013;72(10):1732–6.

Chen Z, Bozec A, Ramming A, Schett G. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2019;15(1):9–17.

Churlaud G, Pitoiset F, Jebbawi F, Lorenzon R, Bellier B, Rosenzweig M, et al. Human and Mouse CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front Immunol*. 2015;6:171.

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VFI, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:89195.

Coulthard LR, Geiler J, Mathews RJ, Church LD, Dickie LJ, Cooper DL, et al. Differential effects of infliximab on absolute circulating blood leucocyte counts of innate immune cells in early and late rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Immunol*. 2012;170(1):36–46.

Croxford AM, Whittingham S, McNaughton D, Nandakumar KS, Holmdahl R, Rowley MJ. Type II collagen–specific antibodies induce cartilage damage in mice independent of inflammation. *Arthritis Rheum*. 2013;65(3):650–9.

Cush JJ, Splawski JB, Thomas R, McFarlin JE, Schulze-Koops H, Davis LS, et al. Elevated interleukin-10 levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1995;38(1):96–104.

de Castro LF, Lozano D, Dapía S, Portal-Núñez S, Caeiro JR, Gómez-Barrena E,

et al. Role of the N- and C-terminal Fragments of Parathyroid-Hormone-Related Protein as Putative Therapies to Improve Bone Regeneration Under High Glucocorticoid Treatment. *Tissue Eng Part A*. 2009;16(4):1157–68.

de Castro LF, Lozano D, Portal-Núñez S, Maycas M, de la Fuente M, Caeiro JR, et al. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol*. 2012;227(4):1752–60.

De Young LM, Kheifets JB, Ballaron SJ, Young JM. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*. 1989;26(3–4):335–41.

Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med*. 2007;13(2):156–63.

Dissick A, Redman RS, Jones M, Rangan B V, Reimold A, Griffiths GR, et al. Association of Periodontitis With Rheumatoid Arthritis: A Pilot Study. *J Periodontol*. 2010;81(2):223–30.

Dong X, Zheng Z, Zhai Y, Zheng Y, Ding J, Jiang J, et al. ACPA mediates the interplay between innate and adaptive immunity in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2018;17(9):845–53.

Dougados M. Comorbidities in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2016;28(3):282–8.

Drake MT, Clarke BL, Oursler MJ, Khosla S. Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. *Endocr Rev*. 2017;38(4):325–50.

Duggleby R, Danby RD, Madrigal JA, Saudemont A. Clinical Grade Regulatory CD4(+) T Cells (Tregs): Moving Toward Cellular-Based Immunomodulatory

Therapies. *Front Immunol.* 2018;9:252.

Esbrit P, Alcaraz MJ. Current perspectives on parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein (PTHrP) as bone anabolic therapies. *Biochem Pharmacol.* 2013;85(10):1417–23.

Esbrit P, Portal-Núñez S, Largo R, Herrero-Beaumont G. Uso de osteostatina en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la artrosis. ES; ES2605813, 2017.

Ferrándiz ML, Maicas N, Garcia-Arnandis I, Terencio MC, Motterlini R, Devesa I, Joosten LA, van den Berg WB, Alcaraz MJ. Treatment with a CO-releasing molecule (CORM-3) reduces joint inflammation and erosion in murine collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(9):1211-7

Fenton AJ, Martin TJ, Nicholson GC. Carboxyl-terminal parathyroid hormone-related protein inhibits bone resorption by isolated chicken osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 1994;9(4):515–9.

Filaci G, Fenoglio D, Indiveri F. CD8(+) T regulatory/suppressor cells and their relationships with autoreactivity and autoimmunity. *Autoimmunity.* 2011;44(1):51–7.

Finnegan A, Kaplan CD, Cao Y, Eibel H, Glant TT, Zhang J. Collagen-induced arthritis is exacerbated in IL-10-deficient mice. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(1):R18-24.

Fleischmann R, Pangan AL, Song I-H, Mysler E, Bessette L, Peterfy C, et al. Upadacitinib Versus Placebo or Adalimumab in Patients With Rheumatoid Arthritis and an Inadequate Response to Methotrexate: Results of a Phase III, Double-Blind, Randomized Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(11):1788–800.

García de Yébenes MJ, Loza E. Artritis reumatoide: epidemiología e impacto

sociosanitario. *Reumatol Clin*. 2018;14(2):3–6.

Gaujoux-Viala C, Rincheval N, Dougados M, Combe B, Fautrel B. Optimal methotrexate dose is associated with better clinical outcomes than non-optimal dose in daily practice: results from the ESPOIR early arthritis cohort. *Ann Rheum Dis*. 2017;76(12):2054–2060.

Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):30–44.

Hamilton WB, Mosesson Y, Monteiro RS, Emdal KB, Knudsen TE, Francavilla C, et al. Dynamic lineage priming is driven via direct enhancer regulation by ERK. *Nature*. 2019;575(7782):355–60.

Hao L, Zhu G, Lu Y, Wang M, Jules J, Zhou X, et al. Deficiency of cathepsin K prevents inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis and periodontitis and reveals its shared osteoimmune role. *FEBS Lett*. 2015;589(12):1331–9.

Harre U, Schett G. Cellular and molecular pathways of structural damage in rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017;39(4):355–63.

Hou WS, Li Z, Gordon RE, Chan K, Klein MJ, Levy R, et al. Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2167–77.

Huang B, Wang QT, Song SS, Wu YJ, Ma YK, Zhang LL, et al. Combined use of etanercept and MTX restores CD4+/CD8+ ratio and Tregs in spleen and thymus in collagen-induced arthritis. *Inflamm Res*. 2012;61(11):1229–39.

Humby F, Bombardieri M, Manzo A, Kelly S, Blades MC, Kirkham B, et al. Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Med*. 2009;6(1):e1.

Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*. 2006;126(6):1121–33.

Jäger A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol*. 2009;183(11):7169–77.

Ji Y, Qiao H, He J, Li W, Chen R, Wang J, et al. Functional oligopeptide as a novel strategy for drug delivery. *J Drug Target*. 2017;25(7):597–607.

Jung MK, Lee JS, Kwak JE, Shin EC. Tumor Necrosis Factor and Regulatory T Cells. *Yonsei Med J*. 2019a;60(2):126–31.

Jung Y-K, Kang Y-M, Han S. Osteoclasts in the Inflammatory Arthritis: Implications for Pathologic Osteolysis. *Immune Netw*. 2019b;19(1):e2.

Källberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Rönnelid J, Klareskog L, et al. Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke. *Ann Rheum Dis*. 2011;70(3):508–11.

Kamali AN, Noorbakhsh SM, Hamedifar H, Jadidi-Niaragh F, Yazdani R, Bautista JM, et al. A role for Th1-like Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune disorders. *Mol Immunol*. 2019;105:107–15.

Kaneda T, Yoshida H, Nakajima Y, Toishi M, Nugroho AE, Morita H. Cyclolinopeptides, cyclic peptides from flaxseed with osteoclast differentiation inhibitory activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016;26(7):1760–1.

Kelchtermans H, Geboes L, Mitera T, Huskens D, Leclercq G, Matthys P. Activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(5):744–50.

Kemp B, Nicholson GC, Martin T, Fenton AJ, Hammonds R. Compounds and compositions which inhibit bone resorption. AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, LU MC, NL, SE; WO 92/10511, 1999.

Kerschanch-Schindl K, Ebenbichler G, Föegeter-Samwald U, Leiss H, Gesslbauer C, Herceg M, et al. Rheumatoid arthritis in remission : Decreased myostatin and increased serum levels of periostin. *Wien Klin Wochenschr.* 2019;131(1–2):1–7.

Kiener HP, Niederreiter B, Lee DM, Jimenez-Boj E, Smolen JS, Brenner MB. Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheum.* 2009;60(5):1305–10.

Kim JH, Kim N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Med J.* 2016;52(1):12–7.

Kim K-W, Kim H-R, Kim B-M, Cho M-L, Lee S-H. Th17 Cytokines Regulate Osteoclastogenesis in Rheumatoid Arthritis. *Am J Pathol.* 2015 ;185(11):3011–24.

Kim N, Takami M, Rho J, Josien R, Choi Y. A novel member of the leukocyte receptor complex regulates osteoclast differentiation. *J Exp Med.* 2002;195(2):201–9.

Klarenbeek PL, de Hair MJH, Doorenspleet ME, van Schaik BDC, Esveltdt REE, van de Sande MGH, et al. Inflamed target tissue provides a specific niche for highly expanded T-cell clones in early human autoimmune disease. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(6):1088–93.

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000;191(2):275–86.

Kodama J, Kaito T. Osteoclast Multinucleation: Review of Current Literature. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16):5685.

Koenders MI, Marijnissen RJ, Devesa I, Lubberts E, Joosten LAB, Roth J, et al. Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1 $\beta$ , and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(8):2329–39.

Kohno H, Shigeno C, Kasai R, Akiyama H, Iida H, Tsuboyama T, et al. Synovial Fluids from Patients with Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis Contain High Levels of Parathyroid Hormone–Related Peptide. *J Bone Miner Res.* 1997;12(5):847–54.

Komori T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation. *Histochem Cell Biol.* 2018;149(4):313–23.

Kondo Y, Yokosawa M, Kaneko S, Furuyama K, Segawa S, Tsuboi H, et al. Review: Transcriptional Regulation of CD4+ T Cell Differentiation in Experimentally Induced Arthritis and Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2018;70(5):653–61.

Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med.* 2016;8(369):369ra176.

Krishnamurthy A, Joshua V, Haj Hensvold A, Jin T, Sun M, Vivar N, et al. Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(4):721–9.

Leder BZ, Mitlak B, Hu M-Y, Hattersley G, Bockman RS. Effect of Abaloparatide

vs Alendronate on Fracture Risk Reduction in Postmenopausal Women With Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(3):938–43.

Lee S-Y, Min HK, Lee SH, Shin HJ, Lee WY, Cho Y-G, et al. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra)-Fc ameliorate autoimmune arthritis by regulation of the Th17 cells/Treg balance and arthrogenic cytokine activation. *Immunol Lett.* 2016;172:56–66.

Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med.* 2009;15(12):1414–20.

Leon L, Abasolo L, Fernandez-gutierrez B, Angel J, Hernandez-garcia C. Costes médicos directos y sus predictores en la cohorte “ Variabilidad en el manejo de la artritis reumatoide y las espondiloartritis en España .” *Reumatol Clin.* 2018;14(1):4–8.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.

Ljung L, Rantapää-Dahlqvist S. Abdominal obesity, gender and the risk of rheumatoid arthritis - a nested case-control study. *Arthritis Res Ther.* 2016;18(1):277.

Lozano D, Fernández-de-Castro L, Portal-Núñez S, López-Herradón A, Dapía S, Gómez-Barrena E, et al. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia. *Br J Pharmacol.* 2011;162(6):1424–38.

Lozano D, Feito MJ, Portal-Núñez S, Lozano RM, Matesanz MC, Serrano MC, et al. Osteostatin improves the osteogenic activity of fibroblast growth factor-2 immobilized in Si-doped hydroxyapatite in osteoblastic cells. *Acta Biomater.* 2012;8(7):2770–7.

Lozano D, Manzano M, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regí M, Gómez-Barrena E, et al. Osteostatin-loaded bioceramics stimulate osteoblastic growth and differentiation. *Acta Biomater.* 2010;6(3):797–803.

Lu J, Wang M, Wang Z, Fu Z, Lu A, Zhang G. Advances in the discovery of cathepsin K inhibitors on bone resorption. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2018;33(1):890–904.

Lu L, Barbi J, Pan F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(11):703–17.

Lubberts E. Th17 cytokines and arthritis. *Semin Immunopathol.* 2010;32(1):43–53.

Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJJ, Joosten LAB, et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum.* 2004;50(2):650–9.

Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, Schwarzenberger P, Coenen-de Roo CJJ, Kolls JK, et al. IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. *J Immunol.* 2003;170(5):2655–62.

Luque-Campos N, Contreras-López RA, Jose Paredes-Martínez M, Torres MJ, Bahraoui S, Wei M, et al. Mesenchymal Stem Cells Improve Rheumatoid Arthritis Progression by Controlling Memory T Cell Response. *Front Immunol.* 2019;10:798.

Ma CS, Phan TG. Here, there and everywhere: T follicular helper cells on the move. *Immunology.* 2017;152(3):382–7.

MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al.

Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000;43(1):30–7.

Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, Uehara S, Okamoto M, Ishihara A, et al. The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22):5525.

Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, MacFarlane JD, et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41(9):1552–63.

Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren A-K, Nicholas AP, Zendman AJW, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(10):1488–1492.

Marenzana M, Vugler A, Moore A, Robinson M. Effect of sclerostin-neutralising antibody on periarticular and systemic bone in a murine model of rheumatoid arthritis: a microCT study. *Arthritis Res Ther.* 2013;15(5):R125.

Martin TJ. Parathyroid Hormone-Related Protein, Its Regulation of Cartilage and Bone Development, and Role in Treating Bone Diseases. *Physiol Rev.* 2016;96(3):831–71.

Maruotti N, Cantatore F, Crivellato E, Vacca A, Ribatti D. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Histol Histopathol.* 2006;21(5):557–66.

Matcham F, Galloway J, Hotopf M, Roberts E, Scott IC, Steer S, et al. The Impact of Targeted Rheumatoid Arthritis Pharmacologic Treatment on Mental Health. *Arthritis Rheumatol.* 2018;70(9):1377–91.

McInnes IB, Buckley CD, Isaacs JD. Cytokines in rheumatoid arthritis — shaping the immunological landscape. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(1):63–8.

McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205–19.

McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):429–42.

Mun SH, Park PSU, Park-Min K-H. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. *Exp Mol Med*. 2020;52(8):1239–54.

Nakagawa T, Tsuruoka M, Ogura H, Okuyama Y, Arima Y, Hirano T, et al. IL-6 positively regulates Foxp3+CD8+ T cells in vivo. *Int Immunol*. 2010;22(2):129–39.

Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275(3):768–75.

Nandakumar KS, Bäcklund J, Vestberg M, Holmdahl R. Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(6):R544-50.

Nanes MS. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene*. 2003;321:1–15.

Ngo ST, Steyn FJ, McCombe PA. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol*. 2014;35(3):347–69.

Notley CA, McCann FE, Inglis JJ, Williams RO. ANTI-CD3 therapy expands the numbers of CD4+ and CD8+ Treg cells and induces sustained amelioration of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2010;62(1):171–8.

O'Brien W, Fissel BM, Maeda Y, Yan J, Ge X, Gravallesse EM, et al. RANK-Independent Osteoclast Formation and Bone Erosion in Inflammatory Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2016;68(12):2889–900.

Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014;506(7488):376–81.

Otero M, Goldring MB. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(5):220.

Panagopoulos PK, Lambrou GI. Bone erosions in rheumatoid arthritis: recent developments in pathogenesis and therapeutic implications. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2018;18(3):304–19.

Pang M, Martinez AF, Jacobs J, Balkan W, Troen BR. RANK ligand and interferon gamma differentially regulate cathepsin gene expression in pre-osteoclastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(3):756–63.

Payá M, Terencio MC, Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Involvement of secretory phospholipase A2 activity in the zymosan rat air pouch model of inflammation. *Br J Pharmacol*. 1996;117(8):1773–9.

Petrelli A, van Wijk F. CD8+ T cells in human autoimmune arthritis: the unusual suspects. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(7):421–8.

Platas J, Guillén MI, Gomar F, Castejón MA, Esbrit P, Alcaraz MJ. Anti-senescence and Anti-inflammatory Effects of the C-terminal Moiety of PTHrP Peptides in OA Osteoblasts. *Journals Gerontol Ser A*. 2016;72(5):624–31.

Plows D, Kontogeorgos G, Kollias G. Mice lacking mature T and B lymphocytes develop arthritic lesions after immunization with type II collagen. *J Immunol*. 1999;162(2):1018–23.

Portal-Núñez S, Ardura JA, Lozano D, Martínez de Toda I, De la Fuente M, Herrero-Beaumont G, et al. Parathyroid hormone-related protein exhibits antioxidant features in osteoblastic cells through its N-terminal and osteostatin domains. *Bone Joint Res.* 2018;7(1):58–68.

Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Rabourdin-Combe C, et al. Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood.* 2004;104(13):4029–37.

Rodríguez-de la Rosa L, López-Herradón A, Portal-Núñez S, Murillo-Cuesta S, Lozano D, Cediél R, et al. Treatment with N- and C-terminal peptides of parathyroid hormone-related protein partly compensate the skeletal abnormalities in IGF-I deficient mice. *PLoS One.* 2014;9(2):e87536–e87536.

Roeleveld DM, Koenders MI. The role of the Th17 cytokines IL-17 and IL-22 in Rheumatoid Arthritis pathogenesis and developments in cytokine immunotherapy. *Cytokine.* 2015;74(1):101–7.

Russo R, Mallia S, Zito F, Lampiasi N. Gene Expression Profiling of NFATc1-Knockdown in RAW 264.7 Cells: An Alternative Pathway for Macrophage Differentiation. *Cells.* 2019;8(2):131.

Scherer HU, Huizinga TWJ, Krönke G, Schett G, Toes REM. The B cell response to citrullinated antigens in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2018;14(3):157–69.

Schett G. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Osteoclasts. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):203.

Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(11):656–64.

Schett G, Teitelbaum SL. Osteoclasts and Arthritis. *J Bone Miner Res.*

2009;24(7):1142–6.

Schettler A, Thorn H, Jockusch BM, Tschesche H. Release of proteinases from stimulated polymorphonuclear leukocytes. Evidence for subclasses of the main granule types and their association with cytoskeletal components. *Eur J Biochem.* 1991;197(1):197–202.

Schminke B, Trautmann S, Mai B, Miosge N, Blaschke S. Interleukin 17 inhibits progenitor cells in rheumatoid arthritis cartilage. *Eur J Immunol.* 2016;46(2):440–5.

Scholtyssek C, Krönke G, Schett G. Inflammation-Associated Changes in Bone Homeostasis. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2012;11(3):188–95.

Sen M. Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 2005;44(6):708–13.

Seror R, Boudaoud S, Pavy S, Nocturne G, Schaeveerbeke T, Saraux A, et al. Increased Dickkopf-1 in Recent-onset Rheumatoid Arthritis is a New Biomarker of Structural Severity. Data from the ESPOIR Cohort. *Sci Rep.* 2016;6:18421.

Sherwood JC, Bertrand J, Eldridge SE, Dell’Accio F. Cellular and molecular mechanisms of cartilage damage and repair. *Drug Discov Today.* 2014;19(8):1172–7.

Shim J, Stavre Z, Gravallesse EM. Bone Loss in Rheumatoid Arthritis: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Calcif Tissue Int.* 2018;102(5):533–46.

Skoumal M, Haberhauer G, Kolarz G, Hawa G, Woloszczuk W, Klingler A. Serum cathepsin K levels of patients with longstanding rheumatoid arthritis: correlation with radiological destruction. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R65–70.

Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim* . 2018;4(1):18001.

Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023–38.

Smolen JS, Landewé RBM, Bijlsma JWJ, Burmester GR, Dougados M, Kerschbaumer A, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann Rheum Dis*. 2020;79(6):685-99.

Smolen JS, van der Heijde D, Machold KP, Aletaha D, Landewé R. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(1):3–5.

Søe K, Andersen TL, Hinge M, Rolighed L, Marcussen N, Delaisse J-M. Coordination of Fusion and Trafficking of Pre-osteoclasts at the Marrow-Bone Interface. *Calcif Tissue Int*. 2019;105(4):430–45.

Song L, Tan J, Wang Z, Ding P, Tang Q, Xia M, et al. Interleukin-17A facilitates osteoclast differentiation and bone resorption via activation of autophagy in mouse bone marrow macrophages. *Mol Med Rep*. 2019;19(6):4743–52.

Stamm TA, Machold KP, Aletaha D, Alasti F, Lipsky P, Pisetsky D, et al. Induction of sustained remission in early inflammatory arthritis with the combination of infliximab plus methotrexate: the DINORA trial. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):174.

Stolina M, Adamu S, Ominsky M, Dwyer D, Asuncion F, Geng Z, et al. RANKL is a marker and mediator of local and systemic bone loss in two rat models of inflammatory arthritis. *J bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2005;20(10):1756–65.

Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, et al.

Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(01):70–81.

Sun J, Yang Y, Huo X, Zhu B, Li Z, Jiang X, et al. Efficient Therapeutic Function and Mechanisms of Human Polyclonal CD8(+)CD103(+)Foxp3(+) Regulatory T Cells on Collagen-Induced Arthritis in Mice. *J Immunol Res.* 2019;2019:8575407.

Tagoh H, Himes R, Clarke D, Leenen PJM, Riggs AD, Hume D, et al. Transcription factor complex formation and chromatin fine structure alterations at the murine c-fms (CSF-1 receptor) locus during maturation of myeloid precursor cells. *Genes Dev.* 2002;16(13):1721–37.

Tao J-H, Cheng M, Tang J-P, Liu Q, Pan F, Li X-P. Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases. *Inflammation.* 2017;40(1):328–39.

Taylor PC, Keystone EC, van der Heijde D, Weinblatt ME, del Carmen Morales L, Reyes Gonzaga J, et al. Baricitinib versus Placebo or Adalimumab in Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med.* 2017;376(7):652–62.

Tofiño-Vian M, Guillén MI, Alcaraz MJ. Extracellular vesicles: A new therapeutic strategy for joint conditions. *Biochem Pharmacol.* 2018;153:134–46.

van Aken J, Heimans L, Gillet-van Dongen H, Visser K, Roday HK, Speyer I, et al. Five-year outcomes of probable rheumatoid arthritis treated with methotrexate or placebo during the first year (the PROMPT study). *Ann Rheum Dis.* 2014;73(2):396–400.

van Hamburg JP, Tas SW. Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 2018;87:69–81.

van Tuyl LHD, Voskuyl AE, Boers M, Geusens P, Landewé RBM, Dijkmans BAC,

et al. Baseline RANKL:OPG ratio and markers of bone and cartilage degradation predict annual radiological progression over 11 years in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(9):1623-8.

Viatte S, Massey J, Bowes J, Duffus K, Consortium arcOGEN, Eyre S, et al. Replication of Associations of Genetic Loci Outside the HLA Region With Susceptibility to Anti-Cyclic Citrullinated Peptide-Negative Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 2016;68(7):1603–13.

Viatte S, Plant D, Bowes J, Lunt M, Eyre S, Barton A, et al. Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(12):1984–90.

Volkov M, van Schie KA, van der Woude D. Autoantibodies and B Cells: The ABC of rheumatoid arthritis pathophysiology. *Immunol Rev.* 2020;294(1):148–63.

Vyas SP, Hansda AK, Goswami R. Rheumatoid arthritis: “melting pot” of T helper subsets. *Int Rev Immunol.* 2019;38(5):212–31.

Walker JA, McKenzie ANJ. TH2 cell development and function. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):121–33.

Walsh NC, Gravallesse EM. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunol Rev.* 2010;233(1):301–12.

Wang C, Liao H, Cao Z. Role of Osterix and MicroRNAs in Bone Formation and Tooth Development. *Med Sci Monit.* 2016;22:2934–42.

Wang D, Weng Y, Guo S, Zhang Y, Zhou T, Zhang M, et al. Platelet-rich plasma inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation through activation of Wnt pathway during bone remodeling. *Int J Mol Med.* 2018;41(2):729–38.

Watson WC, Townes AS. Genetic susceptibility to murine collagen II

autoimmune arthritis. Proposed relationship to the IgG2 autoantibody subclass response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC loci. *J Exp Med.* 1985;162(6):1878–91.

Wehmeyer C, Frank S, Beckmann D, Böttcher M, Cromme C, König U, et al. Sclerostin inhibition promotes TNF-dependent inflammatory joint destruction. *Sci Transl Med.* 2016 ;8(330):330ra35.

Wehr P, Purvis H, Law S-C, Thomas R. Dendritic cells, T cells and their interaction in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2019;196(1):12–27.

Weivoda MM, Ruan M, Hachfeld CM, Pederson L, Howe A, Davey RA, et al. Wnt Signaling Inhibits Osteoclast Differentiation by Activating Canonical and Noncanonical cAMP/PKA Pathways. *J bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2016;31(1):65–75.

Williams RO. Collagen-Induced Arthritis in Mice BT - Target Discovery and Validation Reviews and Protocols: Volume 2: Emerging Molecular Targets and Treatment Options. In: Sioud M, editor. Totowa, NJ: Humana Press; 2007. p. 265–84.

Yu MB, Langridge WHR. The function of myeloid dendritic cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 2017;37(7):1043–51.

Yu Y, Ma X, Gong R, Zhu J, Wei L, Yao J. Recent advances in CD8(+) regulatory T cell research. *Oncol Lett.* 2018;15(6):8187–94.

Zaiss MM, Axmann R, Zwerina J, Polzer K, Gückel E, Skapenko A, et al. Treg cells suppress osteoclast formation: A new link between the immune system and bone. *Arthritis Rheum.* 2007;56(12):4104–12.

Zaiss MM, Frey B, Hess A, Zwerina J, Luther J, Nimmerjahn F, et al. Regulatory T cells protect from local and systemic bone destruction in arthritis. *J Immunol.* 2010;184(12):7238–46.

# ANEXOS



## 8. ANEXOS

### 8.1 Autorización del procedimiento para el trabajo con animales de experimentación utilizado en la presente tesis



**GENERALITAT  
VALENCIANA**  
CONSELLERIA DE AGRICULTURA, MEDIO AMBIENTE,  
CAMBIO CLIMÁTICO Y DESARROLLO RURAL  
**DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA Y PESCA**



Unión Europea

**AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2016/VSC/PEA/00053**

Vista la solicitud realizada en fecha **16/02/16** con nº reg. entrada **5776** por D/D<sup>a</sup>. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES4607800001001**, para realizar el procedimiento:

***"Estudio de la actividad antiartrítica de nuevas moléculas en el modelo de ARTRITIS INDUCIDA POR COLAGENO"***

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Ganadería y Sanidad y Bienestar Animal.

**AUTORIZO:**

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2016/VSC/PEA/00053** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **María Luisa Ferrandiz Manglano**

Establecimiento: **Sección de Producción Animal SCIE-Campus Burjassot**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 8 de marzo de 2016

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Rogelio Llanes Ribas



Comunitat Valenciana  
Estrategia de Experimentación Animal