

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Biología Celular



**TESIS DOCTORAL**

**El sinoviocito fibroblástico en la artrosis.  
Efecto protector de VIP y CRF**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Selene Pérez García**

Directoras

**Rosa Pérez Gomariz  
Yasmina Juarranz Moratilla**

**Madrid, 2017**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Departamento de Biología Celular (Morfología Microscópica)**



**El sinoviocito fibroblástico en la artrosis.**

**Efecto protector de VIP y CRF**

**Tesis Doctoral**

**Selene Pérez García**

**2016**

Directores: Rosa Pérez Gomariz, Yasmina Juarranz Moratilla



**Universidad Complutense de Madrid**

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular (Morfología Microscópica)

**El sinoviocito fibroblástico en la artrosis.**

**Efecto protector de VIP y CRF**

Trabajo de investigación que presenta

**Selene Pérez García**

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas en la Universidad Complutense de  
Madrid



Fdo. Dña. Selene Pérez García

Dirigido por los Doctores

Rosa Pérez Gomariz, Catedrática y Yasmina Juarranz, Profesora Titular del  
Departamento de Biología Celular (Morfología microscópica) de la Facultad de Ciencias  
Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid



Fdo. Dra. Rosa Pérez Gomariz



Fdo. Dra. Yasmina Juarranz Moratilla





**Facultad de Biología**  
**Dpto. Biología Celular (Morfología Microscópica)**

C/ José Antonio Novais nº 2.  
Ciudad Universitaria 28040 Madrid  
Teléfono: 91 394 49 81. Fax: 91 394 49 81

La Dra. Rosa Pérez Gomariz, Catedrática y la Dra. Yasmina Juarranz, Profesora Titular del Departamento de Biología Celular (Morfología microscópica) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Selene Pérez García, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Biología Celular (Morfología microscópica) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de Tesis Doctoral titulado: **“El sinoviocito fibroblástico en la artrosis. Efecto protector de VIP y CRF”**. Considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> Directoras

Fdo. Dra. Rosa Pérez Gomariz

Fdo. Dra. Yasmina Juarranz Moratilla



# Agradecimientos

---

---



No puede ser más cierto el antiguo proverbio que dice que “un viaje de miles de millas comienza con un simple paso”. En mi caso ese paso que di, varios años atrás, me ha traído hasta aquí y son muchas las personas que han estado a mi lado y a las que quiero agradecer que me hayan acompañado a lo largo de este viaje.

Aunque ya desde pequeña me llamaban la atención los “bichitos” y el espíritu investigador, este viaje se podría remontar a mis años de colegio. Allí conocí a una de las primeras personas que me impulsó a iniciarlo, Marisa Zugasti. Gracias por inculcarme ese gusanillo para que empezara a pensar en sumergirme en este mundo de la Biología.

Tras decidir iniciar mi camino, una de mis primeras paradas fue en la Facultad de Biología, que parece tener un extraño imán, pues aún no he conseguido salir de ella. Allí fueron muchas las personas con las que me crucé a lo largo de la carrera, pero de todas ellas me quedo sin dudarlo con mis “biologuillos”: Félix, Miguel, Sara y Jorge, Sandra, Giaco, Lorena y Virginia. Gracias a todos por los momentos buenos y los menos buenos, pero sobre todo por las risas y las experiencias compartidas durante la carrera y tras ella, por los que seguimos compartiendo y los que aún nos quedan por vivir. En especial, gracias a mis “Grecas”, Sara y Sandra, porque “me duele el corazón de amaros locamente” (vosotras me entendéis). Gracias por vuestra compañía en los momentos de escritura en el cuarto de becarios, donde nunca falta un poco de azúcar para levantar el ánimo, por vuestras palabras y por las risas cuando más se necesitan, voy a echar mucho de menos esos momentos. Gracias Sandra, porque ha sido una verdadera suerte redescubrirte tras la carrera como una gran persona y amiga, nos veremos en Holanda. Gracias a mi peque, Sara, por tantos momentos compartidos. Aunque nos conociéramos en los últimos años de universidad, no

## Agradecimientos

---

hemos sido sólo compañeras de carrera, sino también compañeras de piso, de trabajo y de experiencias, pero sobre todo amigas. Gracias a mis niños, Félix y Miguel, por todo lo vivido tanto dentro como fuera de la universidad, por quererme y cuidarme tanto y por darme tantos buenos momentos de risas y diversión, también con vuestros amigos, que ahora además son los míos. Gracias Félix por seguir a mi lado desde los primeros días de la carrera. Gracias también a Antonio, Álex y en especial a Pilar porque, por las casualidades de la vida, gracias a ti hoy tengo a mi lado a la persona con quien ahora continúo mi viaje.

En ese tramo del camino en el que la Biología empezaba a formar parte de mi vida, los animales siempre habían sido una parte importante de ella, por lo que no quería perder la oportunidad de adentrarme en el mundo de la Zoología, donde Dolores Trigo me tendió una mano. Gracias a ti, a Darío, a Mónica y al resto de vuestro grupo por ayudarme en mis primeros pasos dentro de la universidad y darme la oportunidad de formar parte, por primera vez, de un grupo de investigación que tan bien me acogió.

La siguiente parada de mi viaje me llevó al departamento de Biología Celular, donde conocí al grupo VIP que, como bien indica su nombre, alberga a unas personas muy importantes, que han sido una parte esencial para que yo pueda estar escribiendo ahora estas palabras. En primer lugar gracias a Rosa, no sólo como jefa de grupo y directora de tesis, que no es poca cosa, sino sobre todo como persona, porque quien dice que “el científico antes de científico es persona”, ya lo demuestra. Gracias también por enseñarme y darme la oportunidad de llegar hasta aquí. Gracias a mi codirectora de tesis, Yasmina, con quien tuve la suerte de coincidir en la asignatura de Biología Celular, abriéndome una puertecita para poder formar parte de este grupo. Gracias a Maricarmen por su eterna sonrisa, sus

ánimos y su optimismo, y a Javier, por sus chascarrillos y su compañía en los descansos para “el cafelito”. Por supuesto, quería darles las gracias también a mis compañeros de laboratorio y fatigas. Gracias a Irene por estar siempre ahí para ayudar ante cualquier duda de laboratorio o consulta informática, pero sobre todo, gracias por esta última etapa en la que te he vuelto a descubrir como una fantástica compañera y persona. Gracias a Iria, porque es un orgullo acompañar en sus primeros pasos en el grupo a alguien y ver que da ese fruto. Gracias también porque en ti encontré una nueva gran amistad. Por compartir llantos, pero también risas, y por los momentos que seguiremos compartiendo. Gracias al último fichaje del grupo, Raúl, por darnos un nuevo aporte masculino entre tanta mujer, que falta hacía. Gracias por tu ánimo y por tu ayuda, que para mí ha sido vital para poder seguir escribiendo, y por venir a rescatarme a la hora del café. Sin duda has sido un buen fichaje profesional y personal. Agradecerles también al resto de personas que han pasado por el laboratorio, hayamos coincidido de una u otra forma. En especial, gracias a Elena, por compartir también momentos de amistad, risas y cervezas, y a Cata, un encanto de persona, con quien tuve la suerte de coincidir y en Sitges y en algún que otro congreso. Por último, quería darte las gracias a ti Mar, por enseñarme tanto en todos los sentidos, por tu amistad y tu apoyo, por tener siempre una palabra de ánimo o el consejo que necesito, por los momentos buenos y malos, por tantas experiencias vividas, tanto dentro como fuera del laboratorio y en diferentes lugares del mapa. Por todo eso y por seguir a mi lado desde el primer día en el que entré en este grupo hasta hoy, Gracias. Gracias también a tus padres y, como no, a la Mire y al chiquet, Alfonso, porque compartir momentos con ellos es “otra movida”.

En este tramo de mi viaje, coincidí además con muchas otras personas dentro del departamento, a las que también me gustaría dedicar unas palabras.

## Agradecimientos

---

Gracias Teresa, no sólo como la mejor secretaria que podamos tener, sino porque cada paso en el camino es importante para poder llegar a la meta y tú eres uno de los pilares que me ha ayudado a poder estar hoy aquí. Gracias por ayudarme cuando ni siquiera me conocías y por seguir demostrándome la maravillosa persona que eres. Gracias al grupo de Zapata, además de a mi Sarita, a David y a Javi por las comidas y los buenos momentos. Gracias Javi porque da gusto ver la sonrisa que se te pone al contarnos anécdotas de tu niña. Gracias David por lo personaje que eres, por tus risas y por tu cariño. Gracias también por estar siempre dispuesto a echar una mano y por tu ayuda técnica en montaje de vídeos y sesiones fotográficas. Gracias al grupo de Agustín González. A los que se fueron, como Alberto, a los que volvieron, como Laura, y los que se irán, como Sandra, pero con los que, de un modo u otro, nos volveremos a encontrar, porque “airearse” con vosotras siempre es un placer. Gracias a Íñigo por estar siempre dispuesto a ayudar y por su contribución al título de la tesis. Gracias también a Marta Torroba, a quien, además de haber conocido como profesora, he podido conocer como compañera. Espero que podamos compartir más cafés contigo. Como no, gracias a nuestro querido veterano, Benjamín, por tener siempre una palabra bonita al empezar y terminar el día. Gracias también a Isabel, Mar, Milagros y al resto de personas del departamento con las que he podido compartir algún momento a lo largo de este viaje.

Otra de mis paradas en el camino me llevó hasta Barcelona, y tanto me gustó ese viaje que volví a repetir. Allí coincidí con una serie de peculiares personajes a los que tengo que agradecer el haber podido disfrutar de una estancia tan genial y especial. Gracias a Jordi, Laura, Aina, María (Paca para los amigos), Laureta, Sergi, Guy y Natalia. Gracias Laura por ayudarme y animarme tanto. Gracias María por tus locuras y por los momentos con los “peludetes” en la

protectora de Mongat y Tiana, no me olvido de nuestro Rufus. Gracias Laureta por los buenos momentos y por la cebra rescatada, que aún guardo. Gracias Guy por tus risas y payasadas y por lo bien que nos lo pasamos haciendo el vídeo para tu tesis. Y por último, pero no menos importante, gracias a Aina, porque lo que seguro que me dio esa estancia fue una gran amiga. Gracias por “adoptarme” durante ese tiempo, por todos los momentos, risas y experiencias compartidas, no sólo en Barcelona, sino también en Montreal y, sea en un lugar u otro, por seguir compartiendo muchas más. Pero no fue Barcelona el único lugar que visité, sino que también hice otras paradas en Creta y Nueva York, por lo que me gustaría agradecer a Christos Tsatsanis y Mary Goldring por haberme dado la oportunidad de haber podido realizar estancias en sus grupos de investigación.

Si hay algo que, sin duda, me ha ayudado a seguir avanzando y continuar en el camino, ha sido la Danza. Gracias a todas las personas que me han enseñado y a las compañeras y compañeros con los que he compartido momentos tan especiales e indescritibles. En especial, gracias a Teresa, porque sé que algún día volveremos a bailar juntas.

Algunas personas me han acompañado incluso antes de iniciar este viaje y por eso quiero agradecerles que, después de tanto tiempo, sigan a mi lado en el camino. Gracias a todos con los que he compartido momentos especiales a lo largo de él. Gracias a mi “asturianina” favorita, Sandra, por ser tan buena amiga. Por lo bien que nos lo pasamos en tu despedida de soltera y porque fue una suerte conocerte en aquel “Pote” en el que además conociste a Borja, Gracias también a él. Gracias Jaime por ser tan bueno y seguir siendo el mismo desde que te conocí, incluso cuando eras más bajito que yo. Gracias por quererme tanto y hacerme sentir tan especial, por tus letras, por haber estado siempre a mi lado en el colegio

## Agradecimientos

---

y seguir estándolo, aunque vivamos algo más lejos. Gracias Iván, porque cambiaste mi forma de ver la vida. Porque hemos crecido juntos. Por los viajes y tantas las experiencia que hemos compartido. Gracias por confiar y creer en mí más que yo misma, por ser más que un amigo y un hermano.

Quien desde luego ha estado desde el inicio de cualquier viaje, ha sido mi familia. Gracias a todos mis tíos y mis primos. Gracias Tata por tu bondad y tu cariño. Gracias Tío Chus, porque para mí siempre has sido un ejemplo a seguir. Gracias Sofía porque, además de ser mi prima, eres mi amiga y me alegro de haber podido compartir viajes y experiencias varias contigo. Gracias también a mis abuelos, donde sea que estén más allá del "Picu Tres Conceyos". Pero sobre todo, Gracias a mis padres y a mi hermano. Gracias Papá por sentirte siempre tan orgulloso y confiar en nosotros, por querer compartir cada experiencia con nosotros y poder haber conocido tantos lugares juntos. Por compartir gustos y aficiones, aunque lo mío no sea la pintura. Por ser un personaje tan peculiar y auténtico. Gracias Mamá por ser la mejor madre y la persona más buena que conozco, por sufrir cuando yo sufro y reír cuando yo río. Gracias por haberme enseñado tanto, porque la inteligencia no es sólo cuestión de estudios. Gracias Mamá por ser tan especial. Gracias Adán porque siempre fuiste el mejor compañero de juegos y de imaginación. Por haber compartido tantas historias ¡y qué de historias!, creo que con todos nuestros personajes podríamos escribir otra tesis. Por haber aprendido también de ti. Por enseñarme que lo importante es ser uno mismo, sin importarte el qué dirán. Por inculcarme ese amor por la naturaleza y porque, en parte, has sido una influencia para que haya tirado por estos derroteros y esté hoy aquí. Por ser siempre tan cariñoso conmigo, aunque yo lo demuestre menos, y por haber ejercido tan bien de hermano mayor. Aunque no suela decirlo, sabéis que os quiero mucho. Gracias también al último miembro que tuvimos en la familia, Manchas,

porque ya desde cachorrito se tumbaba en mi regazo a estudiar cada tarde al volver del colegio y estuvo a mi lado incluso durante los inicios de esta tesis. Gracias por todo el cariño que me diste, sé que siempre seguirás conmigo. Gracias también a la familia del Pizu, a todos tus primos y tus tíos. Gracias Rodri, porque discutir contigo siempre es un placer y porque, irremediablemente, también te haces querer. Y, como no, gracias a la Tere y al Barba, porque es una suerte haber coincidido con una familia como la vuestra.

Y, en la última etapa de este camino, quería darte las Gracias a ti cariño, porque, quién nos iba a decir aquel verano, ya diez años atrás y después de tantos vaivenes, que ese viaje nos iba a traer hasta aquí, con Kirby incluido. Gracias porque, de una forma u otra, has estado ahí en momentos clave de mi vida. Gracias por haber sido un amigo durante tanto tiempo y ser ahora mi compañero de viaje. Gracias por haberme hecho llorar y reír, por hacerme sentir y vivir. Por verme guapa aunque tenga ojeras y por quererme tal y como soy, incluso durante esta etapa de tesis, que sé que no ha sido fácil. Porque como dice la frase de Kase-O que tanto te gusta “dirigiremos nuestra propia peli y nos reservaremos el mejor papel”.

Y como es complicado poder dar las gracias, una por una, a todas las personas que me han acompañado en este camino y creo que ya me he extendido demasiado, resumiré diciendo: GRACIAS a todos los acompañantes de este viaje que aún continúa.



**Agradecemos a todos los pacientes y clínicos su colaboración en este estudio. La presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a la financiación por parte del Instituto de Salud Carlos III: programa RETICS, RIER (RD08/0075/0005) y el proyecto (PI12/00758), ambos cofinanciados por los fondos FEDER de la Unión Europea; así como a una ayuda FPU del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.**

# Índice





---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>9</b>
<b>1. LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS</b> .....	<b>11</b>
1.1. Definición y clasificación .....	11
1.2. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades reumáticas .....	12
<b>2. LA ARTROSIS</b> .....	<b>13</b>
2.1. Definición y clínica .....	13
2.2. Historia y epidemiología .....	15
2.3. Etiopatogenia y factores de riesgo .....	17
2.4. Clasificación.....	20
2.3.1. La gonartrosis.....	21
2.5. Diagnóstico.....	22
2.4.1. Exploración clínica .....	22
2.4.2. Técnicas de imagen.....	22
2.4.3. Biomarcadores .....	24
2.6. Tratamiento .....	26
<b>3. LA ARTICULACIÓN SINOVIAL EN LA ARTROSIS</b> .....	<b>30</b>
3.1. La articulación sinovial .....	30
3.1.1. Membrana sinovial .....	31
3.1.2. Cartílago articular .....	32
3.1.3. Hueso subcondral .....	34
3.2. Alteraciones en la articulación artrósica.....	34
3.2.1. Membrana sinovial .....	35
3.2.2. Cartílago articular .....	36
3.2.3. Hueso subcondral .....	37
3.3. Células implicadas en el desarrollo de la artrosis .....	38
3.3.1. El sinoviocito fibroblástico .....	38
3.3.2. Otras células sinoviales y del infiltrado inflamatorio.....	40
3.3.3. Condrocitos.....	42
3.3.4. Osteoclastos y osteoblastos .....	43
<b>4. FISIOPATOLOGÍA DE LA ARTROSIS</b> .....	<b>44</b>
4.1. Inflamación y sinovitis.....	44
4.1.1. Mediadores inflamatorios en artrosis .....	48
4.1.2. La IL-1 $\beta$ como citocina proinflamatoria .....	49
4.2. Degradación de cartílago y remodelación ósea.....	50
4.2.1. La fibronectina como producto de degradación del cartílago.....	51
<b>5. PAPEL DE LAS PROTEINASAS EN LA ARTROSIS</b> .....	<b>54</b>
5.1. Sistema uPA .....	55
5.2. MMPs .....	58
5.2.1. Colagenasas: la MMP-13.....	61
5.2.2. Gelatinasas: la MMP-9 .....	62

5.3. ADAMTS .....	63
5.3.1. Agrecanasas: ADAMTS-4 y ADAMTS-5.....	65
5.3.2. Proteinasas de COMP: ADAMTS-7 y ADAMTS-12 .....	67
<b>6. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA ARTROSIS .....</b>	<b>69</b>
6.1. MAPK.....	69
6.2. PI3K/Akt .....	71
6.3. NF-κB.....	73
6.4. AP-1 .....	75
6.5. CREB .....	77
6.6. Wnt/β-catenina.....	78
6.7. Runx2 .....	81
<b>7. LA ARTRITIS REUMATOIDE .....</b>	<b>82</b>
7.1. Epidemiología y clínica.....	83
7.2. La articulación sinovial y el sinoviocito fibroblástico en la artritis reumatoide.....	84
7.3. Etiología y fisiopatología .....	85
<b>8. LOS NEUROPEPTIDOS COMO MEDIADORES NEUROINMUNES .....</b>	<b>86</b>
8.1. Neuroinmunomodulación.....	86
8.2. Péptido intestinal vasoactivo (VIP) .....	88
8.2.1. Caracterización y distribución.....	88
8.2.2. Gen, regulación y procesamiento de VIP .....	90
8.2.3. Familia de VIP .....	92
8.2.4. Receptores de VIP.....	93
8.2.5. Vías implicadas en la señalización de VIP .....	97
8.2.6. VIP en inflamación y enfermedades reumáticas .....	99
8.3. Factor liberador de corticotropina (CRF) .....	102
8.3.1. Caracterización y distribución.....	102
8.3.2. Gen, regulación y procesamiento de CRF .....	104
8.3.3. Familia de CRF.....	105
8.3.4. Receptores de CRF .....	107
8.3.5. Vías implicadas en la señalización de CRF .....	108
8.3.6. CRF en inflamación y enfermedades reumáticas.....	110
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>113</b>
<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>117</b>
1. <i>Mapping the CRF-Urocortins system in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts: effect of vasoactive intestinal peptide .....</i>	119
2. <i>Urokinase plasminogen activator system in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients: modulation by inflammatory mediators and neuropeptides .....</i>	131
3. <i>Healthy and osteoarthritic synovial fibroblasts produce ADAMTS-4, -5, -7 and -12: induction by IL-1β and fibronectin, and contribution to cartilage damage (Under review) .....</i>	143

---

4. <i>VIP and CRF reduce ADAMTS expression and function in osteoarthritis synovial fibroblasts</i> .....	155
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>167</b>
1. Implicación del sinoviocito fibroblástico en la patogénesis de la artrosis mediante la producción de proteinasas .....	169
2. La IL-1 $\beta$ y los Fn-fs como mediadores de inflamación y destrucción en la artrosis .....	174
3. Expresión de las familias de VIP y CRF en los sinoviocitos fibroblásticos de artrosis y artritis reumatoide .....	180
4. Los neuropéptidos como herramienta terapéutica en el tratamiento de la artrosis .....	184
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>191</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>195</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>199</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>207</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>213</b>
<b>OTRAS PUBLICACIONES</b> .....	<b>255</b>



## Abreviaturas





---

❖ <b>α<sub>2</sub>M</b>	Alfa-2-macroglobulina
❖ <b>AC</b>	Adenilato ciclase
❖ <b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa
❖ <b>ADAMTS</b>	Desintegrina y metaloproteinasa con motivos trombospondina, del inglés <i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
❖ <b>AGEs</b>	Productos finales de glicación avanzada, del inglés <i>advanced glycation end products</i>
❖ <b>AINEs</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
❖ <b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
❖ <b>anti-CCP/ ACPA</b>	Anticuerpo antipéptido cíclico citrunilado
❖ <b>AP-1</b>	Proteína activadora 1, del inglés <i>activator protein 1</i>
❖ <b>APC</b>	Poliposis adenomatosa coli
❖ <b>AR</b>	Artritis reumatoide
❖ <b>ARNm</b>	ARN mensajero
❖ <b>ATF</b>	Factor de transcripción activador, del inglés <i>activating transcription factor</i> Fragmento amino-terminal, del inglés <i>amino-terminal fragment</i>
❖ <b>BMP</b>	Proteína morfogenética ósea, del inglés <i>bone morphogenetic protein</i>
❖ <b>CBFβ</b>	Factor de unión central beta, del inglés <i>Core Binding Factor beta</i>
❖ <b>CD</b>	Célula dendrítica
❖ <b>Cer1</b>	<i>Cerberus</i>
❖ <b>CK1</b>	Caseína quinasa 1
❖ <b>CIA</b>	Artritis inducida por colágeno, del inglés <i>collagen-induced arthritis</i>
❖ <b>COMP</b>	Proteína oligomérica de la matriz del cartílago, del inglés <i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
❖ <b>COX</b>	Ciclooxigenasa
❖ <b>CRE</b>	Elemento de respuesta al AMP cíclico, del inglés <i>cAMP response element</i>
❖ <b>CREB</b>	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc, del inglés <i>cAMP response element-binding protein</i>
❖ <b>CREM</b>	Modulador del elemento de respuesta al AMP cíclico
❖ <b>CRF</b>	Factor liberador de corticotropina, del inglés <i>corticotrophin-releasing factor</i>
❖ <b>CRF-BP</b>	Proteína de unión a CRF, del inglés <i>corticotropin releasing factor-binding protein</i>
❖ <b>CRFR</b>	Receptor de CRF
❖ <b>CS</b>	Condroitín sulfato
❖ <b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño, del inglés <i>damage-associated molecular patterns</i>
❖ <b>DDR-2</b>	Receptor de dominio de discoidina 2, del inglés <i>discoidin domain receptor 2</i>

- ❖ **Dkk** *Dickkopf*
- ❖ **DMARDs** Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad, del inglés *disease modifying antirheumatic drugs*
- ❖ **DMOADs** Fármacos modificadores de la OA, del inglés *disease-modifying OA drug*
- ❖ **Dsh** *Disheveled*
- ❖ **EGF** Factor de crecimiento epidérmico, del inglés *epidermal growth factor*
- ❖ **ERE** Elemento de respuesta a estrógenos
- ❖ **ERK** Quinasa regulada por señales extracelulares
- ❖ **FCN** Factor de crecimiento nervioso
- ❖ **FGF** Factor de crecimiento de fibroblastos
- ❖ **Fn-fs** Fragmentos derivados de la fibronectina
- ❖ **FR** Factor reumatoide
- ❖ **Fzd** *Frizzled*
- ❖ **GAGs** Glicosaminoglicanos
- ❖ **G-CSF** Factor estimulante de colonias de granulocitos, del inglés *granulocyte colony-stimulating factor*
- ❖ **GEP** Precursor de granulina-epitelina, del inglés *granulin-epithelin precursor*
- ❖ **GHRF** Factor liberador de la hormona del crecimiento, del inglés *growth hormone releasing factor*
- ❖ **GIP** Péptido inhibidor gástrico, del inglés *gastric inhibitory polypeptide*  
Proteína de interacción con GPCRs, del inglés *GPCR interacting protein*
- ❖ **GLP** Péptidos relacionado con el glucagón, del inglés *glucagón-like peptide*
- ❖ **GM-CSF** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, del inglés *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*
- ❖ **GPCR** Receptor acoplado a proteínas G, del inglés *G protein-coupled receptor*
- ❖ **GPI** Glicosilfosfatidilinositol
- ❖ **GRE** Elemento de respuesta a glucocorticoides, del inglés *glucocorticoid response element*
- ❖ **GRK** Proteína quinasa de los GPCRs, del inglés *GPCRs kinases*
- ❖ **GSK3 $\beta$**  Glucógeno sintasa quinasa 3 beta
- ❖ **HD** Donantes sanos (no artríticos), del inglés *healthy donors*
- ❖ **HPA** Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal
- ❖ **ICAM-1/CD54** Molécula de adhesión intracelular1, del inglés *intercellular adhesion molecule1*
- ❖ **ICE** Enzima convertidora de IL-1, del inglés *IL-1 converting enzyme*
- ❖ **IGD** Dominio intraglobular, del inglés *intraglobular domain*
- ❖ **IGF** Factor de crecimiento insulínico, del inglés *insulin-like growth factor*

---

❖ <b>iGluRs</b>	Receptores ionotrópicos de glutamato, del inglés <i>ionotropic glutamate receptors</i>
❖ <b>IκB</b>	Proteína inhibidora de NF-κB
❖ <b>IKK</b>	Quinasa de IκB
❖ <b>IL</b>	Interleucina
❖ <b>IL-1Ra</b>	Antagonista del receptor de IL-1
❖ <b>IL-1RI</b>	Receptor de IL-1
❖ <b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible, del inglés <i>inducible nitric oxide synthase</i>
❖ <b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol trifosfato
❖ <b>IRM</b>	Imagen por resonancia magnética
❖ <b>JAK</b>	Quinasa Janus
❖ <b>JNK/ SAPK</b>	Quinasa N-terminal de c-Jun
❖ <b>KS</b>	Queratán sulfato
❖ <b>LEF</b>	Potenciador linfoide
❖ <b>LOX-5</b>	Lipooxigenasa 5
❖ <b>LRP</b>	Lipoproteínas de baja densidad
❖ <b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
❖ <b>Ly-6</b>	Antígeno 6 de linfocitos, del inglés <i>lymphocyte antigen 6</i>
❖ <b>LU</b>	Dominio Ly-6 y uPAR
❖ <b>MAPK</b>	Proteínas quinasas activadas por mitógenos, del inglés <i>mitogen-activated protein kinases</i>
❖ <b>MAPKK</b>	Quinasas de las MAPK
❖ <b>MAPKKK</b>	Quinasas de quinasas de las MAPK
❖ <b>MCP-1/ CCL2</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos 1, del inglés <i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
❖ <b>MEC</b>	Matriz extracelular
❖ <b>MIP-1α/ CCL3</b>	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa, del inglés <i>macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
❖ <b>miRNAs</b>	microARNs
❖ <b>MMPs</b>	Metaloproteinasas de matriz
❖ <b>MT-MMPs</b>	MMPs asociadas a membrana, del inglés <i>membrane-type matrix metalloproteinases</i>
❖ <b>NF-κB</b>	Factor nuclear-kappa B, del inglés <i>nuclear factor-kappa B</i>
❖ <b>nGRE</b>	Elemento de respuesta negativo a glucocorticoides
❖ <b>NK</b>	Del inglés <i>natural killer</i>
❖ <b>NO</b>	Óxido nítrico

- ❖ **O<sub>2</sub><sup>-</sup>** Anión superóxido
- ❖ **OA** Artrosis, del inglés *osteoarthritis*
- ❖ **OPG** Osteoprotegerina
  
- ❖ **PACAP** Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria, del inglés *pituitary adenylate cyclase-activating peptide*
- ❖ **PAI** Inhibidor del activador del plasminógeno, del inglés *plasminogen activator inhibitor*
- ❖ **PAMPs** Patrones moleculares asociados a patógenos, del inglés *pathogen-associated molecular patterns*
- ❖ **PCR** Proteína C-reactiva
- ❖ **PDGF** Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés *platelet derived growth factor*
- ❖ **PEBP2β** Proteína de unión al potenciador del poliomavirus 2 beta, del inglés *polyomavirus enhancer binding protein 2 beta*
- ❖ **PET** Tomografía por emisión de positrones, del inglés *positron emission tomography*
- ❖ **PGE2** Prostaglandina E2
- ❖ **PI3K** Fosfatidilinositol 3-quinasa
- ❖ **PIP<sub>2</sub>** Fosfatidil inositol difosfato
- ❖ **PKA** Proteína quinasa A
- ❖ **PKC** Proteína quinasa C
- ❖ **PLA2** Fosfolipasa A2
- ❖ **PMA** Acetato de forbol miristato
- ❖ **POMC** Proopiomelanocortina
- ❖ **PRR** Receptor de reconocimiento de patrón, del inglés *pattern recognition receptor*
- ❖ **PTH** Hormona paratiroidea, del inglés *parathyroid hormone*
- ❖ **PTHrP** Proteína relacionada con la hormona paratiroidea
- ❖ **RAMPs** Proteínas modificadoras de la actividad del receptor, del inglés *receptor activity-modifying proteins*
- ❖ **RANK** Receptor activador de NF-κB
- ❖ **RANKL** Ligando de RANK
- ❖ **RANTES/CCL5** Regulador de la activación de células T normalmente expresadas y secretadas, del inglés *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*
- ❖ **ROS** Especies reactivas de oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*
- ❖ **Runx** Factor de transcripción relacionado con Runt
- ❖ **SF/FLS** Sinoviocito fibroblástico o del inglés *fibroblast-like synoviocyte*
- ❖ **Sfrp** Proteínas secretadas relacionadas con Fzd

---

❖	<b>siRNAs</b>	ARNs de interferencia pequeños
❖	<b>SM</b>	Sinoviocito macrofágico
❖	<b>SNC</b>	Sistema nerviosos central
❖	<b>SNS</b>	Sistema nerviosos simpático
❖	<b>SPECT</b>	Tomografía computarizada de emisión de fotones simples, del inglés <i>single photon emission computed tomography</i>
❖	<b>sRAGE</b>	Receptor soluble para compuestos de glicosilación avanzada
❖	<b>SRE</b>	Elemento de respuesta a esterol, del inglés <i>sterol response element</i>
❖	<b>STAT</b>	Transductor de señal y activador de la transcripción
❖	<b>SYSADOA</b>	Fármacos de acción sintomática lenta para la OA, del inglés <i>symptomatic slow acting drugs for OA</i>
❖	<b>TCF</b>	Factor derivado de células T
❖	<b>TGFβ</b>	Factor de crecimiento transformante beta, del inglés <i>transforming growth factor beta</i>
❖	<b>Th</b>	Células T colaboradoras, del inglés <i>T helper</i>
❖	<b>TIMP</b>	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
❖	<b>TLR</b>	Receptor tipo <i>Toll</i> , del inglés <i>Toll-like receptor</i>
❖	<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral alfa, del inglés <i>tumor necrosis factor alpha</i>
❖	<b>TRAF</b>	Factor activador de la transcripción
❖	<b>TRE</b>	Elemento de respuesta al 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA)
❖	<b>TRPV1</b>	Receptor de potencial transitorio V1, del inglés <i>transient receptor potential V1</i>
❖	<b>TSE</b>	Elemento regulador de la expresión dependiente de tejido, del inglés <i>tissue specifier element</i>
❖	<b>TSP1</b>	Motivos repetidos de trombospondina tipo 1
❖	<b>UCN</b>	Urocortina
❖	<b>UDPGD</b>	Uridina difosfogluosa deshidrogenasa
❖	<b>uPA</b>	Activador del plasminógeno tipo uroquinasa, del inglés <i>urokinase-type plasminogen activator</i>
❖	<b>uPAR</b>	Receptor de uPA
❖	<b>VCAM-1/ CD106</b>	Molécula de adhesión vascular 1, del inglés <i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
❖	<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular, del inglés <i>vascular endothelial growth factor</i>
❖	<b>VIP</b>	Péptido intestinal vasoactivo, del inglés <i>vasoactive intestinal peptide</i>
❖	<b>Wif1</b>	Factor inhibidor de Wnt
❖	<b>Wnt</b>	<i>Wingless</i> e <i>Int</i>
❖	<b>YKL-39</b>	Glicoproteína 39 del cartílago



# Introducción





# 1. LAS ENFERMEDADES REUMÁTICAS

---

## 1.1. Definición y clasificación

Las enfermedades reumáticas, también denominadas musculoesqueléticas, son aquellas que afectan al tejido conectivo del aparato locomotor: articulaciones, huesos, músculos, cartílago, tendones y ligamentos, y que no son consecuencia directa de un traumatismo reciente. Suelen ser enfermedades crónicas caracterizadas por dolor, inflamación y disfunción. Se conocen alrededor de unas 200 enfermedades reumáticas que afectan a un cuarto de la población europea y a cientos de millones de personas en todo el mundo. Son las enfermedades más comunes en los países industrializados, suponiendo un gran coste individual y social (más de 200 billones de euros al año en los países Europeos), siendo además la principal causa de baja por enfermedad y jubilación anticipada en los países desarrollados. Comparten una serie de síntomas comunes entre los que se pueden incluir: dolor y sensibilidad, pérdida de movilidad y flexibilidad, inflamación, deformación articular y fatiga (EULAR, 2009; EULAR, 2015).

Aunque existen discrepancias acerca de la clasificación de las enfermedades reumáticas, la clasificación de la *Arthritis Foundation* (1980), aunque algo incompleta, es una de las más utilizadas, dividiendo estas enfermedades en 10 categorías que incluyen un total de 178 alteraciones reumáticas (Cañete *et al.*, 2008):

1. Enfermedades difusas del tejido conjuntivo
2. Espondiloartropatías
3. Artrosis
4. Síndromes reumáticos asociados a agentes infecciosos
5. Enfermedades provocadas por alteraciones metabólicas y endocrinas
6. Neoplasias
7. Trastornos neurovasculares
8. Trastornos óseos y del cartílago
9. Trastornos extraarticulares
10. Otros trastornos asociados a manifestaciones articulares

## 1.2. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades reumáticas

La etiopatogenia de las enfermedades reumáticas es complicada, puesto que son multitud de factores, tanto propios del individuo como del ambiente, los que participan en la enfermedad (Cañete *et al.*, 2008). Aunque en ocasiones es difícil distinguir unas de otras, es importante diagnosticar y tratar las enfermedades reumáticas de manera temprana, puesto que de este modo se puede reducir el dolor y la progresión de las mismas. El diagnóstico inicial puede realizarse mediante exploración física de los signos y síntomas que manifiesta el paciente. Este primer diagnóstico debe ser complementado con pruebas de laboratorio, búsqueda de marcadores bioquímicos y técnicas de imagen (EULAR, 2009; EULAR, 2015).

La mayoría de las enfermedades reumáticas no pueden ser totalmente curadas, pero sí existen diferentes tratamientos que pueden paliar el dolor y controlar los síntomas. Entre ellos se engloban terapias tanto farmacológicas como no farmacológicas incluyendo, además de cambios en determinados hábitos de vida y terapias naturales. En casos graves, en ocasiones es necesario recurrir a la cirugía. Por otro lado, el tratamiento farmacológico abarca distintos tipos de medicamentos que en general se engloban en (EULAR, 2015):

- **DMARDs** (fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad): sirven para paliar los síntomas y la destrucción articular, frenando la progresión de la enfermedad. Normalmente se usan en combinación con otros fármacos.
- **Biológicos**: combaten la progresión en enfermedades reumáticas inflamatorias, actuando sobre dianas específicas del sistema inmune. Son medicamentos modificados genéticamente originados a partir de organismos vivos.
- **Glucocorticoides**: controlan los síntomas de enfermedades reumáticas inflamatorias. Son hormonas antiinflamatorias relacionadas con el cortisol con multitud de efectos secundarios, es por ello que suelen usarse en combinación y a bajas dosis.
- **AINEs** (antiinflamatorios no esteroideos): controlan los síntomas de las enfermedades reumáticas reduciendo el dolor y la inflamación pero no la progresión.

## 2. LA ARTROSIS

---

### 2.1. Definición y clínica

La artrosis (**OA**) se define como una enfermedad **reumática crónica degenerativa**, caracterizada por una pérdida progresiva de la función de las articulaciones sinoviales, consecuencia de la pérdida gradual del cartílago articular, con repercusión en el hueso subcondral e inflamación en la membrana sinovial (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Haseeb y Haqqi, 2013; Monfort, 2010). Actualmente la OA no se considera como una única enfermedad en sí misma, sino como un conjunto de patologías heterogéneas con una serie de características clínicas, patológicas y radiológicas comunes (Monfort, 2010), siendo el resultado de diferentes desórdenes que culminan en la alteración de una o más articulaciones corporales (Sokolove y Lepus, 2013). Las principales articulaciones afectadas son: manos, rodillas, pies, cadera y columna vertebral (Goldring y Goldring, 2007; Martel-Pelletier y Pelletier, 2010), siendo la cervical, lumbar e interfalángicas distales las localizaciones más frecuentes (Cañete *et al.*, 2008). Aunque suele manifestarse en personas de edad avanzada, no es una consecuencia directa e inevitable del envejecimiento, sino que otros factores de riesgo junto con la edad contribuyen a su desarrollo (Monfort, 2010).

La OA es una enfermedad **multifactorial** en la que intervienen diferentes componentes mecánicos, genéticos, biológicos, bioquímicos y metabólicos que culminan en una disfunción articular, con las secuelas psicológicas que todo ello conlleva. Los síntomas son el reflejo de un desequilibrio dinámico entre la rotura y reparación de los tejidos de la articulación. Como consecuencia se produce la pérdida del **cartílago** articular, así como a la aparición de nuevas formaciones óseas (**osteofitos**), **esclerosis** del hueso subcondral y **quistes** subcondrales, con pérdida localizada del **espacio articular**. La **cápsula articular** se engrosa y la **musculatura periarticular** se debilita, pudiéndose originar además alteraciones en la **médula ósea**, laxitud en los **tendones** y degeneración del **menisco**. A este proceso se suma una proliferación e inflamación sinovial o **sinovitis**, con aumento de la vascularización e infiltrado inflamatorio (Abramson y Attur, 2009; Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Hunter *et*

*al.*, 2008; Martel-Pelletier y Pelletier, 2010). La OA afecta a todas las estructuras articulares de manera asimétrica, de tal forma que la desalineación origina un reparto desigual de cargas, generando un bucle de retroalimentación positiva en el daño articular (Felson, 2006).

La OA suele tener un curso lento y progresivo. Se manifiesta con dolor articular, limitación de los movimientos y crujidos, que pueden ir acompañados de inflamación y derrame sinovial, tumefacción, deformidad, mala alineación, inestabilidad y rigidez articulares (Monfort, 2010). El principal síntoma es el **dolor** crónico, resultado de diversos procesos y cambios en la articulación, entre los que se incluye un proceso inflamatorio con sinovitis y alteraciones en el hueso subcondral (esclerosis, aumento de la presión intraósea, microfracturas, proliferación perióstica y formación de quistes y osteofitos), distensión de la cápsula o ligamentos, alteración de los meniscos, contracturas y atrofas musculares. Este dolor es de curso lento y suele ser de intensidad leve o moderada progresando a medida que avanza la enfermedad, con fases de empeoramiento y mejora, agravándose en momentos de actividad y mejorando en reposo (Abramson y Attur, 2009; Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Monfort, 2010). En el dolor parecen no sólo influir los cambios morfológicos en la articulación afectada, sino que además juegan un papel importante las vías y mecanismos implicados en su procesamiento, así como factores psicosociales. La **limitación de la movilidad** se debe a la pérdida del arco articular, siendo el paciente incapaz de flexionar y extender del todo la articulación afectada. Lo **crujidos** se originan por el roce entre dos superficies cartilaginosas rugosas, debido a la degradación del cartílago articular, y son uno de los principales indicativos de la enfermedad, sobre todo en el caso de la gonartrosis. La **tumefacción** es consecuencia de la **inflamación**, que origina un engrosamiento de la membrana sinovial o sinovitis y derrame. En la gonartrosis, el derrame y engrosamiento sinovial se relacionan además con el dolor. La **deformación** y mala alineación articular son consecuencia de las alteraciones óseas por proliferación de los osteofitos, el engrosamiento de la cápsula articular y de los tejidos blandos, y la alteración del eje articular, así como la degradación del cartílago, hueso y tejidos circundantes en casos avanzados. La **rigidez** se manifiesta como dificultad para iniciar movimientos después del reposo. A diferencia de la artritis reumatoide (AR), en la OA

esta rigidez se mantiene durante poco tiempo. La OA también puede ocasionar otras alteraciones como atrofia y debilidad muscular, alteraciones propioceptivas, presencia de cuerpos libres intraarticulares, consecuencia de la degradación del hueso y el cartílago, quistes de Baker, por acumulación de líquido sinovial, e incluso complicaciones neurológicas en el caso de OA de columna (Monfort, 2010). A parte de esta sintomatología, las consecuencias derivadas del dolor y la discapacidad que esta enfermedad conlleva, suelen acarrear importantes consecuencias psicológicas en los pacientes pudiendo desencadenar procesos de ansiedad y depresión (EULAR, 2015).

## 2.2. Historia y epidemiología



**Figura 1. Ejemplos de OA en la historia y el arte. A.** Pie artrósico de un Homo Habilis (Homo 8 de Olduvai). **B.** *Mujer friendo huevos* de Diego Velázquez, con rasgos de OA en las manos. **C.** *Aun aprendo* de Francisco de Goya, con rasgos de OA en las manos y el cuerpo del anciano. **D.** *Martirio de San Mauricio* de El Greco, con rasgos de OA en los pies de los personajes.

Se dice de la OA que es la enfermedad más antigua de mundo, presente ya en mamíferos desde hace millones de años e incluso en dinosaurios. La primera referencia histórica a las enfermedades reumáticas remonta a la Antigua Grecia con Hipócrates (460 a.C.), quien hace una distinción entre artropatías agudas, como sería la fiebre reumática, y crónicas, donde se incluirían la AR y la OA. Sin embargo, la OA no se empezó a conocer hasta mediados del siglo XIX, siendo claramente diferenciada como tal ya en el siglo XX, determinándose sus características anatómicas, clínicas y radiográficas. Estudios paleopatológicos han encontrado signos de OA en restos animales anteriores incluso a la aparición del hombre. El primer caso que se conoce de OA data de hace 1.8 millones de años, en el pie de un *Homo Habilis*. También se han descrito casos en momias egipcias y en gran parte de la población de la antigua Roma y la Edad Media. En el arte hay varias representaciones con rasgos artrósicos en manos y rodillas, como se han hallado en figuras de la civilización india precolombina mesoamericana o del período clásico en México. También encontramos otros ejemplos en obras de pintores ilustres como Diego Velázquez, Francisco de Goya o El Greco (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Pelletier *et al.*, 2001) (Figura 1).

La OA es la artropatía más frecuente y la principal causa de daño y disfunción entre la población de mediana y edad anciana (Bondeson *et al.*, 2010; Loeser *et al.*, 2012), siendo la enfermedad más prevalente en los países desarrollados. Es complicado determinar con exactitud la prevalencia de la enfermedad debido a multitud de dificultades a la hora de definir la OA según los criterios utilizados en cuanto al método de diagnóstico, sintomatología o rango de edad. A pesar de estas dificultades, se sabe que la prevalencia aumenta con la edad, siendo rara en menores de 45 años. Suele ser más frecuente en mujeres, aunque depende de la edad y articulación afectada. Actualmente, más del 70% de las personas mayores de 50 años poseen signos radiológicos de OA en alguna localización, teniendo una distribución mundial más extendida que la AR. Se estima que el 18% de las mujeres y el 9.6% de hombres de 60 o más años padecen OA sintomática. En España, la OA afecta al 10% de la población general, siendo la principal causa de invalidez permanente (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Cañete *et al.*, 2008; Monfort, 2010).

### 2.3. Etiopatogenia y factores de riesgo

Existen multitud de factores de riesgo relacionados con la aparición y progresión de la OA, que pueden ser tanto sistémicos como locales. Estos factores podrían actuar sobre un cartílago normal en el que cargas biomecánicas anómalas favorecerían la liberación de diversos mediadores causando un proceso inflamatorio e induciendo la destrucción del cartílago articular; o bien, cargas mecánicas normales actuarían sobre un cartílago previamente alterado desencadenando un proceso similar (Monfort, 2010). Los condrocitos y las células sinoviales poseen receptores capaces de responder a estímulos mecánicos, muchos de los cuales son también receptores para componentes de la matriz extracelular (MEC). Tanto el daño traumático de la articulación como la activación de estos receptores por estímulos mecánicos, dan lugar a un aumento de la producción de proteinasas, citocinas y quimiocinas proinflamatorias, así como de otros mediadores de respuesta al estrés (Goldring y Goldring, 2007; Pulai *et al.*, 2005), cuya activación exacerbada promueve los procesos inflamatorios y de degradación del tejido articular.

Entre los factores sistémicos relacionados con la OA el principal es la **edad** (Abramson y Attur, 2009). La debilidad muscular, los cambios en el peso corporal y en la propiocepción contribuyen al estrés mecánico de la articulación. Con la edad se producen cambios en las propiedades del cartílago articular debido a alteraciones en los componentes de la matriz extracelular, principalmente el colágeno y los proteoglicanos, dando como consecuencia el reblandecimiento del cartílago, así como una disminución de la fuerza de resistencia y dureza (Goldring y Goldring, 2007; Loeser, 2006). Los condrocitos van perdiendo su capacidad para mantener la homeostasis del cartílago articular. Su actividad anabólica disminuye y, en consecuencia, su capacidad para reparar y remodelar la MEC del cartílago (Abramson y Attur, 2009; Aigner *et al.*, 2007; Dudhia, 2005). Debido al aumento de la actividad oxidativa, se produce una acumulación de proteínas de la MEC del cartílago en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi de los condrocitos, originando una disminución de la síntesis de proteínas y un aumento de la apoptosis.

Otro de los factores de riesgo es el **sexo**. Generalmente la OA tiene una mayor prevalencia en mujeres que en hombres, aunque esta varía dependiendo de la localización y el grupo de edad (Cañete *et al.*, 2008). De tal forma que partir de los 50 años suele ser más frecuente en mujeres, principalmente la OA de rodilla, siendo la OA de cadera más común en los hombres. Algunos estudios relacionan esta mayor prevalencia con los estrógenos, pero existe cierta controversia al respecto (Abramson y Attur, 2009).

Existe además un claro **componente genético** en la OA cuya heredabilidad es de entre un 50% y un 65%, además de otros múltiples factores que contribuyen a la incidencia y severidad de la enfermedad. Entre los genes candidatos se encuentran algunos relacionados con el desarrollo de la articulación. Polimorfismos o mutaciones en genes que codifican proteínas de la MEC del cartílago o moléculas implicadas en vías de señalización se relacionan con el desarrollo de OA temprana. Entre ellos destacan los genes que codifican para diferentes tipos de colágeno, principalmente para el colágeno tipo II (**COL2A1**), así como el de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (**COMP**) (Abramson y Attur, 2009; Goldring y Goldring, 2007; Valdes *et al.*, 2007). Otros genes candidatos son los que codifican factores de crecimiento relacionados con el desarrollo de tejidos articulares o los relacionados con la vía de **Wnt** (*Wingless* e *Int*), así como genes asociados a mediadores proinflamatorios, como la proteína de unión al factor de crecimiento transformante beta (**TGFβ**) o los genes de la interleucina-1 (**IL-1**) (Abramson y Attur, 2009; Sandell, 2012). Estudios de asociación de genoma completo (GWAs) han demostrado también la asociación de ciertos loci con el desarrollo de la OA, entre los que se incluyen el locus del factor de crecimiento y diferenciación 5 (**GDF5**), el locus de la enzima yodotironina-desyodasa tipo 2 (**DIO2**) y la región cromosómica **7q22**, relacionada con la condrogénesis y el metabolismo del cartílago (Martel-Pelletier *et al.*, 2012).

También se ha descrito un componente **racial** en la OA, de tal manera que la distribución de las articulaciones afectadas varía según la raza. Asimismo, la OA es más frecuente en la población de raza blanca que en la de raza negra (Monfort, 2010).

Entre los factores locales, la **obesidad** es uno de los principales directamente relacionados con la OA en articulaciones de carga, especialmente en la rodilla (Monfort, 2010). El estrés mecánico que soporta la articulación como consecuencia del sobrepeso acelera el proceso de degradación del cartílago. Por otro lado, los adipocitos también están implicados en la regulación de las células articulares. Además factores derivados de los adipocitos, como la IL-6 o la proteína C-reactiva (PCR) tienen un efecto procatabólico en los condrocitos, así como la implicación de adipocinas como la leptina (Abramson y Attur, 2009; McAlindon *et al.*, 2012). Asimismo, un modo de vida activo y el ejercicio físico se asocian con una menor prevalencia de las enfermedades reumáticas (EULAR, 2015).

Ciertas **lesiones** y **malformaciones** son otros factores locales que pueden también predisponer a la OA. Lesiones en el menisco o el ligamento, así como otro tipo de traumatismos y fracturas en huesos próximos a la rodilla que den lugar a alteraciones o cambios en la articulación con un reparto asimétrico de cargas, pueden ocasionar alteraciones en el cartílago y hueso subcondral (Monfort, 2010). En muchos casos este tipo de lesiones va asociado a la edad. Alteraciones en el ligamento cruzado anterior son comunes en ancianos con OA. Asimismo, malformaciones *genu varo* (rodillas separadas o arqueadas) o *genu valgo* (rodillas juntas o en X), que ocasionan alteraciones en la alineación, son un factor principal en el desarrollo de la OA, además de marcadores de severidad de la enfermedad (Abramson y Attur, 2009; Loeser *et al.*, 2012).

Entre otros factores de riesgo se incluyen **factores ocupacionales**, como ciertas profesiones o deportes de competición que requieren un sobreuso articular, como es el caso de la hiperflexión frecuente en la OA de rodilla (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; EULAR, 2009; Monfort, 2010). **Factores nutricionales**, como la falta de vitaminas A, C o D, que actúan como agentes antioxidantes y reguladores de los procesos inflamatorios y de remodelación ósea, también se relacionan con la OA (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Monfort, 2010). En cuanto al **tabaco**, aunque su implicación en la OA es controvertida y en general se asocia más con la AR (Adachi *et al.*, 2013), existe también un riesgo asociado a padecer OA (EULAR, 2009), afectando su principal componente, la nicotina,

a los niveles de citocinas y proteasas, así como a diferentes componentes de la MEC del cartílago (Lourido *et al.*, 2015). Existe además cierta asociación con **otras patologías** como son la diabetes mellitus, la acromegalia, el hipotiroidismo, el hiperparatiroidismo, la hemocromatosis, la ocronosis o la enfermedad por depósito de cristales (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; EULAR, 2009; Monfort, 2010).

## 2.4. Clasificación

Actualmente la OA ha pasado a ser considerada como un grupo heterogéneo de procesos con aspectos comunes y diferenciales de pronóstico variable, más que como una sola enfermedad en sí misma (Batlle-Gualda *et al.*, 2002).

Tabla 1. CLASIFICACIÓN DE LA ARTROSIS	
CLASIFICACIÓN ETIOLÓGICA	CLASIFICACIÓN TOPOGRÁFICA
<b>Primaria (Idiopática)</b>	Principales articulaciones afectadas en artrosis primaria
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Localizada: una sola articulación</li> <li>• Generalizada:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Oligoarticular: de dos a cuatro articulaciones</li> <li>○ Poliarticular: más de cuatro articulaciones</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Columna</li> <li>• Mano</li> <li>• Cadera</li> <li>• Rodilla</li> <li>• Pie</li> </ul>
<b>Secundaria</b>	Principales articulaciones afectadas en artrosis secundaria
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedades metabólicas</li> <li>• Enfermedades endocrinas</li> <li>• Artropatías microcristalinas</li> <li>• Enfermedades articulares inflamatorias e infecciosas</li> <li>• Neuroartropatías</li> <li>• Hiperostosis anquilosante</li> <li>• Hiperlaxitud articular</li> <li>• Enfermedades óseas</li> <li>• Traumatismos y fracturas articulares</li> <li>• Disfunción articular interna</li> <li>• Sobreuso articular</li> <li>• Osteocondrosis</li> <li>• Condrolisis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hombro</li> <li>• Codo y muñeca</li> <li>• Rodilla</li> <li>• Tobillo y pie</li> </ul>

La OA puede clasificarse según la articulación afectada, clasificación **topográfica**, o según su **etiología**, distinguiéndose entre OA primaria y secundaria. Se define como OA **primaria o idiopática** aquella que posee las características clínicas, radiológicas y patológicas propias de la enfermedad, sin ser consecuencia de otra patología subyacente. Por otra parte, la OA **secundaria** es aquella que se origina a partir de otra enfermedad, traumatismo, disfunción o sobreuso articular (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Cañete *et al.*, 2008; Monfort, 2010) (Tabla 1).

#### **2.4.1. La gonartrosis**

En la presente tesis nos centramos específicamente en la OA de rodilla o gonartrosis. La rodilla es una articulación sinovial compleja. La artropatía de rodilla es la forma de OA más frecuente, pudiendo originarse tanto en OA primarias como secundarias y afectando a una parte de la articulación o a su totalidad, siendo bilateral en el 75% de los casos. Es la causa más frecuente de gonalgia y reducción de la movilidad a partir de los 50 años, aumentando su prevalencia con la edad y siendo más frecuente en mujeres. En pacientes más jóvenes la frecuencia aumenta en los hombres, originándose generalmente como una OA secundaria (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Felson, 2006). En Europa su prevalencia entre los 70 y 79 años es del 30-43% en mujeres y del 15-25% en hombres. Se estima que en España el 29% de la población de más de 60 años presenta OA sintomática de rodilla (Monfort, 2010). La obesidad, el trabajo, un traumatismo o una cirugía previa de rodilla son los factores de riesgo más comunes (Felson, 2006). La sintomatología se inicia con dolor y rigidez articular, seguida de crepitación, alteración en la flexión y limitación de la movilidad, pudiendo originarse engrosamiento y deformidad articular. Suele tener un curso lento con fases de exacerbación, pudiendo causar inflamación, derrame sinovial, periarteritis, formación de cristales de pirofosfato, osteonecrosis, rotura meniscal y otras fracturas (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Monfort, 2010).

## 2.5. Diagnóstico

### 2.5.1. Exploración clínica

Aunque, en general, la clínica de la OA puede ser muy variada, los síntomas de dolor, rigidez, tumefacción, limitación funcional y/o deformidad articular apuntan hacia una posible OA. En el caso de la gonartrosis, en primer lugar debe realizarse una **exploración clínica** de la articulación donde se valorará la alineación y movilidad articular, tumefacción, temperatura y presencia de focos dolorosos, así como la musculatura periarticular y la existencia de derrame articular. Posteriormente debe analizarse el líquido sinovial mediante una **artrocentesis**, examinando su aspecto y realizando un recuento linfocitario (Felson, 2006; Monfort, 2010).

### 2.5.2. Técnicas de imagen

En la OA no existen parámetros analíticos propios que permitan diagnosticar la enfermedad, es por ello que las técnicas de imagen son las técnicas por excelencia para su diagnóstico y seguimiento (Monfort, 2010). Entre estas técnicas se incluyen:

- La **radiología simple** o convencional: es la técnica de referencia que se ha venido usando para la confirmación del diagnóstico de la OA, permitiendo la detección de lesiones óseas (osteofitos, esclerosis y quistes subcondrales), pinzamiento del espacio articular y degradación del cartílago de manera indirecta, mediante la evaluación del espacio articular. Es el método de imagen más sencillo y barato, sin embargo no es una técnica muy precisa para la detección de los cambios progresivos en la articulación, así como tampoco permite valorar de manera directa el cartílago ni visualizar otras lesiones características de la OA (lesiones en menisco y médula ósea, sinovitis...).
- La **imagen por resonancia magnética** (IRM): es la mejor alternativa para el estudio no invasivo del cartílago. Es más sensible que la radiología para la detección de la degradación del cartílago y hueso, permitiendo localizar alteraciones en el resto de tejidos articulares (ligamentos, meniscos, sinovial y

tendones), así como para valorar la presencia de sinovitis (Blanco *et al.*, 2007; Monfort, 2010). Una herramienta prometedora es el uso de MRI cuantitativa, que no sólo permite detectar, sino también valorar los cambios ocurridos en los tejidos articulares en el grosor y volumen (Lotz *et al.*, 2013).

- La **tomografía computarizada**: ofrece información de estructuras tridimensionales y tejidos blandos, con gran precisión y sin necesidad de contraste. No suele utilizarse en el diagnóstico de OA de rodilla, pero sí como ayuda en el preoperatorio y control postoperatorio de las prótesis, además de detectar alteraciones como derrames, lesiones en meniscos y ligamentos, o cuerpos libres intrarticulares.
- La **ecografía**: es una técnica económica que permite observar alteraciones en las diferentes estructuras articulares (degradación de cartílago y hueso, presencia de derrame, hipertrofia sinovial) sin necesidad de radiación ni agentes de contraste. La gran ventaja de esta técnica frente a la resonancia magnética es su gran capacidad de detección de la sinovitis. Las desventajas que presenta incluyen tanto la dependencia del especialista, como las limitaciones en el análisis de estructuras intraarticulares profundas, hueso subcondral, lesiones de edema y médula ósea.
- La **gammagrafía ósea**: se utiliza principalmente en el diagnóstico de OA de mano y rodilla, para el análisis de las alteraciones óseas. Aunque es una técnica muy sensible pero poco específica, sirve para el diagnóstico diferencial de la OA con respecto a otras alteraciones.
- Las técnicas de tomografía por emisión de positrones (**PET**) y tomografía computarizada de emisión de fotones simples (**SPECT**): son útiles en la detección de inflamación y de regiones artrósicas y OA precoz, respectivamente, aunque no suelen utilizarse para el diagnóstico de la OA de manera rutinaria.
- La **artroscopia**: es una técnica invasiva utilizada en el análisis de las estructuras articulares *in vivo*, especialmente importante en la OA de rodilla. Está indicada

cuando el resto de pruebas diagnósticas no son concluyentes o ante la falta de respuesta al tratamiento. Permite realizar una valoración precisa del cartílago y la membrana sinovial (Monfort, 2010).

### 2.5.3. Biomarcadores

Tabla 2. BIOMARCADORES CANDIDATOS EN ARTROSIS
<b>Biomarcadores relacionados con el metabolismo del colágeno</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• C- y N-telopéptidos de colágenos tipo I y II: CTX-II, <math>\alpha</math>-CTX-II, CTX-I, <math>\alpha</math>-CTX-I, NTX-I</li> <li>• Propéptidos de colágenos tipo I y II: PIINP, PIIANP, PIIBNP, PIICP, CPII, PINP</li> <li>• Neopéptidos de colágenos tipo I y II: C2C, C2M, C1C2</li> <li>• Piridinolina</li> </ul>
<b>Biomarcadores relacionados con el metabolismo del agregano</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fragmentos del core proteico: neopéptidos de agregano, fragmentos ARGSV y NITEGE</li> <li>• Epítopos de glicosaminoglicanos: condroitín sulfato, queratán sulfato</li> </ul>
<b>Biomarcadores relacionados con otras proteínas no colágenas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• COMP (proteína oligomérica de la matriz del cartílago)</li> <li>• Fibulina</li> <li>• Folistatina</li> <li>• Ácido hialurónico</li> <li>• MMPs (metaloproteinasas de matriz): MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13</li> <li>• TIMPs (inhibidores tisulares de metaloproteinasas)</li> <li>• YKL-39 (glicoproteína 39 del cartílago)</li> <li>• sRAGE (receptor soluble para compuestos de glicosilación avanzada)</li> </ul>
<b>Biomarcadores relacionados con otros procesos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biomarcadores de inflamación: IL-1<math>\beta</math>, IL-6, MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos 1 o CCL2), COX-2 (ciclooxigenasa 2), PCR (proteína C-reactiva)</li> <li>• Factores indicativos de fibrosis</li> <li>• Proteínas del complemento</li> <li>• Adipocinas: adiponectina, leptina, visfatina</li> <li>• Receptor soluble de leptina (sOB-Rb)</li> <li>• Interacciones celulares en hueso: periostina</li> <li>• Inhibidores de Wnt: Dkk</li> <li>• Ácido úrico</li> </ul>

Los cambios clínicos y radiológicos que se evalúan para el diagnóstico de la OA, suelen ocurrir en estadios más avanzados de la enfermedad. Por tanto, es importante la búsqueda y estudio de biomarcadores que permitan pronosticar y diagnosticar la

enfermedad de manera temprana (Monfort, 2010), además de ser potenciales marcadores de seguimiento tras la aplicación de un tratamiento o intervención quirúrgica (Cuellar *et al.*, 2015). Los biomarcadores pueden clasificarse según su función como: pronóstico, diagnóstico, de severidad de la enfermedad o de eficacia del tratamiento (Lotz *et al.*, 2013). Análisis rutinarios de velocidad de sedimentación o detección de la PCR, pueden ser indicativos del proceso inflamatorio, sin embargo no son parámetros exclusivos de la OA (Monfort, 2010). Los biomarcadores en OA son generalmente moléculas o fragmentos moleculares liberados desde el cartílago, hueso o membrana sinovial, propios de uno de los tejidos o común a los tres, cuyos niveles suelen detectarse en líquido sinovial, suero u orina. Puede tratarse tanto de moléculas efectoras, como ser el resultado del daño o ambas, como en el caso de los fragmentos liberados de la MEC (Blanco *et al.*, 2007; Hsueh *et al.*, 2014; Lotz *et al.*, 2013) (Tabla 2, adaptada de Lotz *et al.*, 2013).

Entre los biomarcadores candidatos, cabe destacar el **colágeno tipo II** como indicador de destrucción del cartílago. Dicha destrucción es irreversible y está mediada por colagenasas como ciertas metaloproteinasas de matriz (**MMPs**) y cisteín proteasas. Se pueden detectar tanto fragmentos derivados de la degradación, más elevados en pacientes con OA y AR, como de síntesis, disminuidos en dichos pacientes. Junto con el colágeno II, el **agrecano** es una de las proteínas más abundantes en la MEC del cartílago, siendo también un importante posible biomarcador. Fragmentos derivados de su degradación por determinadas agrecanasas, MMPs y catepsinas, son potenciales biomarcadores para el diagnóstico de la OA (Monfort, 2010). La detección de glicosaminoglicanos (**GAGs**), procedentes de la degradación de la molécula de agrecano pueden servir también como potenciales biomarcadores de la enfermedad. Otra importante componente no colágeno del cartílago es **COMP**, que interviene en el mantenimiento de la integridad de la MEC. Fragmentos derivados de su degradación por parte de proteinasas como ciertas desintegrinas y metaloproteinasas con motivos trombospondina (ADAMTS), como las ADAMTS-7 y -12, son útiles en el diagnóstico y seguimiento de la OA y AR (Krabben *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006b; Monfort, 2010). Además niveles elevados de COMP se relacionan con la sinovitis, ya que en su síntesis están implicadas las células sinoviales activadas (Clark *et al.*, 1999;

Lohmander *et al.*, 1994; Monfort, 2010; Petersson *et al.*, 1998). Existen también otras proteínas no colágenas que contribuyen en rutas de degradación de la articulación, pudiendo ser también potenciales biomarcadores. Otras moléculas que intervienen en la fisiopatología de la OA y que podrían usarse como biomarcadores son ciertas citocinas, quimiocinas, proteasas, inhibidores enzimáticos, factores de crecimiento u otros mediadores inflamatorios importantes en los procesos de degradación e inflamación de la enfermedad (Lotz *et al.*, 2013; Monfort, 2010).

A pesar de su potencial uso como posibles dianas terapéuticas y su importante papel como marcadores en la OA, ninguno de los biomarcadores candidatos tiene un verdadero uso clínico debido, entre otras cosas, a que no son exclusivos de esta patología. Es por ello que en la actualidad la combinación de la exploración clínica, junto con las técnicas de imagen, es la elección por excelencia en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad.

## 2.6. Tratamiento

El primer fármaco usado para la OA fue el ácido acetil salicílico o aspirina, en el siglo XIX. A mediados del siglo XX se usaron también medicamentos yodoazufrados principalmente por vía parenteral e infiltraciones periarticulares de novocaína o aceites yodados, además de la corrección de hábitos perjudiciales y terapias físicas como la aplicación de calor local. Posteriormente, a partir de los años 50, los medicamentos más usados han sido los analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos, así como tratamientos fisioterapéuticos hasta llegar a la cirugía ortopédica (Batlle-Gualda *et al.*, 2002).

El tratamiento de la OA pretende principalmente aliviar el dolor, disminuir la inflamación y frenar el daño articular, así como mejorar la capacidad funcional y la calidad de vida del paciente. Este tratamiento no sólo ha de ser farmacológico, sino que existen distintas terapias biológicas, actualmente en estudio, así como ciertos hábitos de vida susceptibles de ser modificados para mejorar la sintomatología del paciente (Cañete *et al.*, 2008; Mobasheri, 2013; Monfort, 2010) (Tabla 3).

Tabla 3. POTENCIALES TRATAMIENTOS EN ARTROSIS							
FARMACOLÓGICOS Y BIOLÓGICOS		NO FARMACOLÓGICOS					
<b>Analgésicos</b>	Acetaminofén (Paracetamol)	<b>Terapias naturales</b>	Magnetoterapia Electroterapia Termoterapia Hidroterapia Fitoterapia Acupuntura Quiropráctica				
	Opioides <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tramadol</li> <li>• Morfina</li> <li>• Fentanilo</li> </ul>						
	Capsaicina						
	Otros fármacos en estudio <ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibidores de NGF</li> <li>• Antagonistas de iGluRs</li> <li>• Agonistas de TRP</li> </ul>						
<b>AINEs</b>	Salicilatos <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aspirina</li> <li>• Salsalato</li> </ul>			<b>Cambio de hábitos</b>	Alimentación Ejercicio Hábito tabáquico Ocupación laboral		
	AINEs tradicionales <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ibuprofeno</li> <li>• Naproxeno</li> </ul>						
	Inhibidores selectivos COX-2 (Coxibs) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Celecoxib</li> <li>• Etoricoxib</li> </ul>						
<b>SYSADOA</b>	Condroitín sulfato Sulfato de glucosamina Ácido hialurónico Diacereína					<b>Otros</b>	Artrocentesis Cirugía Biomateriales
	<b>DMOADs</b>						
<b>Otros</b>							

En la actualidad, la mayoría de terapias disponibles para la OA se centran en aliviar la sintomatología, pero pocas son capaces de frenar la progresión de la enfermedad, es por ello importante la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas

dirigidas hacia el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la OA (Martel-Pelletier *et al.*, 2012).

Respecto a las terapias farmacológicas, en primer lugar se utilizan **analgésicos** tradicionales como el **paracetamol**, indicados principalmente en los casos de dolor leve o moderado, que actúan sobre diferentes mecanismos de nocicepción, aunque un uso abusivo ha demostrado ser potencialmente tóxico (Martel-Pelletier *et al.*, 2012). En casos de dolor severo o en individuos no respondedores a otros tratamientos, los fármacos **opioides** suelen ser más indicados, aunque poseen mayores efectos secundarios. Otro fármaco analgésico es la **capsaicina**, sustancia natural y principal compuesto de los capsaicinoides (guindillas), que posee una gran eficacia para el tratamiento del dolor y la mejora de la funcionalidad en la gonartrosis, normalmente usada en combinación con otro analgésico debido a su efecto de corta duración (Felson, 2006; Monfort, 2010). Existen también otros fármacos en estudio potencialmente analgésicos relacionados con el bloqueo de mediadores implicados en nocicepción entre los que se incluyen inhibidores del factor de crecimiento nervioso (**FCN**), antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato (**iGluRs**) o agonistas del receptor de potencial transitorio V1 (**TRPV1**) (Martel-Pelletier *et al.*, 2012). Por otro lado, los **AINEs** se utilizan para el tratamiento del dolor y la inflamación. Se descubrieron en el siglo XIX y su uso ha ido incrementándose a partir de la segunda mitad del siglo XX. Son un grupo de fármacos con una serie de características comunes que actúan mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, a nivel de las ciclooxigenasas (COX), enzimas elevadas en procesos inflamatorios (Monfort, 2010). Pueden ser aplicados por vía tópica u oral. En el caso de OA de rodilla, se suelen administrar cuando existe evidencia de inflamación (derrame articular y/o sinovitis) (Mazieres *et al.*, 2001) y, debido a sus efectos adversos, no son recomendables en pacientes con riesgo gastrointestinal y cardiovascular (Monfort, 2010). Los fármacos de acción sintomática lenta para la OA (**SYSADOA**) se caracterizan por su efecto *carry over*, es decir que aunque su efecto analgésico es más retardado, poseen una duración más prolongada tras su retirada (hasta 6 meses), además de mejorar la estructura articular y poseer muy baja toxicidad (Felson, 2006; Hochberg, 2010; Monfort, 2010). Entre ellos se incluyen GAGs con propiedades anabólicas, capaces de inducir la síntesis

de proteoglicanos y colágeno, y anti-catabólicas, ya que inhiben ciertas agreganasas y colagenasas (Monfort *et al.*, 2005). Existen otros fármacos en estudio prometedores para el tratamiento de la progresión de la enfermedad, denominados fármacos modificadores de la OA (**DMOADs**). Estos fármacos actúan principalmente mediante la inhibición de proteasas como MMPs y ADAMTS, citocinas proinflamatorias como la IL1 $\beta$ , óxido nítrico (NO) y vías del ácido araquidónico (Martel-Pelletier *et al.*, 2012; Mobasher, 2013; Monfort, 2010), aunque también se están estudiando otras dianas terapéuticas incluyendo los receptores tipo *Toll* (TLRs) (Gomez *et al.*, 2015). Por otro lado, otras terapias utilizan la **administración intrarticular** de fármacos, lo que permite que ejerzan una acción más dirigida a nivel local disminuyendo los efectos secundarios a nivel sistémico. Estos fármacos están indicados para el tratamiento del dolor y la inflamación (Felson, 2006; Monfort, 2010) y suelen usarse para el tratamiento de OA de rodilla o cadera, en los casos en que no exista respuesta o haya intolerancia a otras terapias convencionales (Monfort, 2010; Zhang *et al.*, 2008). En casos de OA con abundante exudado inflamatorio, la **artrocentesis** puede también aliviar la sintomatología del paciente, mediante la extracción de líquido sinovial (Bondeson *et al.*, 2010). En casos graves de OA en que los otros tipos de terapias no han sido eficaces, se puede recurrir al tratamiento **quirúrgico**, pudiendo ser necesaria la implantación de prótesis. Por último, tratamientos con **anticuerpos monoclonales** o **proteínas recombinantes**, la **terapia génica y celular**, así como el uso de **biomateriales** están siendo también estudiados como posible medida para permitir restaurar el balance entre procesos anabólicos y catabólicos en la articulación, mediante el bloqueo o inducción de determinadas citocinas y otros mecanismos (Fahy *et al.*, 2015; Kapoor *et al.*, 2011).

### 3. LA ARTICULACIÓN SINOVIAL EN LA ARTROSIS

---

#### 3.1. La articulación sinovial

Las articulaciones son estructuras especializadas adaptadas para resistir diversas fuerzas de cizallamiento y compresión, a la vez que permiten movimiento y proporcionan estabilidad. De manera general las articulaciones pueden dividirse en sinoviales o diartrodiales, de libre movimiento, anfiartrosis, de escaso movimiento, y sinartrosis, inmóviles. Gracias al esqueleto segmentado y las superficies cartilaginosas, las articulaciones sinoviales permiten movimiento y flexibilidad. Dichas articulaciones se componen de músculos, tendones, ligamentos, meniscos, cápsula articular, bolsas sinoviales o bursas, membrana y líquido sinoviales, cartílago hialino y hueso subcondral (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2007; Bottini y Firestein, 2013) (Figura 2).

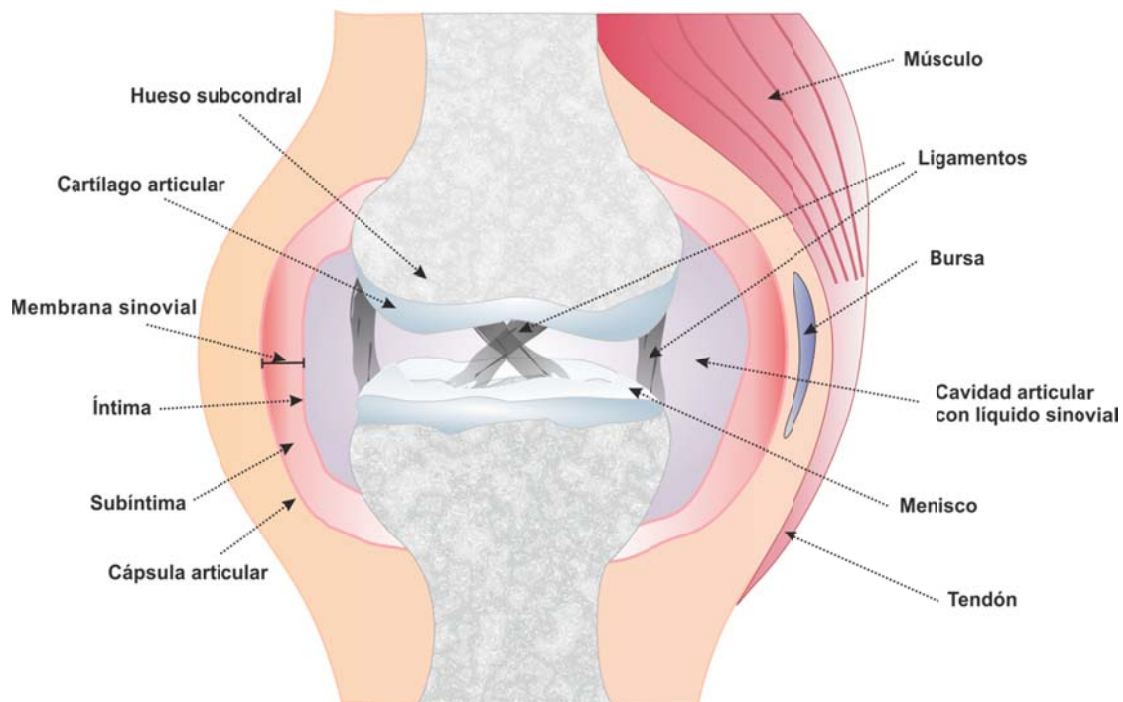


Figura 2. Representación esquemática de una articulación sinovial

### 3.1.1. Membrana sinovial

La articulación sinovial posee una cápsula que limita la cavidad articular, con una capa externa fibrosa y una interna sinovial. La membrana sinovial es una membrana vascularizada e inervada. Está formada por una lámina epitelial superficial delgada y avascular denominada íntima (*lining*) y una capa adyacente más gruesa y vascularizada denominada subíntima (*sublining*) (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2007). La lámina **íntima** es la capa superficial en contacto con la cavidad articular y la encargada de producir el líquido sinovial. Se trata de una capa fibrilar fina cuyas principales células residentes son los **sinoviocitos macrófágicos (SM) o de tipo A** y los **sinoviocitos fibroblásticos (SF o FLS) o de tipo B**. Estas células sinoviales recubren la cara interna de la articulación diartrodial. La capa íntima posee una serie de prolongaciones denominadas **vellosidades sinoviales** y su matriz extracelular está compuesta principalmente por fibras de colágeno tipo III, IV, V y VI, además de laminina, fibronectina, condroitín y gran cantidad de ácido hialurónico. Carece de membrana basal, uniones fuertes o desmosomas, teniendo una organización permeable que permite la difusión de nutrientes al líquido sinovial. Subyacente a la íntima existe una red de capilares, encargados de mediar la transferencia de agua y solutos al líquido sinovial. A continuación se encuentra la **subíntima**, que contiene **venas y arteriolas** de mayor tamaño además de **vasos linfáticos**. Está formada por tejido conjuntivo, fibras elásticas de colágeno tipo I y III, fibronectina, reticulina, y tejido adiposo. Esta capa posee un menor número de células, entre las que se incluyen principalmente SF, con escaso número de macrófagos, linfocitos T y B, células plasmáticas, células dendríticas (CDs), mastocitos y adipocitos. La mayor **inervación**, de la que forma parte el sistema nervioso simpático, aparece alrededor de la vasculatura y se extiende hasta la íntima (Bartok y Firestein, 2010; Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2007; Smith, 2011; Sutton *et al.*, 2009). Aunque juega un papel importante en diversas enfermedades inflamatorias articulares, en condiciones normales la membrana sinovial posee escasos vasos sanguíneos y un bajo número de células (Smith, 2011). La membrana sinovial permite el movimiento articular manteniendo una superficie no adherente, para lo que tiene gran importancia el ácido hialurónico. Regula además la presión y la temperatura, modula la composición y el

volumen del líquido sinovial y tiene una gran actividad de síntesis e intercambio de nutrientes. Posee además un papel importante en la respuesta inmunitaria de la articulación y es también la encargada de fabricar el **líquido sinovial** o sinovia que nutre y lubrica el cartílago, a lo que contribuyen los SF (Monfort, 2010; Sutton *et al.*, 2009). Dicho líquido sinovial es transparente y viscoso, formado por infiltrado del plasma y rico en mucina y **ácido hialurónico**, además de otros componentes como colágeno y fibronectina. Su composición celular incluye linfocitos, monocitos, células polimorfonucleares, y células sinoviales (Batlle-Gualda *et al.*, 2002).

### 3.1.2. Cartílago articular

El cartílago hialino o articular se encuentra presente en las articulaciones sinoviales. Se trata de un tejido conectivo avascular, aneural y alinfático formado por una **MEC**, la cual confiere las propiedades físicas al cartílago, y unas células residentes, los **condrocitos**, quienes se encargan de la síntesis y el mantenimiento de la misma. Dicha MEC está formada por una fracción líquida, compuesta por agua, y otra sólida constituida por una serie de macromoléculas sintetizadas por los condrocitos, de las que dependen las propiedades biomecánicas del cartílago (Figura 3). El **colágeno tipo II** es uno de los principales componentes de la MEC del cartílago, existiendo también otros tipos de colágeno en menor proporción (VI, IX, XI, XII y XIV). El colágeno tipo II es liberado por los condrocitos como procolágeno sobre el que actúan enzimas proteolíticas, dando lugar a las fibras de colágeno que confieren la fuerza de tensión al cartílago. Otros de los componentes mayoritarios en la MEC son los proteoglicanos, siendo el **agrecano** el principal proteoglicano presente en el cartílago articular. Está constituido por un **núcleo proteico** central unido covalentemente a unas cadenas laterales de **GAGs**, queratán sulfato (**KS**) y condroitín sulfato (**CS**). La proteína central está constituida a su vez por tres dominios globulares (G1, G2 y G3), un dominio intraglobular (IGD) entre G1 y G2, y unos dominios lineales. El agrecano es capaz de retener gran cantidad agua gracias a la carga negativa de los GAGs, proporcionando elasticidad y resistencia al cartílago. El **ácido hialurónico** es otro GAG encargado de ensamblar diversos proteoglicanos mediante **proteínas de unión** y el dominio de unión al ácido hialurónico en la región G1. De esta manera se forman agregados de

agrecanos que se intercalan entre las fibras de colágeno. Existe además de un bajo porcentaje de proteínas no colágenas ni proteoglicanos entre las que caben destacar **COMP**, glicoproteína pentamérica implicada en reparación tisular, crecimiento celular y mantenimiento de la MEC, y **fibronectina**, glicoproteína dimérica importante para el mantenimiento de la estructura gracias a la interacción con otros componentes de la MEC, además de otras proteínas no colágenas como fibromodulina, matrilinas, decorina, ancorina o biglican.

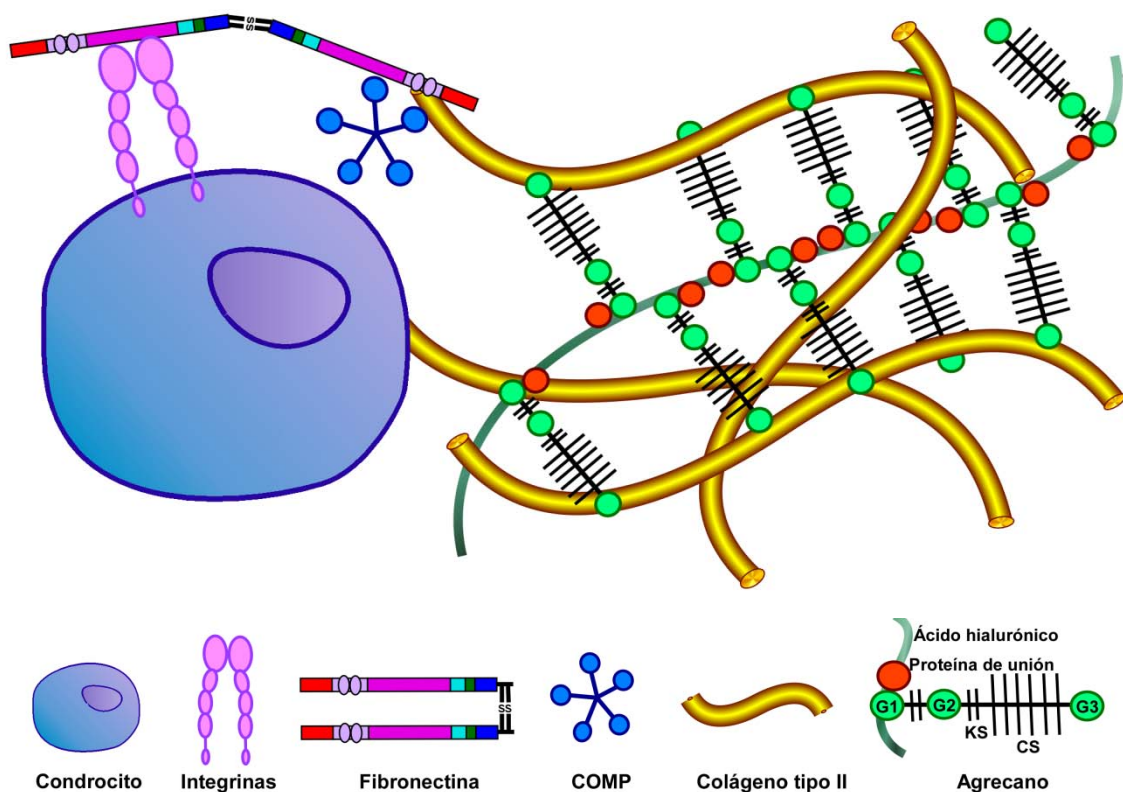


Figura 3. Representación esquemática de la MEC del cartílago.

Gracias a sus propiedades mecánicas, el cartílago permite el deslizamiento entre las superficies articulares, evitando el rozamiento y abrasión entre ellas y repartiendo la presión por toda su superficie, a la vez que, gracias a su elasticidad, sirve de elemento amortiguador. En el cartílago articular se pueden diferenciar cuatro zonas: la **zona superficial o tangencial**, la **zona transitoria u oblicua**, la **zona radial profunda** y la **zona de cartílago calcificado**, separado del resto por una barrera denominada frente de calcificación o **tide mark** (Batlle-Gualda *et al.*, 2002; Blanco *et al.*, 2007; Goldring y Marcu, 2009; Huang y Wu, 2008; Monfort, 2010) (Figura 6).

### 3.1.3. Hueso subcondral

Por último, el hueso subcondral limita con la base calcificada del cartílago articular. Está compuesto por células residentes que incluyen **osteoblastos**, **osteocitos** y **osteoclastos**, y macromoléculas colágenas, principalmente **colágeno tipo I**, y no colágenas, como **proteoglicanos** (Martel-Pelletier y Pelletier, 2010). Mientras que la zona colindante con el cartílago se compone de **hueso cortical**, las zonas más profundas están formadas por hueso **esponjoso o trabecular** (Loeser *et al.*, 2012), quien juega un papel fundamental en la modulación de las fuerzas de compresión que soporta el cartílago, absorbiendo los impactos. La **irrigación sanguínea** del hueso subcondral es importante para la nutrición del cartílago y las moléculas liberadas por sus células pueden regular la función de los condrocitos (Kwan Tat *et al.*, 2010; Monfort, 2010).

### 3.2. Alteraciones en la articulación artrósica

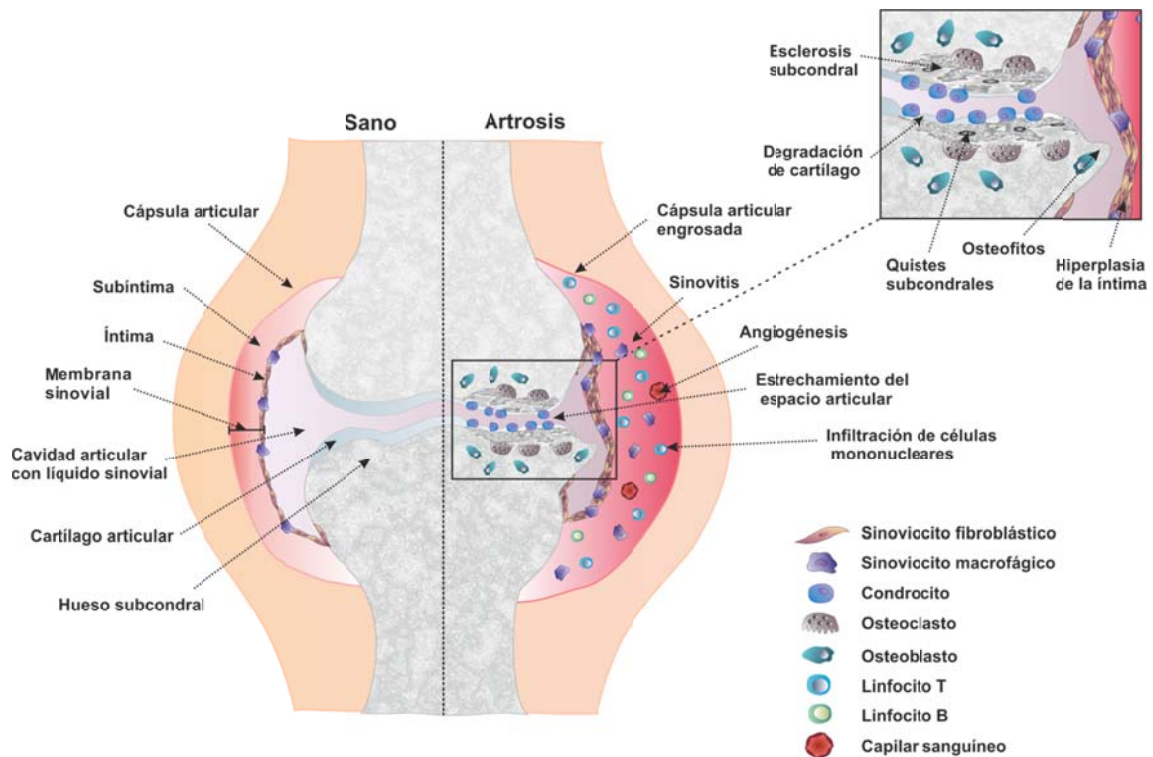


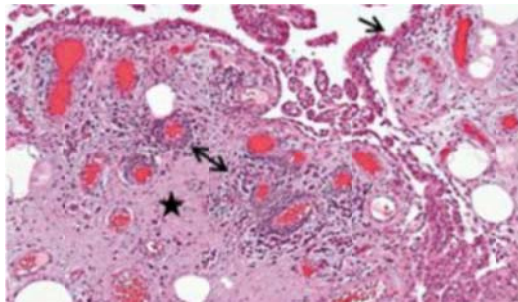
Figura 4. Representación esquemática de una articulación sinovial sana (izq.) y alteraciones en la articulación artrósica (dcha.).

La OA es una enfermedad que afecta a toda la articulación en su conjunto, incluyendo cartílago, hueso subcondral, membrana sinovial, meniscos, ligamentos y músculos periarticulares (Loeser *et al.*, 2012; Martel-Pelletier y Pelletier, 2010; Pelletier *et al.*, 2001). Como ya se ha explicado anteriormente, durante el curso de la enfermedad se produce una pérdida del cartílago articular, además de una remodelación ósea e inflamación sinovial. A continuación se detallan las alteraciones que tienen lugar en cada uno de los tejidos articulares (Figura 4).

### 3.2.1. Membrana sinovial

En la actualidad parece claramente establecido que durante la OA se origina un proceso inflamatorio, de mayor o menor grado, que influye en la patogénesis de la enfermedad, con los síntomas característicos de tumefacción, dolor, rigidez, enrojecimiento, y/o derrame (Monfort, 2010). Esta inflamación sinovial, denominada **sinovitis**, se observa en más del 50% de los pacientes artrósicos y se caracteriza por una hipertrofia e hiperplasia sinovial, con aumento de la **proliferación de SF y SM** e **hiperplasia** de la capa íntima, **angiogénesis** e **infiltrado inflamatorio** de células mononucleares en la subíntima, atraídas por quimiocinas liberadas por los SM y SF activados. Entre estas células se encuentran principalmente macrófagos y linfocitos T y, en menor medida, linfocitos B, células plasmáticas, CD8, células *natural killer* (NK), polimorfonucleares y mastocitos, además de la presencia de focos linfocitarios (Benito *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007; Haseeb y Haqqi, 2013; Monfort, 2010; Rollin *et al.*, 2008; Scanzello y Goldring, 2012; Sokolove y Lopus, 2013). Aunque esta sinovitis suele ser localizada y puede ser incluso asintomática (Attur *et al.*, 2010), la activación sinovial origina la liberación de citocinas, proteasas, factores de crecimiento y otros mediadores inflamatorios procedentes de las células residentes, principalmente SM y SF, que aceleran la progresión de la enfermedad y se observan aumentados en el líquido sinovial de pacientes artrósicos (Loeser *et al.*, 2012). Como consecuencia de esta inflamación sinovial se ha descrito también la presencia de un tejido similar al pannus (*pannus-like*) característico de la AR. Este *pannus-like* suele aparecer en estadios avanzados de la OA sobre la superficie del cartílago articular y contribuye a la destrucción del mismo (Shibakawa *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2004). Junto con la

angiogénesis, tiene lugar también un proceso de neo-inervación en los nervios periféricos, que contribuye a la sensación de dolor que se experimenta durante la sinovitis. Esta inervación favorece además el proceso inflamatorio mediante la liberación de neuropéptidos en la articulación (Bonnet y Walsh, 2005) (Figura 5).



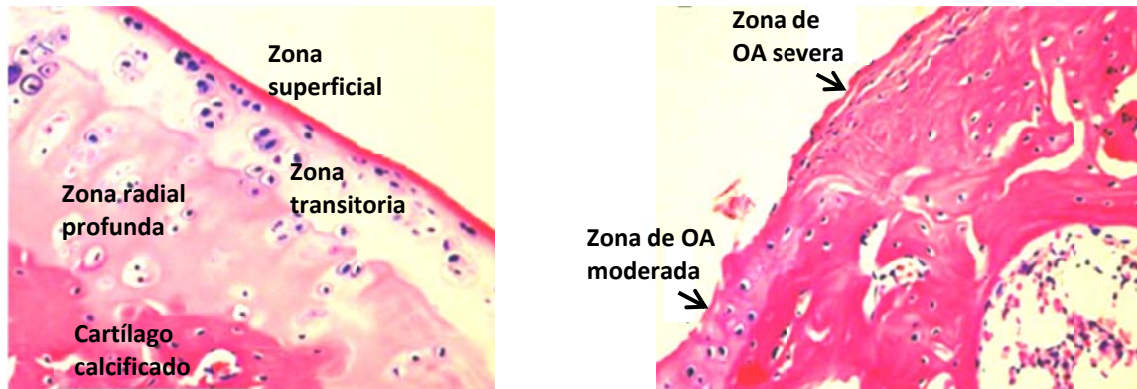
- ↘ Hiperplasia de la íntima sinovial
- ↘ Infiltrado inflamatorio perivascular de la subíntima sinovial
- ★ Fibrosis

**Figura 5. Imagen histológica de una membrana sinovial de OA.**  
Tinción Hematoxilina-Eosina. (Imagen obtenida de Scanzello y Goldring, 2012).

Durante la OA se observa además una variación en la composición del líquido sinovial, con la aparición de mediadores tanto anabólicos como catabólicos, además de mediadores inflamatorios, como prostaglandina E2 (PGE2); citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ); factores de crecimiento, como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); enzimas de destrucción, como ADAMTS y MMPs, e inhibidores, como los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPS), que además pueden servir como potenciales biomarcadores de la enfermedad (Cuellar *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2013; Nair *et al.*, 2012).

### 3.2.2. Cartílago articular

El desequilibrio biológico que se origina en situaciones patológicas, da lugar a un aumento de la fragilidad y pérdida de la integridad del cartílago. La alteración, **destrucción** y pérdida del cartílago articular es un rasgo común a todos los tipos de artritis, siendo una característica principal en la OA (Figura 6). Estas alteraciones se inician en áreas donde la fuerza mecánica es mayor (Blanco *et al.*, 2007; Loeser *et al.*, 2012).



**Figura 6.** Imagen histológica de cartilago sano (izq.) y artrósico (drch.) Se observa disminución del grosor en la zona superficial y transitoria, pérdida de células en la zona transitoria y profunda, y alteraciones en la *tide mark* y la zona de cartilago calcificado. Tinción Hematoxilina-Eosina. (Imagen obtenida de Musumeci *et al.*, 2014.)

Mientras que en condiciones normales en el cartílago adulto, los condrocitos suelen encontrarse en un estado quiescente con una baja remodelación de la MEC, en la OA éstos se activan y proliferan, agrupándose y aumentando la producción de enzimas de degradación. A este proceso se suma una reducción en la producción de proteoglicanos y otras proteínas de la MEC del cartílago. Estos cambios se originan como respuesta al daño e incluyen un **crecimiento hipertrófico** de los condrocitos, un **aumento del remodelado** de la MEC y **calcificación** del cartílago, originándose además un proceso de **vascularización** en el cartílago calcificado procedente del hueso subcondral. Por el contrario, en fases de OA avanzadas el número de condrocitos disminuye produciéndose una pérdida de cartílago articular (Loeser *et al.*, 2012; Monfort, 2010; Musumeci *et al.*, 2014).

### 3.2.3. Hueso subcondral

Las alteraciones en el hueso subcondral suelen detectarse incluso antes que las producidas en el cartílago articular, debido a la mayor capacidad del hueso para modificar su estructura en comparación con la de los condrocitos (Goldring y Goldring, 2007). Además, los cambios observados en el hueso subcondral parecen estar relacionados con la degradación del cartílago articular (Bobinac *et al.*, 2003; Martel-Pelletier y Pelletier, 2010). Por todo ello, el hueso subcondral parece jugar también un papel importante en el inicio y progresión de la OA mediante la liberación de mediadores catabólicos que promueven un metabolismo alterado en los condrocitos

(Funck-Brentano y Cohen-Solal, 2011; Martel-Pelletier y Pelletier, 2010). La remodelación ósea que tiene lugar durante la OA surge como resultado de daños localizados a consecuencia de una distribución anormal de cargas o de cargas repetitivas. Este hecho origina una **erosión** del hueso subcondral, pudiendo aparecer también lesiones en la médula ósea (Loeser *et al.*, 2012), como resultado de un proceso inflamatorio, edema, contusión y/o necrosis (Martel-Pelletier y Pelletier, 2010). Como adaptación a estos cambios se originan procesos de **esclerosis** y **osificación endocondral**, con la formación de nuevo hueso en la entesis y los márgenes articulares, dando lugar a la aparición de **quistes** y **osteofitos**. En este proceso están implicados diversos factores de crecimiento (Bobinac *et al.*, 2003; van der Kraan y van den Berg, 2007; Zoricic *et al.*, 2003). A la formación de osteofitos contribuyen principalmente células mesenquimales presentes en el periostio, en la unión entre cartílago y hueso, aunque células derivadas de la íntima sinovial parecen estar también implicadas. Parece aceptado que la formación de osteofitos surge como un mecanismo de adaptación para estabilizar la articulación afectada más que influir en la progresión de la enfermedad, a pesar de ser causa de dolor y disfunción articular. Como resultado de todo ello se produce un estrechamiento del espacio articular (van der Kraan y van den Berg, 2007). Además de neoformaciones óseas, durante la remodelación surgen también procesos de **resorción ósea** en etapas tempranas de la enfermedad (Martel-Pelletier y Pelletier, 2010). Por último, la activación sinovial que tiene lugar durante la OA, promueve la producción de factores angiogénicos por parte de las células activadas, originando una **neovascularización** del hueso subcondral (Bonnet y Walsh, 2005).

### 3.3. Células implicadas en el desarrollo de la artrosis

#### 3.3.1. El sinoviocito fibroblástico

El sinoviocito fibroblástico es la principal célula residente en el *lining*. Se trata de células mesenquimales encargadas de controlar la homeostasis e integridad de la articulación diartrodial, mediante la regulación de la composición del líquido sinovial y

la MEC de la íntima (Bottini y Firestein, 2013). Poseen un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi muy desarrollados, además de numerosas vesículas de secreción, ya que tienen una gran capacidad de síntesis y secreción proteica. A pesar de poseer características de fibroblastos, como la expresión de **colágenos tipo IV y V, vimentina y CD90**, poseen ciertas propiedades únicas que los distinguen del resto, entre las que se encuentran moléculas de adhesión como la **caderina-11, VCAM-1** (molécula de adhesión vascular 1 o CD106), **ICAM-1** (molécula de adhesión intracelular-1 o CD54), **CD44** y las subunidades  **$\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\beta 1$  de las integrinas**; la enzima uridina difosfoglucosa deshidrogenasa (**UDPGD**), para la síntesis de ácido hialurónico; lubricina, para lubricación de la articulación, y **CD55** (*Decay accelerating factor*, DAF) (Bartok y Firestein, 2010; Revell *et al.*, 1995; Smith, 2011; Yasuda, 2006). La interacción de las células con la MEC es esencial para la regulación de los procesos de proliferación, diferenciación, migración y supervivencia celular (Smith y Marshall, 2010).

Durante el desarrollo de la OA se origina un proceso inflamatorio con hiperplasia sinovial, principalmente en el *lining*, con un aumento de la proliferación celular, donde el SF juega un papel esencial. Se ha descrito que los SF de OA presentan un patrón de expresión génica propio, diferente a la AR y los pacientes sanos (Del Rey *et al.*, 2011). Estos SF adquieren un **fenotipo activado**, siendo capaces de producir diferentes mediadores entre los que se encuentran: **citocinas proinflamatorias**, como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6; **citocinas antiinflamatorias**, como IL-10; **factores angiogénicos**, como FGF, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o **TGF $\beta$** ; **quimiocinas**, como la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1 o CCL2), IL-8 o la proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 $\alpha$  o CCL3); **eicosanoides** como la PGE2 o el leucotrieno B4 (LTB4), y **mediadores osteoclástogénicos** como el ligando del receptor activador del factor nuclear-kB (RANKL); además de aumentar la expresión de **moléculas de adhesión** como VCAM-1. Entre estos mediadores, **IL-1 $\beta$**  y **TNF $\alpha$**  parecen jugar un papel fundamental, siendo capaces de inducir la liberación, por parte de los condrocitos, de otros mediadores inflamatorios y enzimas de destrucción, incluyendo **ADAMTS, MMPS**

y **TIMPs** (Bondeson *et al.*, 2010; Goldring *et al.*, 2008; Kato *et al.*, 2014; Pretzel *et al.*, 2009; Ritchlin, 2000), así como inhibir la biosíntesis del cartílago (Patwari *et al.*, 2009). Esto es posible gracias a que dentro de la articulación existe una comunicación entre los SF y los condrocitos, ya sea por contacto directo o mediante la liberación de mediadores por parte de ambas células, como demuestran diversos estudios en cocultivos (D'Andrea *et al.*, 1998; Del Rey *et al.*, 2014; Pretzel *et al.*, 2009). Estos mediadores son capaces de activar a su vez a los propios SF (Alaaeddine *et al.*, 1997; Bondeson *et al.*, 2010; Sadouk *et al.*, 1995), induciendo la liberación de mediadores proinflamatorios y enzimas de degradación también por parte de estas células, contribuyendo a la perpetuación del proceso inflamatorio y de destrucción articular.

Los SF actúan como mediadores celulares del sistema inmune innato. Entre los receptores implicados en la activación de los SF en OA, se encuentran los TLRs. Los **TLRs** son un tipo de receptores de reconocimiento de patrón (**PRRs**) capaces de responder tanto a patrones moleculares asociados a patógenos (**PAMPs**) como a señales de peligro (patrones moleculares asociados a daño, **DAMPs**), derivados de un estrés celular o daño tisular, entre los que se encuentran productos de degradación de la MEC del cartílago (Huang *et al.*, 2009; Midwood *et al.*, 2009; Sokolove y Lepus, 2013; Taylor *et al.*, 2004; van Zoelen *et al.*, 2009). Estudios en pacientes con OA han demostrado que ligandos solubles de TLRs presentes en el líquido sinovial, son capaces de activar estos receptores en los SF (Nair *et al.*, 2012). Los SF poseen además otros receptores para componentes de la MEC, como fibronectina, colágeno y ácido hialurónico, entre los que se incluyen las **integrinas**, el **CD44** y el receptor de dominio de discoidina-2 (**DDR-2**) (Goldring y Goldring, 2007; Yasuda, 2006; Zhao *et al.*, 2014b). La activación de estos receptores presentes en las células activadas, induce una serie de vías de señalización que originan la expresión de mediadores inflamatorios y de destrucción.

### 3.3.2. Otras células sinoviales y del infiltrado inflamatorio

Los **sinoviocitos macrofágicos** son células de origen hematopoyético mieloide, derivados de la médula ósea, procedentes de monocitos circulantes. Los SM de la

Íntima poseen una **actividad fagocítica elevada**, lo que se refleja en el gran número de lisosomas y vacuolas que poseen. Son células totalmente diferenciadas, que expresan un fenotipo similar al del resto de macrófagos, con expresión de moléculas CD11b, CD68, CD14, CD163, MHC II (antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad clase II) y el receptor para la región Fc de las inmunoglobulina G (FcR $\gamma$ ) (Bottini y Firestein, 2013; Kennedy *et al.*, 2011; Smith, 2011). Los SM desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la **inflamación**, pues son las primeras células en responder a las señales de peligro (Bartok y Firestein, 2010; Blanco *et al.*, 2007). Al igual que lo que ocurre con los SF, en la OA los macrófagos de la membrana sinovial presentan un **fenotipo activado**. Estos SM son también capaces de producir citocinas, quimiocinas, factores angiogénicos, factores de crecimiento y enzimas de destrucción (Bondeson *et al.*, 2006; Bondeson *et al.*, 2010; Farahat *et al.*, 1993; Haywood *et al.*, 2003). Los SM activos pueden activar a su vez a los SF, principalmente mediante la liberación de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , perpetuando así de nuevo la producción de mediadores inflamatorios y de enzimas de destrucción en la articulación. Al igual que los SF, los SM también poseen TLRs y otros receptores capaces de activar procesos del sistema inmune innato y de degradación articular (Bondeson *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha descrito la presencia de **células gigantes multinucleadas** con gran capacidad fagocítica en la membrana sinovial inflamada, originadas como consecuencia de la fusión de macrófagos del infiltrado inflamatorio que tiene lugar durante la sinovitis (Prieto-Potin *et al.*, 2015).

Durante el proceso inflamatorio de la OA, en el *sublining* se produce un infiltrado de células mononucleares atraídas por quimiocinas liberadas por los SM y SF activados (Blanco *et al.*, 2007). Entre ellas, los **linfocitos T** juegan también un papel importante en la patogénesis de la OA mediante la producción de citocinas proinflamatorias (Loeser *et al.*, 2012). Dentro de las subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup>, se ha señalado la importancia de las células T colaboradoras **Th1**, cuyos niveles se encuentran más elevados que los de las células Th2 en el tejido sinovial de pacientes de OA (Ishii *et al.*, 2002). Más recientemente, se ha descrito también la relevancia de los linfocitos **Th17** en procesos de inflamación crónica como principales productoras de la citocina **IL-17** (Miossec y Kolls, 2012). Aunque aún se desconoce el papel de las Th17 en OA, diferentes estudios han demostrado que la IL-17 es capaz de inducir la

liberación de citocinas, quimiocinas, factores angiogénicos y metaloproteinasas desde los SF y condrocitos, contribuyendo al proceso inflamatorio y de destrucción en la OA (Chen *et al.*, 2011; Honorati *et al.*, 2002; Kapoor *et al.*, 2011; Sandy *et al.*, 2015). Los **linfocitos B** también parecen estar implicados en los procesos de degradación del cartílago articular mediante la generación de **autoanticuerpos** contra componentes de la **MEC** del cartílago, como es el caso del colágeno tipo II, el agregano, la fibulina-4, la proteína de la capa intermedia del cartílago (CILP), la osteopontina, la triosafosfato isomerasa (TPI) o YKL-39, creando depósitos de **inmunocomplejos** y promoviendo efectos citotóxicos en la articulación (Haseeb y Haqqi, 2013; Takagi y Jasin, 1992).

### 3.3.3. Condrocitos

Los condrocitos son las únicas células residentes en el cartílago articular. Estas células actúan como mecano- y osmo-reguladoras modulando su metabolismo como respuesta a los cambios que se producen en el microambiente articular (Martel-Pelletier y Pelletier, 2010). Mientras que en condiciones normales la remodelación de la MEC es lenta, y los condrocitos permanecen en un estado postmitótico quiescente con muy baja capacidad proliferativa, en la OA los condrocitos adquieren un **metabolismo hiperactivo** con un aumento de la producción de mediadores anabólicos y catabólicos (Goldring y Marcu, 2009; Sandell, 2008), que culmina en un aumento de la expresión de enzimas proteolíticas, marcadores de hipertrofia y calcificación de la matriz (van der Kraan y van den Berg, 2012). Diferentes estudios han descrito que los condrocitos y osteoblastos procedentes de pacientes de OA poseen diferencias en su expresión génica respecto a los procedentes de pacientes sanos (Geyer *et al.*, 2009). Además el **estrés oxidativo** que tiene lugar durante ciertos procesos como el envejecimiento, promueve la acumulación de proteínas de MEC en el retículo endoplásmico y Golgi de los condrocitos, disminuyendo en consecuencia la síntesis de proteínas del cartílago además de promover la apoptosis (Yang *et al.*, 2005), existiendo también cambios a nivel epigenético (Portal-Nunez *et al.*, 2015).

En el cartílago artrósico los condrocitos expresan citocinas y quimiocinas así como sus receptores, además de diversas proteasas, factores de respuesta al estrés y

otros mediadores que modulan la respuesta inflamatoria y catabólica (Blanco *et al.*, 2007). Los condrocitos poseen también receptores para componentes de la MEC, como **integrinas**, **TLRs**, **DDR-2** y **CD44** (Goldring y Goldring, 2007; Goldring y Marcu, 2009; Sokolove y Lepus, 2013; Yasuda, 2006). Durante la OA aumentan los procesos de **degradación de la MEC**; los productos originados tras dicha degradación activan estos receptores estimulando la producción de **proteinasas**, **citocinas** inflamatorias y **quimiocinas**, creando un bucle de retroalimentación que amplifica la destrucción articular (Loeser *et al.*, 2012). En etapas tempranas de la OA los condrocitos sintetizan nuevos componentes de matriz para compensar dicha destrucción (Goldring y Goldring, 2007), sin embargo, en el transcurso de la enfermedad esta capacidad se pierde y no son capaces de compensar la degradación, rompiéndose el equilibrio entre destrucción y síntesis, lo que provoca la pérdida de MEC. Los **fragmentos de degradación** resultantes de todo este proceso difunden además al líquido sinovial (Martel-Pelletier y Pelletier, 2010), activando a su vez a las células sinoviales.

#### 3.3.4. Osteoclastos y osteoblastos

Durante la OA, alteraciones mecánicas o respuestas al estrés fisiológico pueden inducir una remodelación ósea, dando lugar al reclutamiento de **osteoclastos** y precursores desde la circulación, originándose un proceso de resorción ósea. Tras dicho proceso, los osteoclastos mueren por apoptosis y los **osteoblastos** sintetizan nueva matriz ósea (Martel-Pelletier y Pelletier, 2010), quienes en la OA parecen tener un fenotipo diferente al del osteoblasto normal, con una mayor producción de **fosfatasa alcalina**, **osteocalcina**, **MMP-2**, **colágeno tipo I** y **TGFβ** (Funck-Brentano y Cohen-Solal, 2011; Monfort, 2010). Entre los mediadores inflamatorios y de destrucción producidos por las células óseas, cabe también destacar las citocinas **IL-1β** e **IL-6**, la **PGE2** y el **LTB4**. Estos factores están implicados tanto en la degradación de la MEC del cartílago articular como del hueso subcondral.

Otras moléculas producidas principalmente por los osteoblastos, que afectan al desarrollo de la OA son la osteoprotegerina (**OPG**), el receptor activador del factor nuclear-kB (**RANK**) y **RANKL**. RANKL se une a su receptor RANK en la superficie de los

osteoclastos, promoviendo la diferenciación y activación de osteoclastos, así como procesos de osteoclastogénesis y resorción ósea. La OPG actúa como receptor soluble de RANKL, impidiendo su unión a RANK y por tanto la osteoclastogénesis. La ratio OPG/RANKL es indicativo de formación o resorción ósea y se encuentra alterado en pacientes de OA (Kwan Tat *et al.*, 2008b; Martel-Pelletier y Pelletier, 2010). Los osteoblastos de OA también poseen aumentada la producción de factores de crecimiento insulínico (IGFs), que regulan la formación ósea. El aumento de **IGF-1**, mediante la activación de vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (**MAPK**), promueve procesos de remodelación y esclerosis subcondral, a la vez que estimula la degradación de la MEC del cartílago. Por otro lado, el IGF-1 disminuye la expresión de receptores de la hormona paratiroidea (**PTH**), contribuyendo a la alteración del metabolismo óseo y del cartílago (Funck-Brentano y Cohen-Solal, 2011; Kwan Tat *et al.*, 2010). Otras moléculas como las **efrinas**, están también implicadas en la remodelación ósea, cuya señalización parece estar alterada en OA (Kwan Tat *et al.*, 2008a). Por último cabe también destacar el papel de **Wnt** en la regulación del metabolismo óseo cuyas vías de señalización, tanto canónica, en la que interviene la  $\beta$ -catenina, como no canónica, parecen estar implicadas en el desarrollo de la OA (Blom *et al.*, 2009; Blom *et al.*, 2010; Kwan Tat *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010).

## **4. FISIOPATOLOGÍA DE LA ARTROSIS**

### **4.1. Inflamación y sinovitis**

Tradicionalmente la OA se ha considerado como una artropatía no inflamatoria, siendo utilizada habitualmente como control en el estudio de otras artropatías inflamatorias como la AR. Sin embargo, en la actualidad esta idea no es asumida ya que el componente inflamatorio juega un papel fundamental también en esta enfermedad. Esta hipótesis surge a partir de los años 90 y ha ido adquiriendo más importancia con el tiempo (Goldring, 1999; Pelletier *et al.*, 1991; Pelletier *et al.*, 2001; Scanzello y Goldring, 2012). A diferencia del sufijo “-itis” que denota inflamación, el

sufijo “-osis” designa un proceso patológico de naturaleza degenerativa, sin embargo en el término anglosajón de “osteoartritis”, se reconoce también la naturaleza inflamatoria de la patología (Monfort, 2010).

La **inflamación** es uno de los mecanismos más importantes de inmunidad innata, siendo el nexo de unión con la inmunidad adaptativa. Se origina como respuesta a un daño tisular, traumatismo o infección y tiene como fin la eliminación del agente dañino. Cuando la respuesta inflamatoria se prolonga en el tiempo puede dar lugar a una inflamación crónica, debido a la presencia constante del estímulo inflamatorio. En las enfermedades reumáticas el proceso inflamatorio se cronifica, generando una serie de señales de daño o peligro que activan a las células residentes en la membrana sinovial, **SF** y **SM**, células del **sistema inmune innato** que liberan una serie de **citocinas** y **quimiocinas**, atrayendo a otras células del infiltrado inflamatorio y activando a su vez procesos de **inmunidad adquirida**, con la migración de **linfocitos T y B** hacia el foco inflamatorio (Blanco *et al.*, 2007; Haseeb y Haqqi, 2013).

Aunque en la OA los procesos de inmunidad adquirida no tienen tanto peso como en otras enfermedades reumáticas inflamatorias, la inmunidad innata juega un papel esencial. Entre los componentes de la **inmunidad innata** que intervienen en el proceso inflamatorio de la OA, cabe destacar los DAMPs y el sistema del complemento. Los **DAMPs** actúan como señales de daño uniéndose y activando a los **TLRs**, principalmente TLR2 y TLR4, de las células articulares, incluyendo SF, SM y condrocitos, iniciando así una serie de rutas de señalización cuyo resultado final es la activación de diferentes factores de transcripción que participan en la patogénesis de la OA (Gomez *et al.*, 2015; Sokolove y Lepus, 2013). Existen diferentes tipos de DAMPs, entre los que se encuentran componentes derivados de la **degradación de la MEC**, capaces de activar procesos inflamatorios y de degradación de cartílago, como fragmentos derivados de la fibronectina (**Fn-fs**) o el **ácido hialurónico** (Liu-Bryan y Terkeltaub, 2010; Okamura *et al.*, 2001). Ciertas **proteínas plasmáticas** filtradas desde la circulación durante el proceso inflamatorio pueden también actuar como DAMPs, como es el caso del fibrinógeno o las globulinas (Sohn *et al.*, 2012). También actúan como tales **crisales inorgánicos**, como los derivados del fosfato cálcico, que se

encuentran presentes frecuentemente en el líquido y tejido sinovial de pacientes artrósicos (Liu-Bryan *et al.*, 2005). Por último, las **alarminas** son proteínas intracelulares que se liberan en la articulación desde células activadas, necróticas, dañadas o en situaciones de estrés, activando procesos de inmunidad innata. En particular, alarminas de la familia S100 parecen estar relacionadas con la progresión de la OA (van Lent *et al.*, 2012). Como se ha mencionado anteriormente, otro de los mecanismos que actúa en los procesos de inmunidad innata es el **sistema del complemento**, formado por un conjunto de proteínas plasmáticas encargadas también de activar la respuesta inflamatoria. Componentes de la MEC del cartílago, como el agrecano y COMP, son también capaces de activar el sistema del complemento, perpetuando el proceso inflamatorio y de degradación articular. Se ha descrito que los niveles de diferentes proteínas del complemento se encuentran incrementados en el líquido sinovial de pacientes con OA respecto a los controles sanos (Gobezie *et al.*, 2007).

La membrana sinovial es el tejido articular en el que se observan mayores cambios derivados del proceso inflamatorio en la OA. Durante la **sinovitis** las células sinoviales del *lining*, que en condiciones normales se dedican a mantener la homeostasis en la articulación, proliferan y se activan por diferentes factores, ya sea tanto por estrés mecánico, como por mediadores inflamatorios, como citocinas o productos de degradación de la MEC del cartílago. Dicha activación exacerbada origina alteraciones en las rutas de señalización y la expresión aberrante de genes, algunos relacionados con mediadores inflamatorios (Abramson y Attur, 2009; Goldring y Otero, 2011). Este proceso inflamatorio puede producirse en mayor o menor grado según los pacientes y contribuye a la sintomatología del dolor, así como al daño, severidad y progresión de la enfermedad (Kato *et al.*, 2014). Aunque la sinovitis en la OA suele ser moderada, en ocasiones en que el proceso inflamatorio es más grave puede llegar a asemejarse a la de la AR (Pelletier *et al.*, 2001).

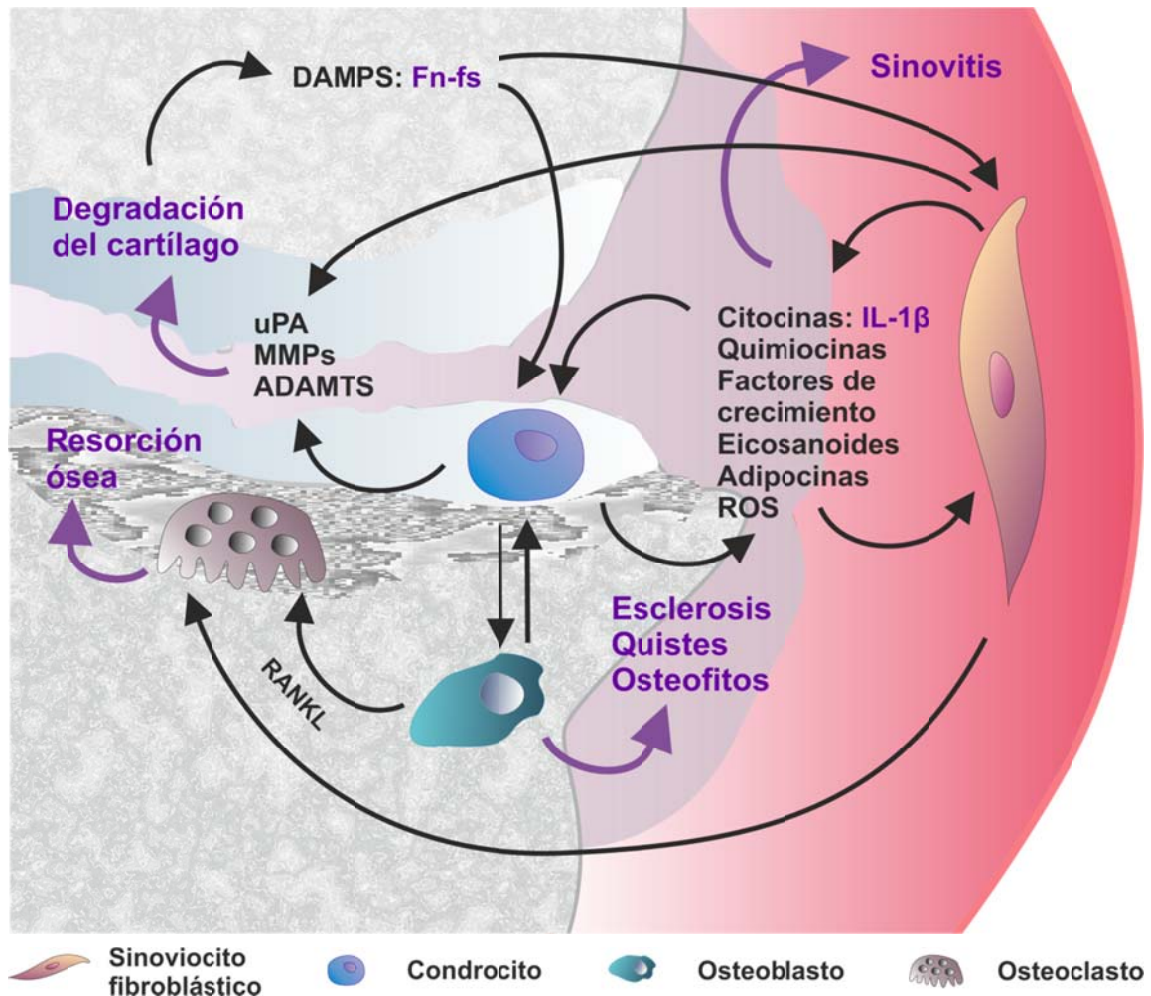


Figura 7. Representación esquemática de las interacciones entre el SF con los condrocitos, osteoblastos y osteoclastos, que tienen lugar en la OA. En morado aparecen destacados los procesos que tienen lugar en la articulación, así como el papel de la IL-1 $\beta$  y de los Fn-fs.

Aunque la inflamación en la OA parece ser el resultado de una activación sinovial a partir de productos de degradación del cartílago, ésta puede también detectarse ya en etapas tempranas de la enfermedad, incluso antes de existir evidencia radiológica, aumentando su prevalencia en estadios avanzados (Benito *et al.*, 2005; Loeser *et al.*, 2012; Monfort, 2010). Se ha descrito además que esta inflamación es capaz de promover la degradación del cartílago articular por sí misma, sin necesidad de un daño previo (Lee *et al.*, 2013), induciendo una expresión génica alterada en los **condrocitos** que promueve la liberación de **enzimas de degradación** del cartílago (Goldring y Goldring, 2007; Loeser, 2006; Pretzel *et al.*, 2009). Además se ha descrito una asociación entre la presencia de sinovitis y la pérdida de cartílago articular (Sellam y Berenbaum, 2010). La inflamación establece así un bucle de retroalimentación en la

degradación del cartílago, contribuyendo a la progresión y cronicidad de la enfermedad. El proceso inflamatorio que tiene lugar en la OA actuaría entonces como nexo de unión entre el inicio y la perpetuación de la enfermedad (Sokolove y Lepus, 2013) (Figura 7).

### 4.1.1. Mediadores inflamatorios en artrosis

Existen otros mediadores inflamatorios en la OA, cuyos niveles pueden encontrarse elevados en el suero, líquido sinovial y tejidos sinoviales de dichos pacientes. Entre ellos se encuentran **citocinas** proinflamatorias liberadas desde células activadas, que a su vez activan nuevas células en el proceso inflamatorio de la articulación. Por otra parte, las **quimiocinas** actúan como mediadores solubles, atrayendo a otras células hacia el lugar de inflamación, y los **factores de crecimiento** promueven procesos angiogénicos y de proliferación celular. Las **eicosanoides** son mediadores lipídicos liberados como consecuencia de la acción de enzimas fosfolipasas, principalmente la fosfolipasa A2 (PLA2), sobre fosfolípidos de membrana, liberando el ácido araquidónico sobre el que actúan ciclooxigenasas y lipooxigenasas, principalmente COX-2 y la lipooxigenasa 5 (LOX-5), dando lugar a la formación de prostaglandinas y leucotrienos, respectivamente. Estas enzimas participan en procesos de inflamación, apoptosis, angiogénesis y remodelación tisular, estimulando a su vez la liberación de nuevos mediadores inflamatorios (Eymard *et al.*, 2014; Goldring y Goldring, 2007; Martel-Pelletier y Pelletier, 2010; Pelletier *et al.*, 2001; Sokolove y Lepus, 2013; Sutton *et al.*, 2009). Aunque la PGE es capaz también de ejercer efectos antiinflamatorios inhibiendo la producción de citocinas proinflamatorias e induciendo citocinas antiinflamatorias como la IL-10 (Kambayashi *et al.*, 1995; Strassmann *et al.*, 1994). Otros mediadores lipídicos son las **adipocinas**, quienes parecen jugar un importante papel en procesos inflamatorios relacionados con la obesidad y ponen en relación este factor de riesgo con el desarrollo de OA. Por último, las especies reactivas de oxígeno (**ROS**) están también implicadas en los procesos catabólicos del cartílago, donde los niveles de la óxido nítrico sintasa inducible (**iNOS**) suelen encontrarse elevados (Goldring y Goldring, 2007; Portal-Nunez *et al.*, 2015; Sokolove y Lepus, 2013) (Tabla 4, adaptada de Sokolove y Lepus, 2013).

Tabla 4. PRINCIPALES MEDIADORES INFLAMATORIOS EN ARTROSIS

Citocinas	Quimiocinas	Factores de crecimiento	Eicosanoides	Adipocinas	ROS
Proinflamatorias	IL-8 MCP-1 RANTES	VEGF FGF IGF	PGE2 LTB4	Adiponectina Leptina Visfatina Resistina	NO O <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Antiinflamatorias					
IL-4, IL-10, IL-13, IL-1Ra	MIP-1	TGFβ			

IL, interleucina; IL-1Ra, antagonista del receptor de IL-1; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; IGF, factor de crecimiento insulínico; LTB4, leucotrieno B4; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos 1 o CCL2; MIP, proteína inflamatoria de macrófagos; NO, óxido nítrico; O<sub>2</sub><sup>-</sup>, anión superóxido; PGE2, prostaglandina E2; RANTES, regulador de la activación de células T normalmente expresadas y secretadas o CCL5; TGF, factor de crecimiento transformante; TNF, factor de necrosis tumoral; VEGF, factor de crecimiento del endotelio vascular.

#### 4.1.2. La IL-1β como citocina proinflamatoria

Descrita por primera vez en 1977 (Sandy *et al.*, 2015), IL-1β es considerada una de las principales citocinas proinflamatorias que contribuyen al proceso inflamatorio y de destrucción articular en la OA (Kato *et al.*, 2014; Pelletier *et al.*, 2001). Es sintetizada por las células de la articulación sinovial, incluyendo SF, SM, células mononucleares, condrocitos y osteoblastos (Kapoor *et al.*, 2011), en forma de precursor y, gracias a la acción proteolítica de la enzima convertidora de IL-1 (ICE) situada en la membrana plasmática, es liberada al medio en su forma activa. Su activación se produce mediante la unión a su receptor (**IL-1R**) de tipo I, iniciando así una cascada de señalización intracelular que culmina en la expresión de otros mediadores de inflamación y destrucción de la MEC, entre los que se incluyen otras **citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, eicosanoides, ROS** y diversas proteinasas, incluyendo **ADAMTS** y **MMPS**, además de promover la degradación e inhibir la síntesis de componentes principales de la MEC del cartílago, como el agregano o el colágeno (Haseeb y Haqqi, 2013; Kapoor *et al.*, 2011; Kato *et al.*, 2014; Pelletier *et al.*, 2001; Sandell *et al.*, 2008). Tanto la IL-1β como su receptor se encuentran elevados en membrana y líquido sinovial, cartílago articular y hueso subcondral de pacientes con OA (Kapoor *et al.*, 2011; Martel-Pelletier *et al.*, 1992; Sadouk *et al.*, 1995; Saha *et al.*, 1999). Entre las vías implicadas en la señalización de la IL-1β se incluyen los tres tipos de cascadas de **MAPK**, la proteína activadora 1 (**AP-1**) y el factor nuclear-kappa B (**NF-κB**) principalmente, además de la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP

cíclico (**CREB**), el factor de transcripción relacionado con Runt (**Runx**) **2** y la vía **Wnt/βcatenina** (Kapoor *et al.*, 2011; Lee y Heur, 2014; Rasheed *et al.*, 2010; Raymond *et al.*, 2012; Sandy *et al.*, 2015; Stylianou y Saklatvala, 1998; Wang *et al.*, 2012). Por otro lado, el promotor de IL-1β posee lugares de unión para **CREB**, **AP-1** y **NF-κB**, que promueven su propia expresión (Stylianou y Saklatvala, 1998).

Por otro lado, la IL-1 es también capaz de unirse al **IL-1RII**, funcionando como un **inhibidor** de la misma, ya que no es capaz de transducir las señales al interior celular. El **antagonista** del receptor de IL-1 (**IL-1Ra**) se une a ambos receptores, actuando como otro inhibidor natural de la citocina, producido también por los SF y condrocitos, entre otras células (Colotta *et al.*, 1994; Palmer *et al.*, 2002; Seitz *et al.*, 1994).

## 4.2. Degradación de cartílago y remodelación ósea

Tanto las alteraciones mecánicas como la liberación de mediadores inflamatorios del hueso subcondral y de la membrana sinovial, contribuyen a la destrucción del cartílago articular. Por tanto, la degradación del cartílago en OA puede ser considerada el resultado de un proceso inflamatorio (Attur *et al.*, 2002; Pelletier *et al.*, 2001). Los diferentes factores que influyen en la aparición de la OA provocan una alteración en la homeostasis del cartílago, rompiendo el balance entre degradación y síntesis de la MEC (Kato *et al.*, 2014) y originando una alteración en sus propiedades como consecuencia del cambio en su composición y organización estructural. Este hecho es debido a que los condrocitos responden tanto a los estímulos mecánicos como biológicos, incluyendo citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y diferenciación o mediadores de estrés, que se originan como resultado de un daño articular. En consecuencia los condrocitos, además de producir mediadores inflamatorios, liberan gran cantidad de proteasas entre las que destacan las **colagenasas**, como la MMP-13, y **agrecanasas**, como las ADAMTS-4 y -5, que actúan sobre dos de los principales componentes de la MEC. En primer lugar las agrecanasas degradan el agrecano, dejando la red de colágeno desprotegida y dando paso a la acción de las colagenasas, que degradan el colágeno tipo II, momento en el cual el

proceso se vuelve irreversible. A este hecho se suma la disminución en la capacidad de los condrocitos para generar nuevos componentes de la MEC, lo que conlleva la degradación del cartílago articular. En la OA esta pérdida de cartílago se origina en la zona más superficial y se extiende hacia zonas profundas a medida que la enfermedad avanza. Productos derivados de la degradación de la MEC, como el **colágeno**, la **fibronectina** o sus **fragmentos de degradación**, inducen la activación de los receptores de las células articulares iniciando una serie de vías de señalización que confluyen en la producción de nuevos mediadores de inflamación y destrucción (Goldring y Marcu, 2009; Loeser *et al.*, 2012). Por otro lado, las **ROS** juegan también un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis de los condrocitos. Como consecuencia de los procesos de inflamación, de la variación en los niveles de oxígeno y del estrés mecánico que tienen lugar durante la OA, se origina una producción aberrante de ROS, lo que conlleva un estrés oxidativo en la articulación, promoviendo procesos de apoptosis (Martin *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2005). Los productos finales de glicación avanzada (**AGEs**) que se originan con la edad, resultado del estrés oxidativo, influyen también en el metabolismo aberrante de los condrocitos (Marcu *et al.*, 2010) (Figura 7).

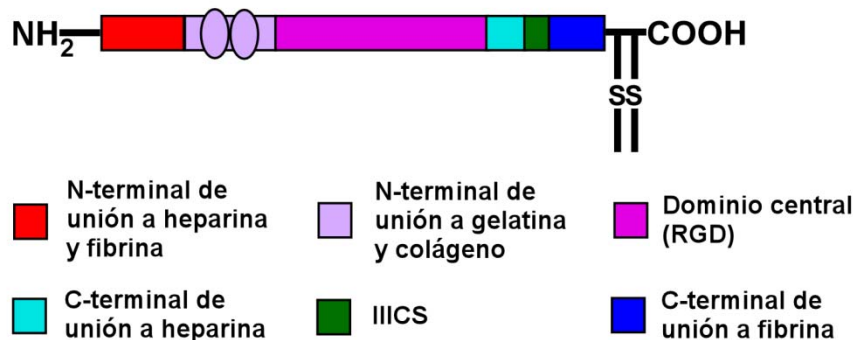
Durante la OA los daños producidos en el **hueso subcondral** promueven además procesos de remodelación ósea ya en etapas tempranas de la enfermedad, caracterizados por procesos de **resorción ósea** que dan lugar a la generación de un hueso con una baja resistencia mecánica. Por otro lado, en fases de OA avanzadas, la mineralización ósea disminuye, a lo que se suma una alteración en la síntesis del colágeno, originándose un aumento del volumen y grosor óseo como mecanismo adaptativo para intentar reparar el daño, lo que deriva en una **esclerosis subcondral** (Funck-Brentano y Cohen-Solal, 2011; Kwan Tat *et al.*, 2010) (Figura 7).

#### **4.2.1. La fibronectina como producto de degradación del cartílago**

La fibronectina es una glicoproteína adhesiva dimérica de 450 KDa, formada por dos cadenas unidas por puentes disulfuro. Se encuentra de forma soluble en el plasma y el citoplasma, pero también forma parte, como proteína insoluble, de la MEC

de diversos tejidos, entre los que se encuentran la membrana sinovial y el cartílago, además de estar presente en otros fluidos corporales como el líquido sinovial. La fibronectina es sintetizada por los hepatocitos en el hígado, desde donde pasa a la sangre y de ahí a la MEC del tejido conjuntivo, donde polimeriza. Está implicada en diversos procesos tanto fisiológicos como patológicos, entre los que se incluyen adhesión, migración, crecimiento, diferenciación, proliferación, opsonización, cicatrización, desarrollo, transformación oncogénica, inflamación y degradación tisular (Quintero *et al.*, 2010; Yasuda, 2006). En la OA, la fibronectina y fragmentos derivados de la misma, como consecuencia de la degradación de la MEC, son capaces de activar procesos de inmunidad innata y vías de señalización que llevan a la perpetuación del proceso inflamatorio y de degradación en la articulación, induciendo la pérdida de proteoglicanos y otros componentes esenciales del cartílago articular (Guo *et al.*, 2009; Homandberg *et al.*, 1996a; Homandberg *et al.*, 1996b; Homandberg y Wen, 1998; Homandberg *et al.*, 1998), mediante la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas como **IL-1 $\beta$**  y **TNF $\alpha$**  (Feghali y Grenier, 2012; Homandberg y Hui, 1996; Homandberg y Wen, 1998; You *et al.*, 2010), **NO** e **iNOS** (Pichika y Homandberg, 2004; Yasuda, 2010) y proteinasas como **ADAMTS** y **MMPs** (Ding *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2009; Hwang *et al.*, 2015; Stanton *et al.*, 2002). Dicha activación se produce mediante la unión de la fibronectina o sus fragmentos de degradación a sus receptores, entre los que se encuentran **integrinas  $\alpha$ 4 $\beta$ 1** y  **$\alpha$ 5 $\beta$ 1** (Homandberg *et al.*, 2002a; Homandberg *et al.*, 2002b; Pap, 2003; Sarkissian y Lafyatis, 1999; Yasuda, 2006), TLRs como **TLR2** y **TLR4** (Hwang *et al.*, 2015; Okamura *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2005; You *et al.*, 2010), y **CD44** (Yasuda, 2006; Yasuda, 2010; Yasuda, 2011), en la superficie de las células articulares, activando diferentes vías de señalización, como la vía de las **MAPK** y los factores de transcripción **NF- $\kappa$ B** y **AP-1** (Ding *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Pulai *et al.*, 2005; Tremble *et al.*, 1995; Yasuda, 2006; Yasuda, 2011; You *et al.*, 2010), además de la vía **Wnt/ $\beta$ -catenina**, con quien establece un bucle de retroalimentación positiva, donde está implicada la señalización por integrinas y MAPK (Bielefeld *et al.*, 2011; Ou *et al.*, 2013).

Se han descrito niveles elevados de fibronectina en el cartílago y líquido sinovial de pacientes con **OA** y **AR** (Dutu *et al.*, 1986; Homandberg *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1992), así como en el tejido sinovial inflamado de pacientes de **AR** (Scott *et al.*, 1981; Yasuda, 2006), además de un incremento de integrinas  $\beta 1$  en los SF de estos pacientes (Rinaldi *et al.*, 1997). Durante el curso de la enfermedad, las proteasas activadas degradan la fibronectina dando lugar a la generación fragmentos con propiedades proinflamatorias. Se han descrito también niveles elevados de estos fragmentos en cartílago y líquido sinovial de pacientes de **OA** y **AR** (Homandberg *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1992; Yasuda, 2006). Existen diferentes fragmentos derivados de la degradación de la fibronectina, entre los que cabe destacar (Yasuda, 2006) (Figura 8):



**Figura 8. Estructura proteica de la fibronectina.** Aparecen indicados los dominios correspondientes a los distintos Fn-fs.

- **Fragmento amino (N)-terminal de unión a heparina y fibrina**
- **Fragmento N-terminal de unión a gelatina y colágeno.**
- **Región central de unión a la célula:** posee una secuencia Arg-Gly-Asp (**RGD**) de unión a **integrinas  $\alpha 5 \beta 1$** .
- **Fragmento carboxilo (C)-terminal de unión a heparina:** posee una región variable (**IIICS**) que contienen los dominios de unión a **integrinas  $\alpha 4 \beta 1$**  CS-1 y CS-5.
- **Fragmento C-terminal de unión a fibrina.**

Entre los Fn-fs, el fragmento de **45 KDa** de la región **N-terminal** de unión a **gelatina y colágeno** parece tener una gran importancia en la patología de la **OA**, estando implicado en la producción de citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas

(Ding *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Feghali y Grenier, 2012; Stanton *et al.*, 2002; Yasuda, 2006). Entre las moléculas implicadas en su señalización se incluyen los receptores **TLR2** y las **integrinas  $\alpha5\beta1$** , la vía **de las MAPK** y el factor de transcripción **NF- $\kappa$ B** (Ding *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Homandberg *et al.*, 2002a; Homandberg *et al.*, 2002b; Su *et al.*, 2005; Yasuda, 2006).

## 5. PAPEL DE LAS PROTEASAS EN LA ARTROSIS

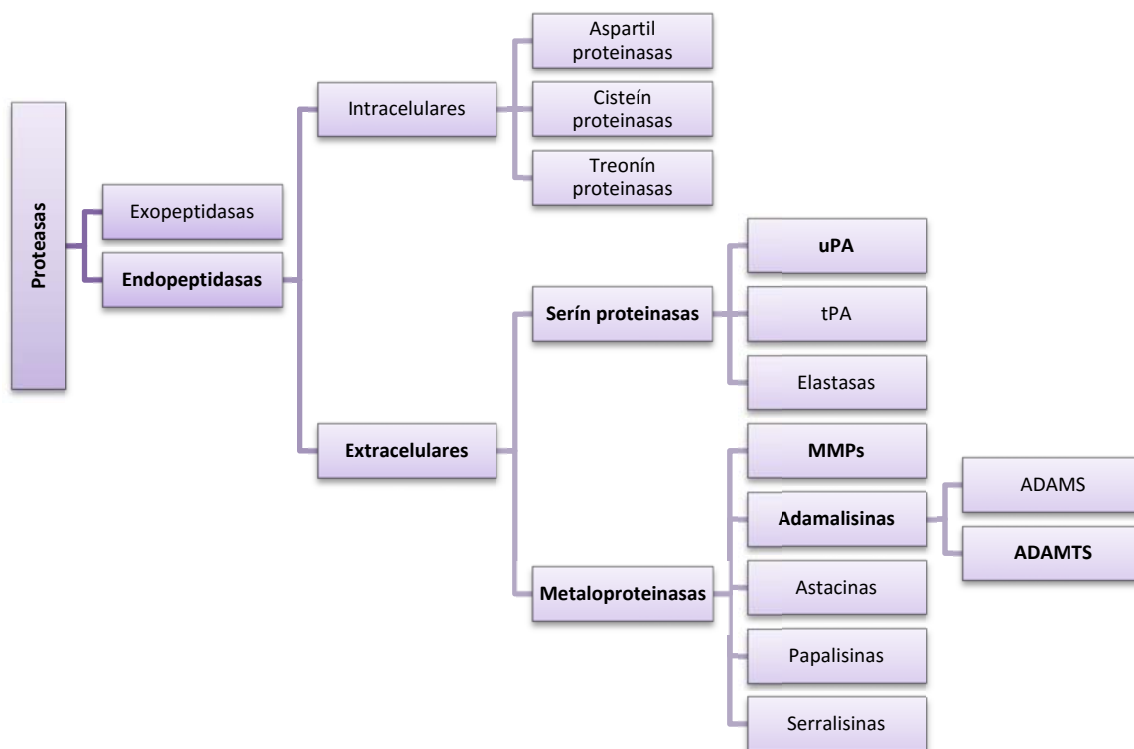


Figura 9. Clasificación de las proteasas (Figura adaptada de Rengel *et al.*, 2007).

Las proteasas son un tipo de enzimas que llevan a cabo de la rotura proteolítica mediante hidrólisis de determinadas uniones peptídicas dentro de una molécula diana. Están implicadas en diversos procesos biológicos, así como en el procesamiento de precursores que intervienen en la remodelación de la MEC, en funciones del sistema inmune, el desarrollo o la apoptosis. Sin embargo, una expresión alterada de las proteasas, puede dar lugar al desarrollo de ciertas patologías, entre las que se incluyen el cáncer, la AR o la OA. De manera global las proteasas se clasifican en **exopeptidasas**,

cuando fragmentan el sustrato en los extremos N- o C-terminal, y **endopeptidasas**, también conocidas como **proteinasas**, encargadas de la rotura de determinadas uniones peptídicas en el interior de la molécula (Figura 9). Las endopeptidasas se clasifican a su vez según el tipo de mecanismo catalítico que interviene en la hidrólisis del polipéptido, pudiendo actuar de manera intracelular o extracelular. Entre ellas, ciertas proteinasas extracelulares, entre las que se incluyen serín proteinasas y metaloproteinasa, desempeñan un papel esencial en los procesos de degradación e inflamación que tienen lugar en la articulación artrósica, donde están implicados en los procesos de destrucción del cartílago y erosión ósea, liberando a su vez componentes de la MEC que promueven su propia expresión, perpetuando además la enfermedad (Rengel *et al.*, 2007; Troeberg y Nagase, 2012). Por tanto, las proteinasas se postulan como unas dianas terapéuticas prometedoras en el desarrollo de terapias para el tratamiento de la OA.

### 5.1. Sistema uPA

El activador del plasminógeno tipo uroquinasa (**uPA**) es una serín proteinasa encargada de la conversión del zimógeno **plasminógeno** en la forma activa **plasmina**, principal enzima encargada de la degradación de fibrina en el proceso de fibrinólisis sanguínea, así como de otras proteínas de la MEC de la articulación. uPA se purificó por primera vez en orina, como una proteína de 54 KDa. Está compuesto por un **péptido señal**, seguido de un fragmento N-terminal (**ATF**) de unión al receptor y un dominio **serín proteinasa** C-terminal. El fragmento ATF está formado, a su vez, por un dominio **EGF** y un dominio **Kringle** (Huai *et al.*, 2006; Troeberg y Nagase, 2012) (Figura 10, drch.). uPA es sintetizado y secretado como un precursor inactivo de cadena sencilla, **pro-uPA**, el cual, gracias a la rotura proteolítica por parte de la plasmina, da lugar a la forma activa de uPA de doble cadena, que contiene un puente disulfuro que une covalentemente el dominio ATF con el dominio serín proteinasa (Blouse *et al.*, 2009; Smith y Marshall, 2010). La plasmina no es sólo capaz de activar uPA, sino también otras proteinasas que influyen en la degradación de la MEC, como las MMPs, incluyendo MMP-3, MMP-9 y MMP-13, además de factores de crecimiento y

angiogénicos (Collen, 1999; Comoglio *et al.*, 1999; Kikuchi *et al.*, 1996; Smith y Marshall, 2010). Por su parte, uPA también es capaz de activar MMPs de manera directa (Rengel *et al.*, 2007). Los SF, condrocitos, macrófagos y monocitos expresan uPA de manera constitutiva, pero su producción se puede ver inducida por ciertas citocinas, incluyendo la IL-1 $\beta$ , y factores de crecimiento (Gyetko *et al.*, 1992; Hamilton *et al.*, 1991; Ito *et al.*, 1992; Martel-Pelletier *et al.*, 1991; Medcalf y Hamilton, 1986; Schwab *et al.*, 2004).

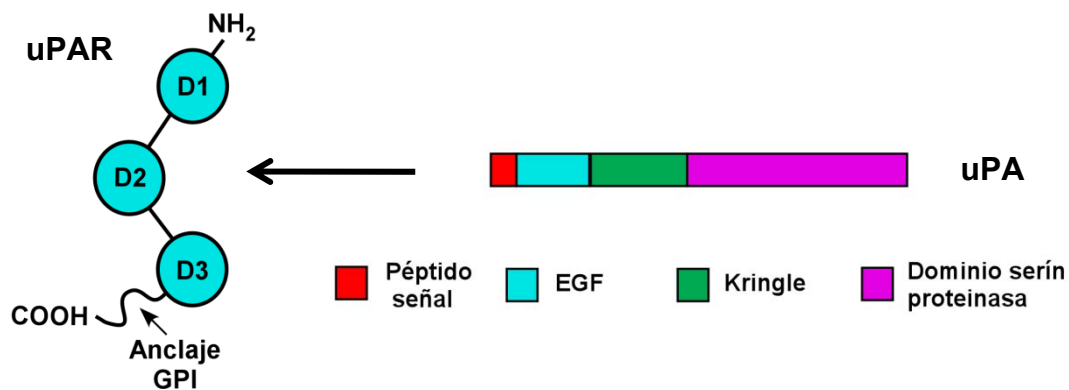
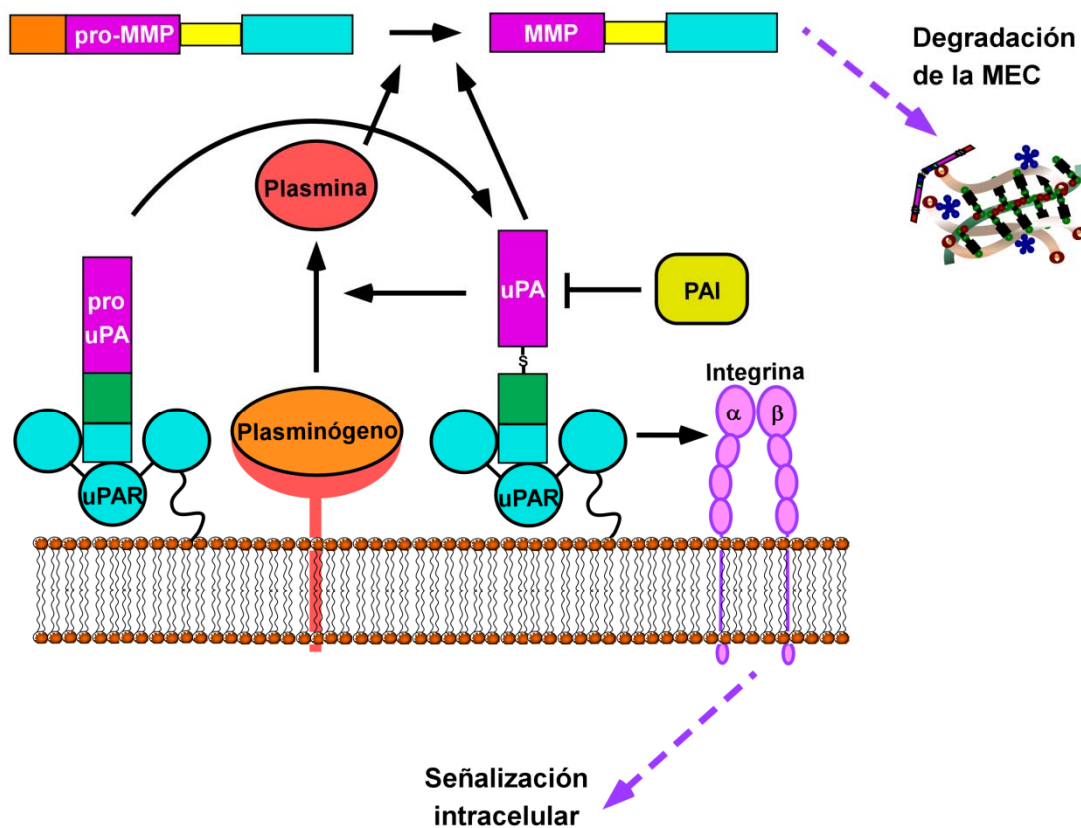


Figura 10. Estructura proteica de uPAR (izq.) y dominios estructurales de uPA (drch.). La flecha indica el lugar de unión de uPA a su receptor.

uPA se une por su extremo N-terminal a su receptor (**uPAR**) activándolo, quien también es capaz de unir pro-uPA. uPAR pertenece a la superfamilia del antígeno 6 de linfocitos (Ly-6), caracterizada por un dominio Ly-6 y uPAR (LU). Está formado por tres **dominios LU (D1-D3)**, de los cuales D1 y D2 están implicados en la unión a uPA, y se encuentra anclado a la membrana plasmática por un anclaje glicosilfosfatidilinositol (**GPI**) (Figura 10, izq.), en la superficie de las células articulares, incluyendo SF, condrocitos y leucocitos, entre otras (Blasi y Sidenius, 2010; Hamilton *et al.*, 1992; Smith y Marshall, 2010). La unión **uPA/uPAR** induce la rotura proteolítica del plasminógeno y la activación de la **plasmina**, quien a su vez activa a las **MMPs** para la degradación de la MEC. Por otra parte, la unión uPA/uPAR activa vías de señalización por parte de **integrinas  $\beta$ 1**, que actúan como correceptores (Figura 11). Entre ellas, las integrinas  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 participan además en la fibrilogénesis de la fibronectina (Smith y Marshall, 2010). En estas cascadas de señalización participan la tirosina quinasa de

adhesión focal (**FAK**) y **Src**, la vía de **Rac** y las **MAPK**. Otro ligando de uPAR es la **vitronectina**, una glicoproteína de la MEC implicada en la señalización intracelular mediada por integrinas (Madsen *et al.*, 2007). uPAR señala también mediante la vía de las quinasas Janus (**JAK**) y del transductor de señal y activador de la transcripción (**STAT**), además de la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (**PI3K**)/**Akt** (Aguirre Ghiso, 2002; Kjoller y Hall, 2001; Koshelnick *et al.*, 1997; Lester *et al.*, 2007; Vial *et al.*, 2003). Por otro lado, las vías de las **MAPK** y de **Wnt**, así como los factores de transcripción **AP1** y **NF- $\kappa$ B** están implicados en la expresión de uPAR. También se ha descrito la inducción de su expresión mediada por citocinas y factores de crecimiento en fibroblastos y monocitos (Smith y Marshall, 2010).



**Figura 11. Función y regulación del sistema uPA.** La plasmina induce el paso de pro-uPA a uPA activa, quien a su vez también media el paso de plasminógeno a plasmina. Tanto la plasmina como uPA activan a las MMPs, induciendo la degradación de la MEC. Por otro lado, el uPA activo unido a uPAR, interaccionan con integrinas, quienes actúan como correceptores induciendo diferentes vías de señalización intracelular. Por su parte, PAI se une y bloquea a uPA, inhibiendo sus acciones.

El sistema uPA se regula mediante inhibidores del activador del plasminógeno, entre los que se encuentran los inhibidores del activador del plasminógeno o **serpinas**

(PAI-1 o serpinaE1, PAI-2 o serpinaB2 y PAI-3). Entre ellos el **PAI-1** es el más estudiado (Ghosh y Vaughan, 2012). Por otro lado, la  **$\alpha 2$  antiplasmina**, inhibe el sistema uPA mediante el bloqueo de la actividad de la plasmina (Smith y Marshall, 2010).

La unión de uPA a su receptor activa una serie de vías de señalización implicadas en diversos procesos biológicos de adhesión, proliferación, diferenciación, supervivencia, quimiotaxis y fagocitosis, relacionados con mecanismos de la inmunidad innata (Blasi y Sidenius, 2010; Jin *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2011; Smith y Marshall, 2010), además de procesos angiogénicos, de cicatrización y ovulación. La expresión de uPAR se ve incrementada en procesos de inflamación y remodelación de la MEC (Blasi y Sidenius, 2010; Hamilton *et al.*, 1992; Smith y Marshall, 2010). Al igual que ocurre con uPAR, tanto uPA como PAI-1 se observan también incrementados en inflamación (Del Rosso *et al.*, 2008; Ghosh y Vaughan, 2012). Asimismo, uPAR está implicado en la regulación de la respuesta inflamatoria mediada por TLR2 (Liu *et al.*, 2011). Por otro lado, el sistema uPA se relaciona también con el desarrollo de ciertas patologías como cáncer, OA y AR (Li *et al.*, 2005). Los SF de pacientes de OA y AR expresan uPAR en su superficie y producen niveles elevados de uPA, que están implicados en el proceso inflamatorio y de destrucción articular (Cerinic *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Roday *et al.*, 1996). Asimismo, uPA es capaz de ejercer también sus efectos de manera independiente de uPAR, estando implicado en el proceso inflamatorio de la artritis (Jin *et al.*, 2003).

## 5.2. MMPs

Las **metaloproteinasas** están implicadas en la degradación de diferentes componentes de la MEC, entre ellas las **MMPs** y las **ADAMTS** pertenecen a la superfamilia de las **metzincinas**, caracterizadas por ser metaloproteinasas dependientes de cinc (Zn), secretadas como proteínas solubles por diversos tipos celulares e implicadas en la regulación de la MEC y de las interacciones celulares (Murphy y Lee, 2005). Las ADAMTS y las MMPs son las principales implicadas en la degradación de la MEC del cartílago en la OA, ya que actúan degradando dos de sus principales componentes. Las ADAMTS, en particular las **agrecanasas**, son importantes

en el inicio del proceso ya que degradan el agregado de la MEC, dando paso a la acción de las MMPs **colagenasas** para la degradación del colágeno tipo II, un paso crítico e irreversible. En este proceso se liberan además fragmentos de otros componentes de la MEC como la **fibronectina**, iniciando un proceso inflamatorio en el que las células activadas liberan mediadores como la **IL-1 $\beta$** , que inducen diferentes rutas de señalización, entre las que se incluyen la vía de las **MAPK** o la vía de **Wnt** y factores de transcripción como **AP-1**, **NF- $\kappa$ B** o **Runx2**, que a su vez promueven la expresión de las propias metaloproteinasas (Bondeson *et al.*, 2007; Clutterbuck *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2013; Ji *et al.*, 2016; Loeser *et al.*, 2012; Otero *et al.*, 2012; Rengel *et al.*, 2007; Tetsunaga *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2007; Yuasa *et al.*, 2008). Por otro lado, existen una serie de inhibidores endógenos de estas MMPs y ADAMTS, los TIMPS, cuya familia está compuesta por cuatro miembros (TIMP 1-4) capaces de inhibir la forma activa de las MMPs (Murphy y Lee, 2005). Entre ellos **TIMP-1 y -2** actúan como potentes inhibidores de la acción de las MMPs, mientras que **TIMP-3** es el principal implicado en la inhibición de agreganasas (Huang y Wu, 2008; Kashiwagi *et al.*, 2001). En la OA se han descrito niveles alterados de ciertas MMPs, ADAMTS y TIMPs (Davidson *et al.*, 2006; Kevorkian *et al.*, 2004; Murphy y Nagase, 2008).

Las **MMPs** se describieron por primera vez en 1962 por su acción colagenolítica durante la metamorfosis en renacuajos. En humanos la familia de las MMPs, también conocidas como **matrixinas**, está compuesta por 23 miembros. Están implicadas principalmente en la remodelación de la MEC, así como en el procesamiento de otras proteinasas y de sus inhibidores, receptores de superficie y factores de crecimiento. Además también están implicadas en diversos procesos fisiológicos de adhesión celular, proliferación, migración, apoptosis y cicatrización (Murphy y Nagase, 2008; Vu y Werb, 2000). Las MMPs se clasifican en cinco grupos principales teniendo en cuenta su sustrato, estructura y localización celular (Clutterbuck *et al.*, 2009; Martel-Pelletier *et al.*, 2001; Murphy y Nagase, 2008; Rengel *et al.*, 2007) (Tabla 5).

Tabla 5. PRINCIPALES MMPs EN HUMANOS		
GRUPO	MIEMBROS	SUSTRATOS PRINCIPALES
Colagenasas	MMP-1 (colagenasa-1)	Principalmente colágeno III. También colágeno I, II, VII, X, gelatina, agregano, tenascina, proteínas de unión
	MMP-8 (colagenasa-2)	Principalmente colágeno I. También colágenos II, III, VIII, X, agregano, proteínas de unión
	MMP-13 (colagenasa-3)	Principalmente colágeno II. También colágenos I, III, IV, VII, IX, X, gelatina, agregano, osteonectina, perlecan
Gelatinasas	MMP-2 (gelatinasa A)	Gelatina, colágenos I, II, III, IV, V, VII, X, XI, agregano, fibronectina, laminina, elastina, tenascina, vitronectina
	MMP-9 (gelatinasa B)	Gelatina, colágenos I, III, IV, V, VII, X, XI, XIV
Estromelisinias	MMP-3 (estromelisinina-1)	Agregano, fibronectina, laminina, gelatina, colágenos I, III, IV, V, VIII, IX, X, proteínas de unión, elastina, vitronectina, tenascina, decorina, activación de pro-MMPs
	MMP-10 (estromelisinina-2)	Agregano, fibronectina, laminina, gelatina, colágenos I, III, VI, V, VIII, IX, elastina, vitronectina,
	MMP-11 (estromelisinina-3)	Agregano, fibronectina, laminina, gelatina, colágeno tipo IV, serpina
Matrilisinias	MMP-7 MMP-26	Distintos componentes de la MEC Moléculas de superficie Activación de pro-MMPs
MT-MMPs	MMP-14 (MT1-MMP) MMP-15 (MT2-MMP) MMP-16 (MT3-MMP) MMP-17 (MT4-MMP) MMP-24 (MT5-MMP) MMP-25 (MT6-MMP)	Activación de pro-MMPs

La estructura general de las MMPs consta de un **péptido señal**, necesario para la maduración y liberación de la enzima desde la célula, un **prodominio**, que permite mantener a la enzima inactiva, un **dominio catalítico**, encargado de proporcionar la actividad enzimática, ya que contiene el átomo de  $Zn^{2+}$ , un **dominio de unión** de extensión variable, del que carecen ciertas MMPs, y un **dominio hemopexina**, ausente también en algunas MMPs, que confiere la especificidad por el sustrato, además de interactuar con ciertos inhibidores y receptores celulares.

Debido a su capacidad proteolítica, las MMPs han de estar fuertemente reguladas. Se sintetizan como pre-proenzimas, eliminándose el péptido señal durante el proceso de translación y liberándose de forma inactiva como **zimógenos**, gracias a que el **prodominio** posee un **residuo conservado de cisteína** que se une al  $Zn^{2+}$  del dominio catalítico. Para la activación de las MMPs es necesaria la eliminación del prodominio por parte de otras enzimas, incluyendo MMPs asociadas a membrana (**MT-MMPs**), **cathepsina B**, **uPA**, **plasmina** y el activador tisular del plasminógeno (**tPA**) (Clutterbuck *et al.*, 2009; Martel-Pelletier *et al.*, 2001; Murphy y Nagase, 2008; Rengel *et al.*, 2007). Esta activación suele ser extracelular, aunque también puede tener lugar en la superficie celular, como en el caso de la MMP-13 y la MMP-2, o intracelular en el aparato de Golgi, como ocurre con las MT-MMPs y la MMP-11 (Nagase, 1997).

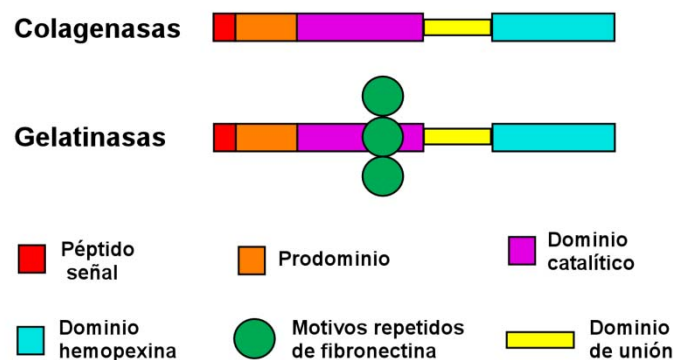


Figura 12. Estructura proteica de las colagenasas y de las gelatinasas.

Una activación excesiva de las MMPs puede conllevar el desarrollo de determinadas patologías incluyendo cáncer, enfermedades cardiovasculares y diversas patologías inflamatorias y/o autoinmunes, entre las que se encuentran la OA y la AR, donde se han observado niveles elevados de MMPs en el tejido sinovial y cartílago de los pacientes (Buisson-Legendre *et al.*, 2004; Clutterbuck *et al.*, 2009; Davidson *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2014; Kevorkian *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2002).

### 5.2.1. Colagenasas: la MMP-13

Entre las MMPs, las colagenasas juegan un papel esencial en el remodelado de la MEC, mediante la rotura de las fibras de **colágeno tipo I, II y III**, aunque también son

capaces de actuar sobre otros tipos de colágeno y componentes de la MEC, además de degradar proteínas solubles. Las colagenasas están constituidas por un prodominio, un dominio catalítico y dominios hemopexina, esenciales para su actividad colagenolítica (Murphy *et al.*, 2002; Murphy y Nagase, 2008) (Figura 12). Son producidas tanto por SF, como por SM y condrocitos, jugando un papel esencial en el desarrollo de la OA mediante la degradación del colágeno. La MMP-1 parece estar implicada en las fases iniciales de destrucción en zonas más superficiales del cartílago, mientras que la MMP-13 es esencial en las siguientes fases de remodelación de la MEC.

Dentro del grupo de colagenasas, la **MMP-13 o colagenasa-3** desempeña un importante papel en la degeneración articular de la OA. Se trata de una proteína de 52KDa (42KDa en su forma activa) implicada en la degradación del **colágeno tipo II**, uno de los principales componentes de la MEC del cartílago (Martel-Pelletier *et al.*, 2001; Murphy y Lee, 2005; Murphy y Nagase, 2008). Además de este sustrato, la MMP-13 es capaz de degradar otros componentes de la MEC (Martel-Pelletier *et al.*, 2001; Shiomi *et al.*, 2010). Por todo ello la MMP-13 es considerada una de las principales implicadas en la progresión de la OA. Sus niveles se encuentran elevados el cartílago de los pacientes, asociándose con una mayor destrucción (Piecha *et al.*, 2010; Roach *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013), estando también presente en SF y líquido sinovial de pacientes de OA y AR (Fuchs *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2009; Wernicke *et al.*, 1996; Yoshihara *et al.*, 2000). Citocinas como la IL-1 $\beta$  y otros mediadores inflamatorios están implicados en la inducción de su expresión (Martel-Pelletier *et al.*, 2001).

### 5.2.2. Gelatinasas: la MMP-9

Las gelatinasas tienen un amplio espectro de especificidad por los sustratos. No sólo degradan **gelatinas**, sino también otros componentes de la MEC, incluyendo la **fibronectina** y distintos tipos de **colágeno**. La MMP-2 es también capaz de degradar los colágenos tipo I, II y III, aunque con una menor actividad que las colagenasas. Las gelatinasas son producidas por células mesenquimales, macrófagos y células mononucleares de sangre periférica, pero también por las células activadas del tejido conectivo y células tumorales. Como particularidad en su estructura, las colagenasas

poseen tres **motivos repetidos de fibronectina tipo II** en su dominio catalítico, que les facilitan la unión y degradación del sustrato (Murphy *et al.*, 2002; Murphy y Nagase, 2008) (Figura 12).

Entre las gelatinasas, el estudio de la **MMP-9 o gelatinasa B** está incrementando en los últimos años debido a su potencial implicación en procesos tanto fisiológicos como patológicos. Se trata de una enzima de 92KDa (82KDa en su forma activa) con un **dominio O-glicosilado** de unión flexible entre el dominio catalítico y el dominio hemopexina, esencial para ejercer su función. La MMP-9 es además capaz de actuar sobre proteínas situadas en el interior de vesículas, en la mitocondria, el núcleo o el citoplasma, así como sobre proteínas del citoesqueleto, estando también implicada en la regulación de la permeabilidad de la barrera epitelial. En cuanto a su implicación en patologías, está relacionada con la supervivencia de células tumorales, enfermedades cardiovasculares, degenerativas, autoinmunes, óseas e inflamatorias, activando mediadores proinflamatorios como la IL-1 $\beta$  (Vandooren *et al.*, 2013), quien recíprocamente induce su expresión (Martel-Pelletier *et al.*, 2001). Los niveles de MMP-9 en líquido sinovial de pacientes de OA y AR, están asociados con los de **MMP-13**, así como con la **uPA**, estando implicados en la progresión de la enfermedad (Kim *et al.*, 2012).

### 5.3. ADAMTS

Identificadas por primera vez en 1997, las **ADAMTS** son un tipo de metaloproteinasas multidominio, implicadas en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos, mediante la remodelación de la MEC. Alteraciones en su expresión se relacionan con el desarrollo de ciertas patologías inflamatorias, artríticas, vasculares y neurodegenerativas, así como con el cáncer. En mamíferos la familia de las ADAMTS está formada por 19 miembros, que se clasifican en cinco subgrupos en relación a su sustrato específico (Kelwick *et al.*, 2015; Porter *et al.*, 2005; Takeda, 2009) (Tabla 6).

Tabla 6. CLASIFICACIÓN DE LAS ADAMTS		
GRUPO	MIEMBROS	FUNCIÓN PRINCIPAL
<b>Agreganasas y proteoglicanasas</b>	ADAMTS-1 ADAMTS-4 ADAMTS-5 ADAMTS-8 ADAMTS-15 ADAMTS-9 ADAMTS-20	Degradación de proteoglicanos: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Agregano del cartílago</li> <li>• Versicano del sistema vascular</li> <li>• Brevicano y neurocano del sistema nervioso</li> </ul>
<b>Proteinasas de COMP</b>	ADAMTS-7 ADAMTS-12	Degradación de COMP
<b>N-propeptidasas del procolágeno</b>	ADAMTS-2 ADAMTS-3 ADAMTS-14	Maduración del procolágeno
<b>Proteinasas del Factor de von-Willebrand</b>	ADAMTS-13	Procesamiento del Factor de coagulación de von-Willebrand
<b>Enzimas huérfanas</b>	ADAMTS-6 ADAMTS-10 ADAMTS-16 ADAMTS-17 ADAMTS-18 ADAMTS-19	Función Desconocida Asociación con enfermedades genéticas heredadas y adquiridas

De manera general las ADAMTS están compuestas por un **dominio proteinasa** y un **dominio auxiliar** C-terminal, que le proporciona la especificidad por el sustrato, le permite la interacción con la MEC y la regulación de su actividad, además de determinar su localización. El dominio proteinasa está compuesto a su vez por un **péptido señal**, un **prodominio**, un **dominio catalítico** y un **dominio desintegrina**, mientras que el dominio auxiliar está formado por un número variable de motivos repetidos de trombospondina tipo 1 (**TSP1**), una **región rica en cisteína** y una **región espaciadora**, aunque el extremo carboxilo terminal puede variar según la enzima, pudiendo contener otros dominios y motivos TSP1 (Apte, 2009; Kelwick *et al.*, 2015; Porter *et al.*, 2005) (Figura 13).

Existen múltiples isoformas de las ADAMTS, ya que están sometidas a procesos de **splicing alternativo**, además de **modificaciones postranslacionales** de glicosilación y proteólisis implicadas en su secreción, localización, activación y función catalítica (Apte, 2004; Kelwick *et al.*, 2015; Lin y Liu, 2010). Al igual que las MMPs, las ADAMTS son sintetizadas de manera inactiva liberándose como **zimógenos**. Estos zimógenos

experimentan un **procesamiento** en el extremo **N-terminal** mediante la eliminación del péptido señal, además del prodominio, el cual sirve también para el correcto procesamiento y secreción de la proteína. El prodominio suele contener al menos un lugar de unión para proproteínas convertasas **furina** o similares a furina, quienes se encargan de la activación intracelular o extracelular de la enzima mediante su eliminación, aunque ciertas agrecanasas no necesitan la eliminación del prodominio para ser activas. Una vez secretadas, las ADAMTS pueden sufrir también procesamientos en el extremo **C-terminal**, donde está implicada la región espaciadora (Fosang *et al.*, 2008; Jones y Riley, 2005; Kelwick *et al.*, 2015; Longpre *et al.*, 2009).

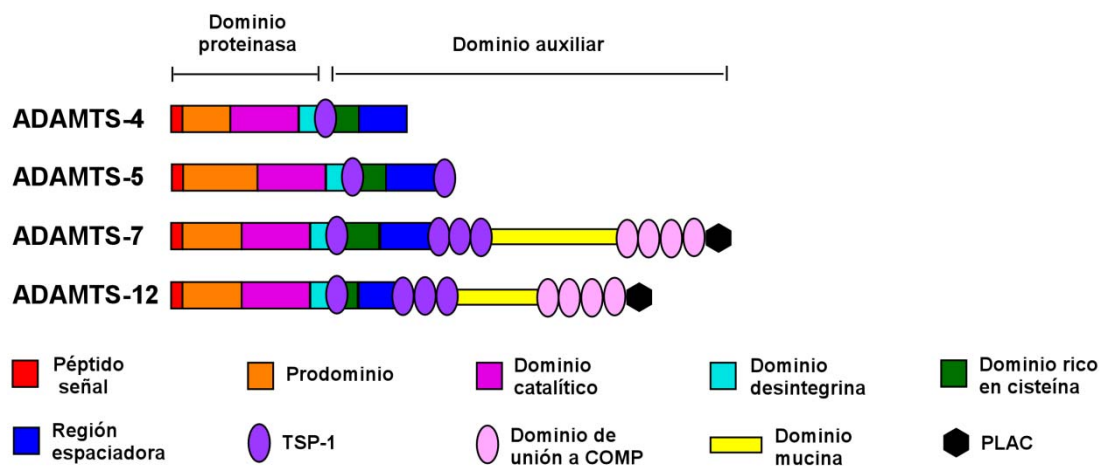


Figura 13. Estructura proteica de las ADAMTS-4, -5, -7 y -12.

Entre la familia de las ADAMTS, las agrecanasas ADAMTS-4 y -5, y las ADAMTS-7 y -12, están implicadas directamente en el proceso de degradación de la MEC y pérdida de cartílago en la OA, donde se expresan en los diferentes tejidos articulares (Lin y Liu, 2009; Lin y Liu, 2010).

### 5.3.1. Agrecanasas: ADAMTS-4 y ADAMTS-5

El grupo de las agrecanasas y proteoglicanasas incluye una serie de ADAMTS capaces de romper proteoglicanos de CS que se unen al ácido hialurónico (Stanton *et al.*, 2011). El **agrecano** es uno de los principales componentes de la MEC del cartílago, que además protege al colágeno de la degradación. La pérdida de agrecanos de la MEC que se origina durante el desarrollo de la OA, es uno de los eventos clave en el

desarrollo de la enfermedad, originándose ya en estadios tempranos (Bondeson *et al.*, 2008; Huang y Wu, 2008; Kelwick *et al.*, 2015), lo que se puede observar en la detección de sus productos de degradación en el líquido sinovial en pacientes de OA y AR (Arner *et al.*, 1999; Lohmander *et al.*, 1993). En este proceso las agrecanasas adquieren un papel esencial. Aunque también existen MMPs y otra proteasas capaces de degradar agrecanos, éstas no pueden romper en la secuencia altamente conservada del núcleo proteico implicada en la patogenia de la OA, **NITEGE<sup>373-374</sup>ARGSV** del **IGD** entre el **Glu<sup>373</sup>** y la **Ala<sup>374</sup>**, donde sí actúan las agrecanasas (Huang y Wu, 2008; Kelwick *et al.*, 2015). Esta proteólisis da lugar a la generación de los neoepítomos ARGSV y NITEGE, que se observan elevados en el cartílago de pacientes de OA y AR (Hughes *et al.*, 1995; Lark *et al.*, 1997).

La **ADAMTS-4 o agrecanasa-1** y la **ADAMTS-5 o agrecanasa-2**, también conocida como ADAMTS-11, son las principales implicadas en esta proteólisis del agrecano, siendo también capaces de romper en otras regiones de la molécula (Fosang y Little, 2008; Huang y Wu, 2008). El motivo TSP1 de las agrecanasas juega un importante papel en estos procesos de rotura gracias a su unión con las cadenas laterales de GAGs. Además del sitio de unión a  $Zn^{2+}$ , las ADAMTS-4 y -5 poseen un sitio de unión a calcio ( $Ca^{2+}$ ), pudiendo tener dos conformaciones alternativas del centro activo que se encuentran en equilibrio: una conformación abierta en la que el  $Ca^{2+}$  se une y una conformación cerrada en la que el  $Ca^{2+}$  se libera, lo que representa un mecanismo regulador de su actividad catalítica (Kelwick *et al.*, 2015; Takeda, 2009). La **ADAMTS-4** es la más corta de la ADAMTS con sólo un motivo TSP1. Se sintetiza como un precursor inactivo sobre el que actúa la furina, eliminando el prodominio y activando así a la enzima. En el caso de ADAMTS-4 esta activación se produce dentro de la célula, en la red trans-Golgi (Wang *et al.*, 2004). El dominio no catalítico parece estar implicado en la regulación de su actividad (Kashiwagi *et al.*, 2004). La **ADAMTS-5** sigue a la ADAMTS-4 en longitud, con un motivo TSP1 adicional en su extremo C-terminal (Gendron *et al.*, 2007; Huang y Wu, 2008). A diferencia de la ADAMTS-4, la activación de esta enzima es extracelular, de manera que las furinas eliminan su prodominio una vez secretada al exterior (Kelwick *et al.*, 2015). En el caso de la ADAMTS-5 existen dos lugares de unión a  $Ca^{2+}$ , importantes para la integridad de la estructura de la enzima:

uno de los sitios de unión contiene un ion  $\text{Ca}^{2+}$ , mientras que en el otro se encuentran dos iones formando un cluster de calcio (Shieh *et al.*, 2008). Esta enzima posee además un lugar de unión a sustratos único, lo que hace pensar que es capaz de unir motivos de las moléculas de sustrato diferentes a otras proteasas (Fosang *et al.*, 2008).

Aunque la ADAMTS-5 es la principal agrecanasa en ratón (Fosang *et al.*, 2008; Kelwick *et al.*, 2015), existe cierta controversia acerca de cuál de las dos agrecanasas es la más importante en humanos (Fosang *et al.*, 2008). Existen evidencias de que ambas agrecanasas están implicadas en la patogénesis de la OA (Fosang *et al.*, 2008; Kelwick *et al.*, 2015), donde juegan un importante papel mediante la degradación de agrecano durante todo el desarrollo de la enfermedad, principalmente en las etapas iniciales y finales (Zhang *et al.*, 2013). Algunos estudios consideran a la ADAMTS-4 la principal implicada en la patogenia de la OA, debido a que sus niveles se encuentran incrementados en el cartílago de dichos pacientes, correlacionándose con una mayor degradación del cartílago, mientras que los niveles de ADAMTS-5 son similares a los de las personas sanas (Naito *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013). Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que la actividad de ADAMTS-5 es bastante superior a la de ADAMTS-4 (Gendron *et al.*, 2007). Por otro lado, la expresión de ADAMTS-4 puede inducirse con diferentes mediadores proinflamatorios, como la IL-1 $\beta$  o el TNF $\alpha$ , mientras que otros autores señalan que la ADAMTS-5 es constitutiva (Bau *et al.*, 2002; Kataoka *et al.*, 2013; Sylvester *et al.*, 2012; Yamanishi *et al.*, 2002), aunque existen trabajos que indican que ambas ADAMTS pueden ser inducidas (Imada *et al.*, 2008; Imada *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2013; Koshy *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2007).

### 5.3.2. Proteinasa de COMP: ADAMTS-7 y ADAMTS-12

Las **ADAMTS-7 y -12** son las únicas que poseen un **dominio mucina** al que se unen las cadenas de CS, aportándoles características de proteoglicano (Somerville *et al.*, 2004). Además contienen un motivo **PLAC** (proteasa y lacunina) en su extremo N-terminal, con seis residuos conservados de cisteína. Su procesamiento depende de furinas y finaliza en el espacio extracelular. La importancia de estas ADAMTS radica en su capacidad para degradar **COMP** (Lin y Liu, 2009; Liu *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006b),

una proteína de la MEC que contribuye al mantenimiento de la estabilidad del cartílago mediante su interacción con otros componentes de la misma, como el agregano, el colágeno tipo II o la fibronectina (Di Cesare *et al.*, 2002; Lin y Liu, 2009; Rosenberg *et al.*, 1998). Se han descrito fragmentos derivados de su degradación en el cartílago, líquido sinovial y suero de pacientes de OA y AR (Neidhart *et al.*, 1997; Saxne y Heinegard, 1992). Los motivos TSP1 del extremo C-terminal de las ADAMTS-7 y -12 son los que les permiten la interacción con COMP (Lin y Liu, 2009; Wei *et al.*, 2014). A su vez COMP se asocia con el precursor de granulina-epitelina (**GEP**), el cual inhibe la actividad de las ADAMTS-7 y -12. Se han descrito también niveles elevados de GEP en el tejido sinovial de pacientes de OA y AR (Lin y Liu, 2009; Xu *et al.*, 2007). Asimismo, la alfa-2-macroglobulina ( **$\alpha_2M$** ) es otro sustrato de las ADAMTS-7 y -12, implicado también en la regulación de ambas. Por otro lado, ADAMTS-12 también es capaz de degradar el agregano de la MEC, aunque con una capacidad mucho menor que las agreganasas ADAMTS-4 y -5 (Luan *et al.*, 2008).

Estudios recientes indican que las ADAMTS-7 y -12 están implicadas en la patogénesis de diferentes enfermedades, entre las que se incluyen enfermedades reumáticas, vasculares y cáncer (Kelwick *et al.*, 2015; Lin y Liu, 2009). Ambas enzimas se expresan en los diferentes tejidos articulares, incluyendo cartílago, hueso y tejido sinovial. Las ADAMTS-7 y -12 están implicadas además en la inhibición de la condrogénesis, actuando como dianas de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP) (Bai *et al.*, 2009a; Bai *et al.*, 2009b; Lin y Liu, 2009; Wei *et al.*, 2014). Se han descrito niveles elevados de estas ADAMTS en pacientes de OA y AR (Kevorkian *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006b). Además estas enzimas pueden ser inducidas por estímulos proinflamatorios, aunque en el caso de ADAMTS-12 parece depender del tipo celular implicado (Cal *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2014; Luan *et al.*, 2008).

## 6. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN IMPLICADOS EN LA ARTROSIS

En la búsqueda y el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la OA, es de gran importancia el estudio de las rutas de señalización implicadas. Aunque estas vías son diversas y se encuentran interrelacionadas, describiremos algunas de las principales involucradas en la patología.

### 6.1. MAPK

Las MAPK son un tipo de proteínas quinasas altamente conservadas a lo largo de la evolución. Están implicadas en la regulación de diversos procesos biológicos incluyendo supervivencia, apoptosis, proliferación y migración celular, así como en la respuesta al estrés y en diferentes funciones metabólicas. También contribuyen en el mantenimiento de la homeostasis y en procesos de expresión génica, siendo las encargadas de conectar señales extracelulares con dianas específicas dentro de la célula. Existen tres familias principales de MAPK: la quinasa regulada por señales extracelulares (**ERK**), que posee 2 isoformas (ERK-1 y -2); la quinasa **p38**, con 4 isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ), y la quinasa N-terminal de c-Jun (**JNK**) o quinasa activada por estrés (SAPK), con 3 isoformas (JNK-1, -2 y -3). Aunque todas las MAPK intervienen

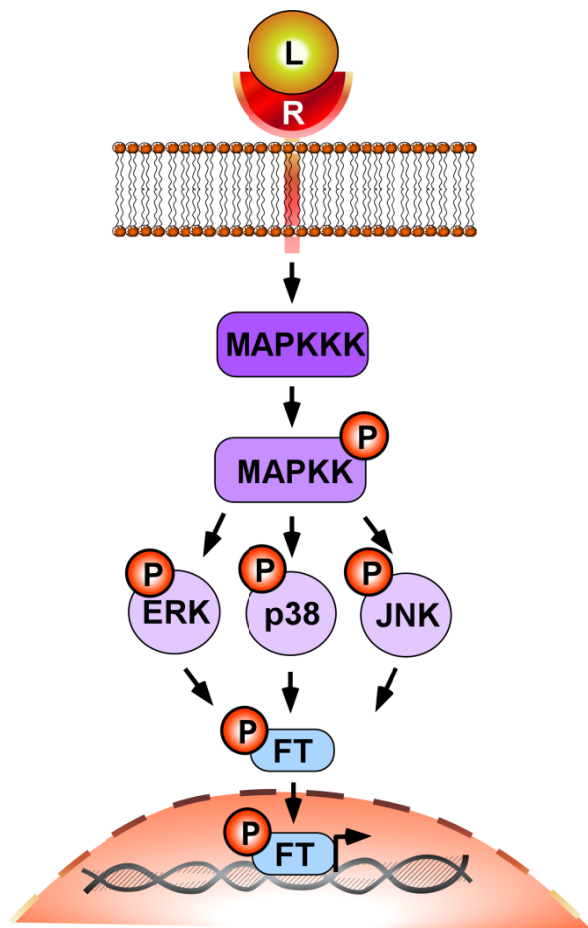


Figura 14. Esquema de la vía de señalización de las MAPK. L, ligando; R, receptor de membrana; FT, factor de transcripción.

en diferentes funciones pudiendo solapar entre ellas, ERK está más relacionada con procesos de mitosis y proliferación de células tumorales, mientras que JNK y p38 tienen mayor efecto en la respuesta a diferentes estímulos de estrés y en la producción de citocinas (Chang y Karin, 2001; Johnson y Lapadat, 2002).

Todas las MAPK activan a sus sustratos mediante la **fosforilación** de residuos específicos de serina o treonina. Sus sustratos incluyen otras proteínas quinasas, fosfolipasas, proteínas del citoesqueleto y factores de transcripción. A su vez las MAPK también se regulan por fosforilación. Las quinasas de las MAPK (**MAPKK**), fosforilan a las MAPK activándolas. De la misma manera, estas MAPKK son activadas por quinasas de quinasas de las MAPK (**MAPKKK**), quienes pueden ser inducidas por diferentes estímulos, incluyendo mediadores **proinflamatorios**, **factores de crecimiento**, mediadores de **estrés** o **ligandos** de receptores acoplados a proteínas G (**GPCRs**), **TLRs** o **integrinas** (Figura 14). Mientras que las MAPKK son específicas, las MAPKKK pueden activar a distintas MAPKK. Por otro lado, las **fosfatasas** de MAPK, se encargan de su desfosforilación, inactivándolas e inhibiendo así su señalización intracelular (Chang y Karin, 2001; Johnson y Lapadat, 2002; Lin *et al.*, 2016).

Debido a su implicación en numerosas funciones celulares, las MAPK se relacionan con el desarrollo de diferentes patologías, incluyendo enfermedades reumáticas y cáncer, representando una diana terapéutica prometedora para el tratamiento de las mismas (Chang y Karin, 2001; Johnson y Lapadat, 2002). Entre las patologías reumáticas, se ha descrito su implicación en la OA y la AR, donde se relacionan con los procesos de inflamación y destrucción articular (Bartok y Firestein, 2010; Beier y Loeser, 2010). Existen evidencias de la participación de las tres familias de MAPK en la OA (Beier y Loeser, 2010). Entre los factores de transcripción implicados en la OA activados por MAPK, se incluyen **CREB**, **Runx2** y **AP-1** (Karin, 1995; Taleisnik, 2006; Vimalraj *et al.*, 2015), además de estar relacionadas con la vía de **Wnt** (Shahnazari *et al.*, 2008). Las MAPK participan también en la señalización de mediadores proinflamatorios, entre los que se incluyen los **Fn-fs** y citocinas como la **IL-1 $\beta$** , la IL-6 o el TNF $\alpha$ , entre otros (Beier y Loeser, 2010; Chang y Karin, 2001; Ding *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2006; Kanwar *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2015; Mimata *et*

*al.*, 2012; Yasuda, 2006), induciendo la expresión de otros mediadores inflamatorios, como **PGE2**, **NO** y diversas **citocinas**, incluyendo IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  (Jeong *et al.*, 2015a; Jeong *et al.*, 2015b; Li *et al.*, 2015b; Ma *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2000). Además de su participación en la inflamación, las MAPK están implicadas en la **proliferación y apoptosis de condrocitos**, así como en la producción de enzimas de destrucción en SF y condrocitos, entre las que se incluyen **ADAMTS**, como las ADAMTS-4 y -5, y **MMPs**, como las MMP-1, -9 y -13 (Beier y Loeser, 2010; Boileau *et al.*, 2005; Chang y Karin, 2001; Fan *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2001; Hwang *et al.*, 2015; Jeong *et al.*, 2015a; Jeong *et al.*, 2015b; Li *et al.*, 2015b; Lu *et al.*, 2015; Mimata *et al.*, 2012; Saito *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2015). Las MAPK participan también en procesos de **osteoclastogénesis y diferenciación de osteoblastos**, donde se relacionan con la activación de Runx2 (Tornero-Esteban *et al.*, 2015).

Las MAPK se presentan por tanto como una prometedora diana terapéutica para el tratamiento de diferentes patologías. Diversos ensayos clínicos y estudios en modelos animales han demostrado un efecto beneficioso de inhibidores de las MAPK en cáncer y enfermedades reumáticas. Además medicamentos utilizados para el tratamiento de la OA como la diacereína, parecen ejercer un efecto inhibitorio sobre esta vía, con consecuencias beneficiosas en la destrucción del cartílago. Sin embargo, debido a su gran implicación en diversos procesos biológicos, el uso de estos fármacos podría suponer importantes efectos adversos, por lo que es necesario seguir ampliando el estudio en la búsqueda de inhibidores de estas vías (Chang y Karin, 2001; Domagala *et al.*, 2006; Johnson y Lapadat, 2002; Kyttaris, 2012).

## 6.2. PI3K/Akt

La vía de la PI3K/Akt es importante en el desarrollo del cartílago articular. La PI3K se activa por fosforilación mediada por diferentes receptores entre los que destacan los **receptores tirosina quinasa**, activados principalmente por **citocinas** y **factores de crecimiento**. La unión del ligando al receptor provoca su autofosforilación y la fosforilación de la **PI3K**. La PI3K activada fosforila al fosfatidil inositol difosfato (**PIP<sub>2</sub>**) quien pasa a convertirse en inositol trifosfato (**IP<sub>3</sub>**), fosforilando y activando a la

quinasa **Akt**, quien induce la activación de diferentes factores de transcripción (Beier y Loeser, 2010) (Figura 15). Entre las moléculas capaces de activar esta vía, además de citocinas proinflamatorias y factores de crecimiento, se incluyen **hormonas, neurotransmisores, inmunoglobulinas y antígenos** (Marone *et al.*, 2008).

La vía de la PI3K/Akt está implicada en distintas funciones celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, supervivencia y migración. Además participa en el crecimiento e hipertrofia de condrocitos, donde se relaciona con el factor de transcripción **Runx2** (Fujita *et al.*, 2004). También se relaciona con otras vías inducidas por mediadores proinflamatorios, como la vía de las **MAPK** (Beier y Loeser, 2010). Citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 o TNF $\alpha$ , y factores de crecimiento como PDGF o TGF $\beta$ , inducen la expresión de mediadores inflamatorios y de degradación del cartílago en condrocitos y SF de AR y OA, mediante esta vía. Además es importante para el desarrollo y función de linfocitos T y B, así como para la migración de neutrófilos y mastocitos, en procesos inflamatorios. Entre estos mediadores se incluyen **citocinas** proinflamatorias como IL-6 o IL-8, **proteinasas** como las MMP-1, MMP-3 o MMP-13, y **quimiocinas** como CCL2 (Hwang *et al.*, 2004; Litherland *et al.*, 2008; Marone *et al.*, 2008; Rosengren *et al.*, 2010). Por otra parte, esta vía está implicada en la síntesis de la MEC del cartílago, incluyendo el colágeno tipo II y proteoglicanos (Beier y Loeser, 2010). Alteraciones en esta vía se relacionan con el desarrollo de ciertas patologías como es el caso de la OA, donde se ha observado un aumento de la expresión de inhibidores de Akt (Cravero *et al.*, 2009). Por

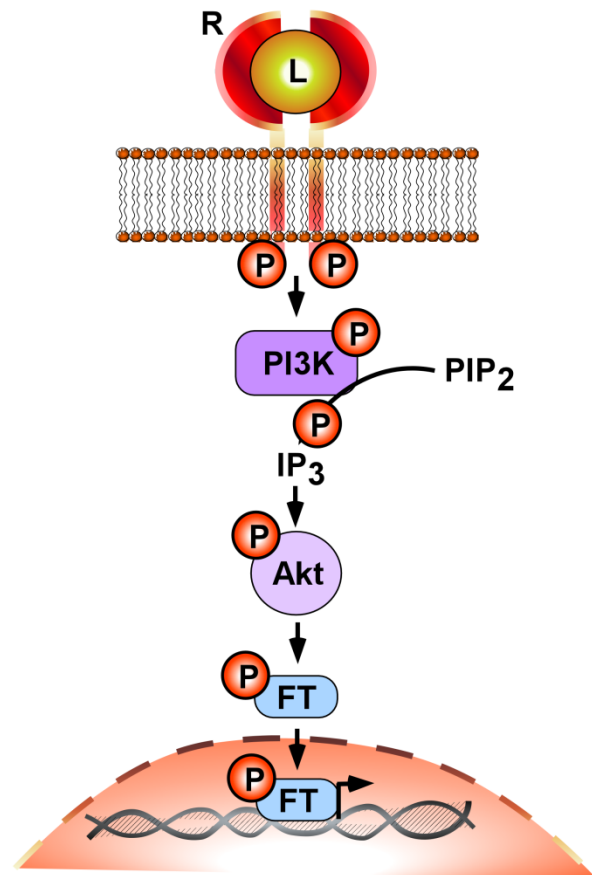


Figura 15. Esquema de la vía de señalización de PI3K/Akt mediada por receptores tirosina quinasa. L, ligando (citocinas, factores de crecimiento); R, receptor tirosina quinasa; FT, factor de transcripción.

otro lado, una activación exacerbada de esta vía desencadena una respuesta antiapoptótica y proliferativa que se relaciona con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer (Davies *et al.*, 2000; Oudit *et al.*, 2004).

### 6.3. NF- $\kappa$ B

La familia del factor de transcripción NF- $\kappa$ B está compuesta por cinco miembros que pueden formar homodímeros o heterodímeros capaces de unirse al ADN, iniciando así procesos de transcripción: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- $\kappa$ B1), y p52/p100 (NF- $\kappa$ B2). NF- $\kappa$ B se encuentra inactivo en el citoplasma en forma de complejo formado por dos de sus subunidades unidas a la proteína inhibidora de NF- $\kappa$ B

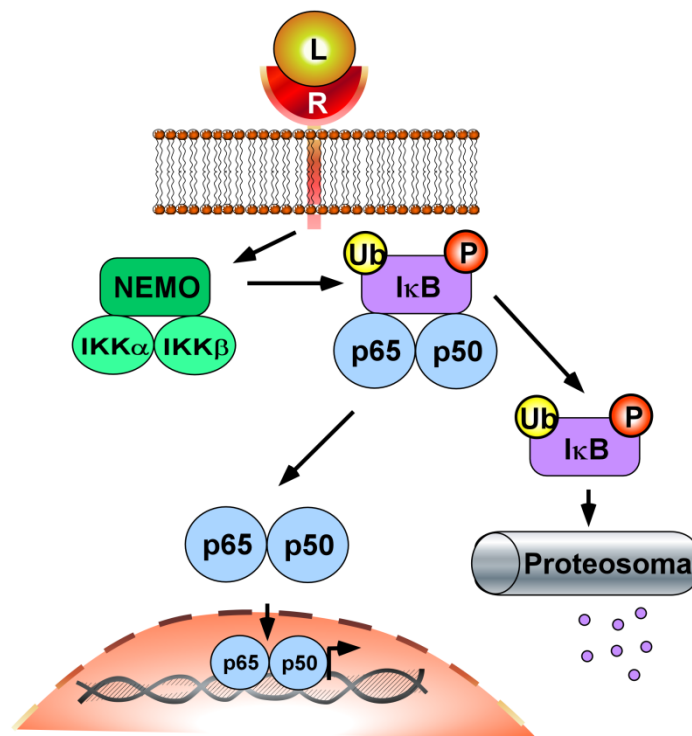


Figura 16. Esquema de la vía canónica de NF- $\kappa$ B. L, ligando; R, receptor de membrana; FT, factor de transcripción.

(I $\kappa$ B). La quinasa de I $\kappa$ B (IKK) es la encargada de su activación. El complejo IKK consta de dos serin-treonin quinasas, IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , unidas a NEMO (IKK $\gamma$ ), quien regula la transmisión de señales a IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ , además de estabilizar su unión. Por otro lado, existen inhibidores de esta vía, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , capaces de unirse a NF- $\kappa$ B en el citoplasma, impidiendo su translocación al núcleo y la transcripción de los genes diana. P100 y p105 pueden también actuar como inhibidores de NF- $\kappa$ B. Por último, I $\kappa$ B $\zeta$  y Bcl-3 son proteínas otras proteínas relacionadas con I $\kappa$ B, capaces de estimular o inhibir a NF- $\kappa$ B (Marcu *et al.*, 2010).

Esta familia está implicada en la regulación del desarrollo y diferenciación celular, así como en el crecimiento y supervivencia de las células, tanto en condiciones

fisiológicas como en cáncer, así como en la respuesta inflamatoria y mecanismos de estrés. La **vía clásica o canónica** del NF- $\kappa$ B, relacionada con la respuesta inflamatoria, implica al heterodímero formado por las subunidades **p65/p50**. En esta vía, el complejo IKK fosforila y ubiquitina a I $\kappa$ B, induciendo su degradación por el proteosoma y dejando libres a p65/p50 para su translocación al núcleo, donde se une al sitio **κB** en la región promotora de los genes diana, iniciando así la transcripción (Figura 16). En la OA y AR esta vía se relaciona con la señalización mediada por **TLRs**, incluyendo TLR2, TLR3, TLR4 y TLR7, así como con la estimulación por **IL1- $\beta$**  y **fibronectina** (Carrion *et al.*, 2011; Marcu *et al.*, 2010; Scanzello *et al.*, 2008; Stylianou y Saklatvala, 1998; Su *et al.*, 2005; Yasuda, 2006). La activación de NF- $\kappa$ B da lugar a la producción de mediadores de inflamación y destrucción entre los que se encuentran **MMPs**, incluyendo las MMP-1, -3, -9 y -13, **ADAMTS**, como las ADAMTS-4 y -5, **uPA**, **citocinas** como IL-1 $\beta$ , IL-6 o TNF $\alpha$ , **moléculas de adhesión** y otros mediadores inflamatorios como **NO**, **AGEs**, **COX-2** o **PGE2** (Bondeson *et al.*, 2007; Bondeson *et al.*, 2008; Marcu *et al.*, 2010; Tobar *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014). Además de incrementar la expresión de **Wnt** (Lee y Heur, 2014) e inducir mediadores implicados en otras vías de señalización, incluyendo  **$\beta$ -catenina** y **Runx2** (Ji *et al.*, 2016; Marcu *et al.*, 2010).

Por otro lado, la **vía alternativa o no canónica** del NF- $\kappa$ B implica principalmente a **IKK $\alpha$** . A diferencia de la vía clásica, esta vía parece participar en la modulación de la inflamación, atenuando el proceso inflamatorio agudo. Por otro lado, IKK $\alpha$  puede también inducir la expresión de genes diana de la vía clásica en respuesta a determinadas señales extracelulares, pudiendo ejercer tanto efectos **antiinflamatorios** como **proinflamatorios**. La vía no canónica también participa en procesos de supervivencia, proliferación, diferenciación celular y **osteoclastogénesis**, así como en la diferenciación de **condrocitos en OA** hacia un **fenotipo hipertrófico** (Marcu *et al.*, 2010; Olivotto *et al.*, 2013; Shiotani *et al.*, 2002).

En los últimos años se han abordado diferentes estrategias para el bloqueo de la vía de NF- $\kappa$ B en diversas patologías inflamatorias y reumáticas, aunque su estudio en la OA se encuentra aún en sus primeras etapas. Estudios en modelos animales de AR,

han mostrado tener efectos beneficiosos en el proceso inflamatorio, así como en la degradación del cartílago. Por otro lado, ciertos fármacos usados en el tratamiento de la OA, como AINEs, corticoides, DMOADs y diacereína, han demostrado ser efectivos en la disminución de la activación de NF-κB. Además, estudios con ARNs de interferencia pequeños (siRNAs) y estrategias de terapia génica, han mostrado resultados prometedores. Sin embargo, aún es necesario profundizar en el estudio de inhibidores específicos que inhiban selectivamente el NF-κB o alguno de los componentes de su vía en el tejido dañado, evitando efectos adversos (Domagala *et al.*, 2006; Marcu *et al.*, 2010; Roman-Blas y Jimenez, 2006).

#### 6.4. AP-1

AP-1 es un factor de transcripción compuesto por dos subunidades de la familia de las proteínas **Fos** (c-Fos, FosB, Fra-1 y -2), **Jun** (c-Jun, JunB y JunD), que pueden formar heterodímeros y, en el caso de Jun, homodímeros, entre ellas y con proteínas de la familia del factor activador de la transcripción (**TRAF**). La conformación de AP-1 está regulada mediante **fosforilación** por quinasas, entre las que destacan las **MAPK** o la proteína quinasa A (**PKA**), promoviendo la unión de **AP-1** al elemento de respuesta al 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) (**TRE**), principalmente, aunque diferentes dímeros se pueden unir a distintos elementos en el ADN, incluyendo al elemento de respuesta al AMP cíclico (**CRE**), iniciando la transcripción de sus genes diana (Karin, 1995; Subbaramaiah *et al.*, 2002; Zenz *et al.*, 2008). AP-1 está también relacionado con otras rutas de señalización, como la vía de **Wnt** (Bengoa-Vergniory y Kypta, 2015; Zenz *et al.*, 2008) o el factor de transcripción Runx2 (Vimalraj *et al.*, 2015). Existen diferentes mediadores capaces de activar esta vía, entre los que se incluyen los **Fn-fs** y citocinas como la **IL-1β**, además de **neurotransmisores**, **hormonas**, **factores de crecimiento**, mediadores de **estrés** y **PAMPs** (Karin, 1995; Stylianou y Saklatvala, 1998; Tremble *et al.*, 1995; Zenz *et al.*, 2008).

AP-1 está implicado en el desarrollo de diferentes enfermedades inflamatorias crónicas, donde desempeña un papel esencial en la expresión de **citocinas** proinflamatorias como IL-1, IL-6, IL-12 o TNFα, así como en la señalización por **TLRs** e

**integrinas** (Carrion *et al.*, 2011; Tremble *et al.*, 1995; Zenz *et al.*, 2008). Es por ello uno de los principales factores de transcripción implicados en la AR participando en procesos de **osteoclastogénesis** y en la producción de **MMPs** como MMP-1, -9, -13 y -14 (Asahara *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2001; Shiozawa y Tsumiyama, 2009; Zenz *et al.*, 2008). La estimulación de SF con IL-1 $\beta$  o TNF $\alpha$  *in vitro*, produce un incremento de MMPs asociado a AP-1, principalmente a c-Fos y c-Jun. Niveles elevados de estos componentes se han observado en la membrana sinovial de pacientes de AR y OA, estando implicado en el proceso inflamatorio y de destrucción. AP-1 está implicado en la liberación de **citocinas** y otros mediadores inflamatorios desde SF, así como en la producción de **proteinasas** y en procesos de **estrés oxidativo** en condrocitos (Alaeddine *et al.*, 1999; Boileau *et al.*, 2005; Carrion *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2015; Shiozawa y Tsumiyama, 2009; Shiozawa *et al.*, 2011; Zenz *et al.*, 2008).

El estudio de la vía de AP-1 es interesante para la búsqueda de inhibidores específicos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y reumáticas como la OA. Experimentos en animales KO han demostrado cierta especificidad de célula y tejido en algunos de los componentes de esta vía, algunos de los cuales están implicados en el desarrollo de enfermedades inflamatorias como la AR o la psoriasis. Además en modelos murinos de artritis inducida por colágeno (CIA), el bloqueo de componentes AP-1 muestra efectos beneficiosos, reduciendo los niveles de citocinas proinflamatorias y MMPs. En la OA, algunos de los efectos beneficiosos obtenidos con determinados fármacos, como los glucocorticoides, la diacereína o la licofelona, se deben en parte a su actuación sobre la vía de AP-1, observándose con este último una disminución de la síntesis de MMPs y un incremento de componentes esenciales de la MEC, como el colágenos tipo II o el agregano. Por otro lado es también importante el estudio del bloqueo de proteínas quinasas que activan este factor de transcripción (Adcock *et al.*, 1994; Aikawa *et al.*, 2008; Boileau *et al.*, 2005; Domagala *et al.*, 2006; Karin, 1995; Zenz *et al.*, 2008).

## 6.5. CREB

CREB forma parte de una superfamilia de factores de transcripción que contienen un elemento estructural distintivo denominado cremallera de leucina, de la que también forman parte el factor de transcripción activador (ATF) y el modulador del elemento de respuesta al AMP cíclico (CREM).

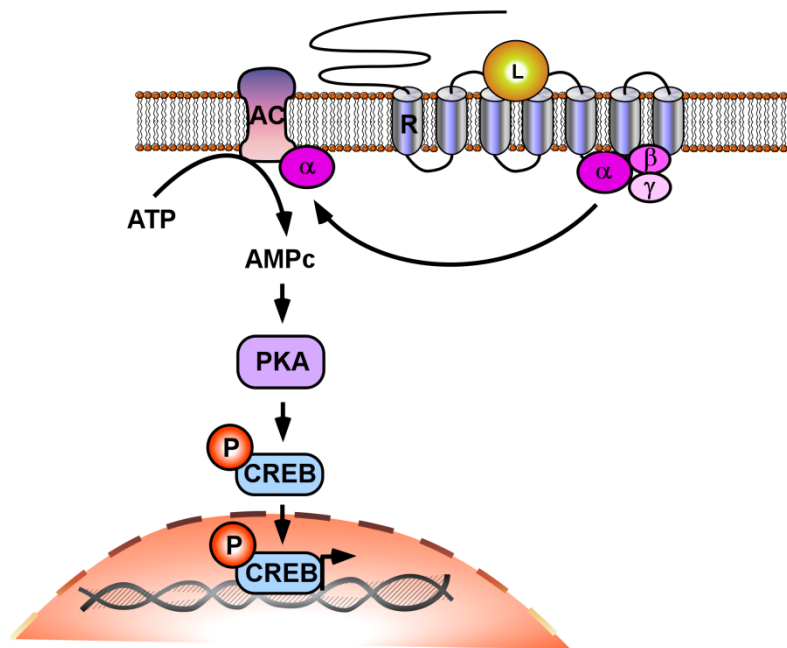


Figura 17. Esquema de la vía de activación de CREB dependiente de AMPc. L, ligando; R, receptor GPCR.

CREB se expresa de

manera ubicua y constante en el organismo. En su estructura posee una región de unión al ADN (**bZIP**), encargada también de su dimerización, donde además se encuentra el motivo cremallera de leucina, y una región de activación. Para que se produzca la activación de CREB es necesaria su **fosforilación**. La región de activación posee a su vez un dominio central de fosforilación por **PKA**, además de otras regiones susceptibles de ser fosforiladas por otras moléculas. Esta fosforilación conlleva un cambio estructural de CREB que, además de promover la expresión génica, ayuda al reclutamiento de los coactivadores **CBP** y **p300**. Una vez activado, CREB se puede unir como homo- o heterodímero a **CRE**, iniciando la transcripción de sus genes diana (Taleisnik, 2006). Entre las proteínas con las que CREB puede formar dímeros se encuentran miembros de la familia de **AP-1** (Lopez-Bergami *et al.*, 2010).

Se conocen diferentes vías de señalización capaces de activar a CREB. La ruta principal es la vía dependiente del adenosín monofosfato cíclico (**AMPc**). Existen ligandos específicos capaces de unirse a **GPCRs**. Esta unión promueve la liberación de AMPc por parte de la adenilato ciclasa (**AC**), activando así a la **PKA**, quien a su vez

fosforila a **CREB** activándolo. Esta activación promueve su unión CRE, activando la transcripción de sus genes diana (Figura 17). Otra vía implicada en la activación de CREB es la vía **Ca<sup>2+</sup>/calmodulina**, activada por estímulos capaces de aumentar el Ca<sup>2+</sup> intracelular. Por último, existen ciertos factores de crecimiento que, mediante su unión a receptores tirosina quinasa, activan diferentes cascadas de señalización, como la vía **Ras/ERK** o la vía **PI3K/Akt**, capaces de promover también la transcripción de genes por parte de CREB (Taleisnik, 2006; Xue *et al.*, 2015).

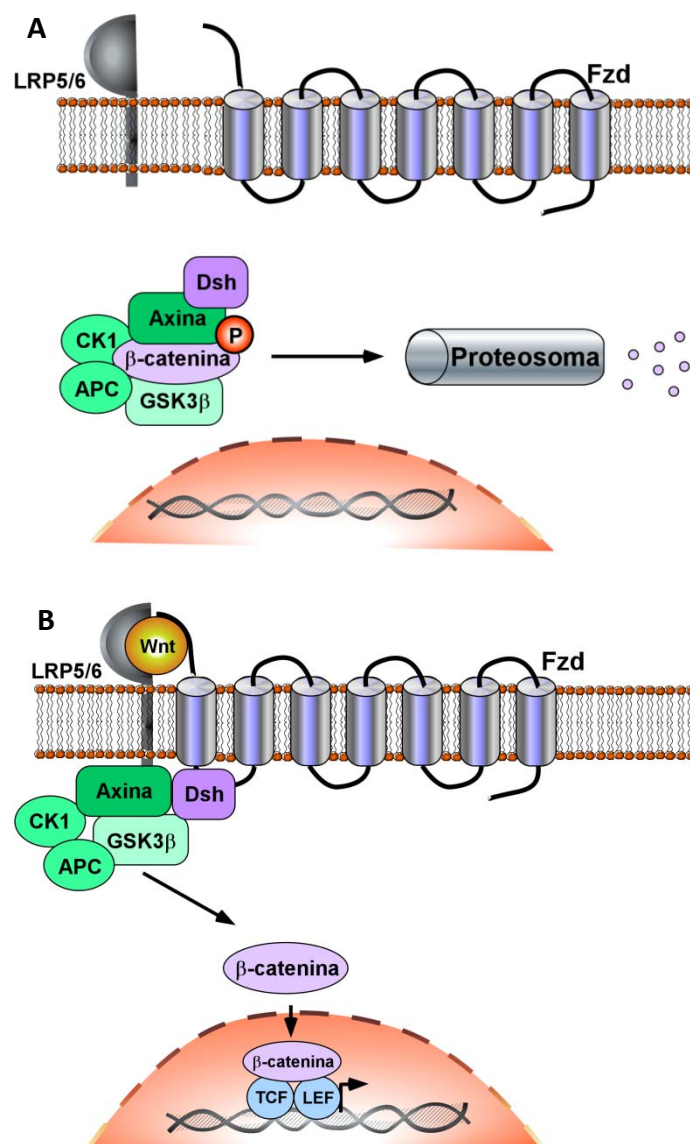
El factor de transcripción CREB está implicado en la proceso inflamatorio y patogénico de la OA y la AR, promoviendo la síntesis de **mediadores proinflamatorios**, como **COX-2** o **PGE2**, en SF, condrocitos y osteoblastos (McEvoy *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2006; Vaillancourt *et al.*, 2007) además de diversas **quimiocinas** y **citocinas**, como IL-1 $\beta$ , IL-6 o IL-8 (Dou *et al.*, 2013; Stylianou y Saklatvala, 1998; Zhao *et al.*, 2014a). CREB es además capaz de inducir la producción de **proteinasas** como MMP-13 (Boileau *et al.*, 2005; Bui *et al.*, 2012) y la **apoptosis** en condrocitos (Xue *et al.*, 2015), contribuyendo a la progresión de la enfermedad. Inhibidores de COX y LOX, como la licofelona, ejercen sus efectos en parte mediante la inhibición de CREB, reduciendo además la producción de MMP-13 (Boileau *et al.*, 2005). Por otro lado, CREB puede ejercer también **efectos antiinflamatorios** mediante la activación de **GPCRs**, inhibiendo la transcripción mediada por NF- $\kappa$ B y c-Jun, así como la producción de mediadores proinflamatorios, e induciendo la liberación de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 (Delgado *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 1999b; Kambayashi *et al.*, 1995; Strassmann *et al.*, 1994).

## 6.6. Wnt/ $\beta$ -catenina

**Wnt** pertenece a una familia de glicoproteínas secretadas. Ejerce sus efectos a través de la unión a *Frizzled* (**Fzd**), un receptor GPCR con siete dominios transmembrana. En humanos se han identificado 19 tipos de proteínas Wnt y 10 tipos de receptores Fzd diferentes. La señalización de Wnt se puede producir a través de dos vías: la **vía canónica**, dependiente de  **$\beta$ -catenina**, y la **vía no canónica**, implicada en la regulación de la primera y en osteogénesis. Esta última incluye otras rutas entre las

que se encuentran la vía del  $\text{Ca}^{2+}$ , la vía de la **PKA** y **CREB**, o la vía de las **MAPK**, incluyendo p38 y JNK, que activan otros factores de transcripción como **Runx2** o **AP-1** (Bengoa-Vergniory y Kypta, 2015; Corr, 2008; Shahnazari *et al.*, 2008; Zenz *et al.*, 2008). Aunque también se ha descrito la implicación de la vía canónica en la activación de Runx2 en osteogénesis (Gaur *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007). Entre estas vías de señalización, la **vía canónica** está implicada en diferentes enfermedades, entre las que se encuentra la **OA** (Corr, 2008; van den Bosch *et al.*, 2015; van der Kraan y van den Berg, 2012).

La  **$\beta$ -catenina** se localiza en el citoplasma de forma inactiva unida a un complejo oligomérico formado por la caseína quinasa 1 (**CK1**), la poliposis adenomatosa coli (**APC**), la **axina** y la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (**GSK3 $\beta$** ), que **fosforilan** a la  **$\beta$ -catenina** en el extremo N-terminal, para su degradación proteolítica por el proteosoma. Este complejo se encuentra asociado a la proteína *Disheveled* (**Dsh**), implicada en la activación de la  **$\beta$ -catenina**. Dicha activación precisa de la unión de Wnt a su receptor Fzd y sus correceptores, las proteínas relacionadas con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad tipo 5 y 6 (**LRP5/6**), lo que promueve el



**Figura 17. Esquema de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.** A. En ausencia de Wnt, la  $\beta$ -catenina es fosforilada y degradada por el proteosoma. B. La unión de Wnt a Fzd induce la activación de la vía y la liberación de la  $\beta$ -catenina.

desplazamiento de la axina y Dsh hacia Fzd y LRP5/6, el bloqueo de la fosforilación y la liberación de la  $\beta$ -catenina. La  $\beta$ -catenina desfosforilada, libre en el citoplasma, se transloca al núcleo donde interacciona con el factor derivado de células T (**TCF**) y el factor de unión al potenciador linfóide (**LEF**), promoviendo la expresión de los genes diana (Bengoa-Vergniory y Kypta, 2015; Corr, 2008; Shahnazari *et al.*, 2008) (Figura 17). Existen **inhibidores** naturales que participan en la regulación de esta vía que incluyen proteínas secretadas relacionadas con Fzd (**sFRP**), el factor inhibidor de Wnt (**Wif1**) y la proteína *Cerberus* (**Cer1**), que se unen a Wnt, y las proteínas *Dickkopf* (**Dkk**) y la **esclerostina**, que se unen a los correceptores LRP5/6 (Corr, 2008; Escobar-Gómez *et al.*, 2009; Shahnazari *et al.*, 2008).

La familia de Wnt está implicada en la regulación del crecimiento, diferenciación y muerte celular durante la embriogénesis, así como en la formación de la articulación sinovial y en el mantenimiento de la homeostasis del cartílago y hueso en el adulto. Esta vía está relacionada además con el cáncer y su participación en la OA ha ido adquiriendo mayor importancia en los últimos años (Beyer y Schett, 2010; Corr, 2008; Guo *et al.*, 2004; Luyten *et al.*, 2009; Shahnazari *et al.*, 2008). En la OA, Wnt están involucrados en procesos **anabólicos** que confluyen en la generación de nuevo hueso, originando la formación de **osteofitos** y **esclerosis** subcondral. Por otro lado, Wnt también contribuye al proceso **catabólico**, promoviendo la **hipertrofia de los condrocitos** y la degradación del cartílago y el hueso, principalmente mediante la expresión de proteinasas en SF y condrocitos, entre las que se incluyen **ADAMTS**, como las ADAMTS-4 y -5, y **MMPs**, como las MMP-3, -9 y -13 (Beyer y Schett, 2010; Blom *et al.*, 2009; Corr, 2008; Hopwood *et al.*, 2007; Ning *et al.*, 2012; Papathanasiou *et al.*, 2012; Weng *et al.*, 2012; Yuasa *et al.*, 2008), además de regular la expresión de otras moléculas como **CD44** o **fibronectina** (Bielefeld *et al.*, 2011; Corr, 2008; De Langhe *et al.*, 2005; Sen *et al.*, 2002). Se han observado niveles elevados de componentes de esta vía, incluyendo Wnt,  $\beta$ -catenina y sus genes diana, en cartílago y membrana sinovial de pacientes de OA y RA, así como una baja expresión de esclerostina (Blom *et al.*, 2009; Dell'Accio *et al.*, 2008; Imai *et al.*, 2006; Tornero-Esteban *et al.*, 2015; van den Bosch *et al.*, 2015). Además, niveles elevados de Dkk1 y sFRP3 en el suero de estos pacientes se relacionan con una mejor progresión de la

enfermedad (Lane *et al.*, 2007). Polimorfismos en los genes que codifican para diferentes componentes de la vía canónica de Wnt así como para sus inhibidores, se han visto relacionados con el desarrollo de OA, como es el caso de LRP5 o sFRP3 (Loughlin *et al.*, 2004; Urano *et al.*, 2007).

Debido a la implicación de la vía canónica de Wnt en diversas patologías, se está incrementando el interés en el estudio de inhibidores selectivos de esta vía para el desarrollo de nuevos fármacos. Entre ellos se encuentran inhibidores de la secreción de Wnt como IWP-2 y Wnt-C59, estabilizadores de la anexina como IWR-1 y XAV939, e inhibidores del complejo  $\beta$ -catenina/TCF como iCRT-14 (Alcaraz *et al.*, 2010; Bengoa-Vergniory y Kypta, 2015).

## 6.7. Runx2

Runx pertenece a la familia de factores de transcripción altamente conservados, que comparten un dominio común **Runt** de unión al ADN. La familia de Runx está compuesta por tres miembros: Runx1, Runx2 (también conocido como AML3, CBFA1 o PEBP2Aa) y Runx3, implicados principalmente en hematopoyesis, osteogénesis y condrogénesis, y en el desarrollo gastrointestinal y neuronal, respectivamente (Owens *et al.*, 2014; van der Kraan y van den Berg, 2012; Vimalraj *et al.*, 2015). El gen de Runx2 posee ocho regiones exónicas, con diferentes dominios activos, y dos regiones promotoras (P1 y P2), que pueden dar lugar a dos isoformas distintas. Runx2 puede formar heterodímeros con el factor de unión central beta (**CBF $\beta$** )/proteína de unión al potenciador del poliovirus 2 beta (**PEBP2 $\beta$** ), que actúa como coactivador de la transcripción. La regulación de Runx2 tiene lugar mediante diferentes modificaciones posttraslacionales, entre las que cabe destacar la fosforilación, que suele llevarse a cabo en el núcleo por la MAPK ERK (Vimalraj *et al.*, 2015). Entre las rutas de señalización implicadas en la regulación de Runx2 se incluyen la vía de las **MAPK**, la vía **PI3K/Akt**, la vía de la **PKA** o la vía de **Wnt**, además de factores de transcripción, como **AP-1**, **NF $\kappa$ B** o **STAT1**, que interactúan con Runx2 regulando su actividad (Hovhannisyan *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015a; Saito *et al.*, 2013; Shahnazari *et al.*, 2008; Vimalraj *et al.*, 2015).

Runx2 está implicado también en hipertrofia de condrocitos y vasculogénesis, así como en el desarrollo de metástasis en hueso a partir de cáncer de mama y de malformaciones óseas (Bruderer *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015a; Owens *et al.*, 2014; van der Kraan y van den Berg, 2012; Vimalraj *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2014). Debido a su participación en osteogénesis y condrogénesis, Runx2 emerge como una potencial diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades óseas y articulares, entre las que se encuentran la OA, donde está involucrado en la hipertrofia de condrocitos y la degradación articular (Owens *et al.*, 2014; van der Kraan y van den Berg, 2012; Vimalraj *et al.*, 2015). Runx2 no sólo se expresa en condrocitos y osteoblastos sino también en otras células articulares, incluyendo a los SF. Su expresión se encuentra elevada en el cartílago de OA, contribuyendo a la patología de la enfermedad mediante la **hipertrofia de condrocitos** y la producción de proteinasas que promueven la **degradación del cartílago**, entre las que se encuentran **MMPs** como la MMP-13 y **ADAMTS** como las ADAMTS-4, -5, -7 y -12 (Chen *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2016; Saito *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2009; Tetsunaga *et al.*, 2011; Thirunavukkarasu *et al.*, 2006; Thirunavukkarasu *et al.*, 2007; van der Kraan y van den Berg, 2012). Runx2 está implicada en funciones vitales y diversas dependiendo del tipo celular, interaccionando con diferentes proteínas y vías de señalización. El estudio de las mismas, así como de microARNs (miRNAs) que participan en la regulación de Runx2, es importante en el desarrollo de terapias para el tratamiento de enfermedades óseas y articulares (Vimalraj *et al.*, 2015).

## **7. LA ARTRITIS REUMATOIDE**

Dado que en el presente trabajo incluiremos algunas aportaciones relativas a la AR, describiremos brevemente algunos aspectos relacionados con la enfermedad (Figura 18).

## 7.1. Epidemiología y clínica

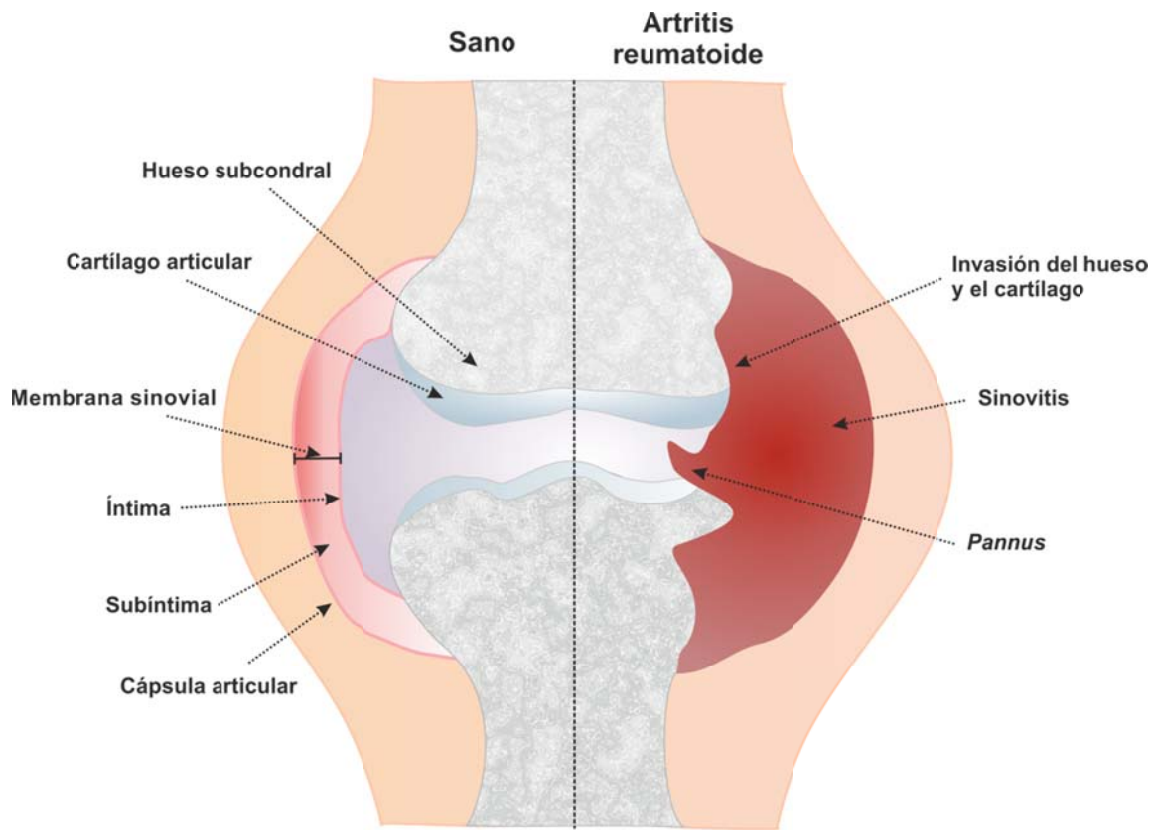


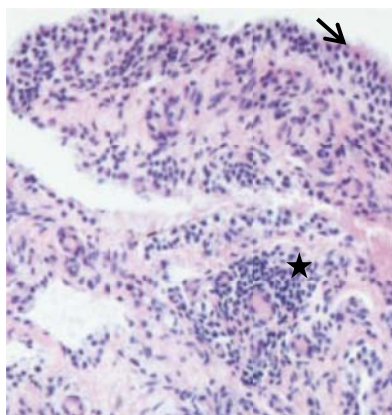
Figura 18. Representación esquemática de una articulación sinovial sana (izq.) y alteraciones en la articulación artrítica (dcha.).

La AR es una de las enfermedades reumáticas más comunes. Se define como una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune sistémica y poliarticular, que afecta principalmente las articulaciones diartrodiales de manera simétrica. Se caracteriza por los síntomas de dolor, rigidez, tumefacción, inflamación y daño articular, mediada por mecanismos inmunes. La incidencia de la AR en Europa es de 20-30 casos por 100.000 por año y su prevalencia mundial oscila entre el 0.5% y el 1%, aumentando con la edad hasta los 70 años, con un pico de enfermedad entre los 30 y 55 años. Es tres veces más frecuente en mujeres que en hombres y su frecuencia también aumenta en zonas urbanas frente a las áreas rurales. La primera manifestación suele ser la tumefacción matutina de las articulaciones pequeñas en manos y pies, acompañada de dolor, fatiga, debilidad muscular y pérdida de apetito, que progresivamente puede ir afectando a otras articulaciones más grandes, así como a las articulaciones cervicales de manera simétrica. Existen, además, otras manifestaciones extraarticulares como la

aparición de nódulos reumatoides, pleuritis, pericarditis, vasculitis, amiloidosis o manifestaciones oculares entre otras (Blanco *et al.*, 2007; Cañete *et al.*, 2008; EULAR, 2009; Noss y Brenner, 2008).

## 7.2. La articulación sinovial y el sinoviocito fibroblástico en la artritis reumatoide

El proceso inflamatorio juega un papel esencial en la AR. Los cambios histológicos que afectan a la articulación pueden ser detectados en etapas muy tempranas de la enfermedad. La inflamación de la membrana sinovial o **sinovitis** es un rasgo característico de la enfermedad, que conlleva una **hiperplasia** sinovial como consecuencia del aumento de la proliferación de los **SM** y **SF** del **lining**, y de la **infiltración** de células inflamatorias en el **sublining** (Figura 19). Entre estas células se encuentran linfocitos T, principalmente CD4<sup>+</sup> (Th1 y Th17), linfocitos B, células plasmáticas, CDs, macrófagos, neutrófilos y mastocitos. A todo ello se suman procesos de **angiogénesis** e **hipoxia**. Este proceso inflamatorio es similar al descrito en la OA, aunque de mayor grado (Bartok y Firestein, 2010; Cañete *et al.*, 2008; Lubberts, 2010). La membrana sinovial se convierte en hipertrófica, presentando capacidad invasiva y un incremento de células inmunocompetentes. Este tejido sinovial hipertrófico se denomina **pannus** y está compuesto principalmente por SF invasivos, además de SM, osteoclastos y algunos linfocitos. El **pannus** se extiende hacia el cartílago y el hueso articulares, invadiendo el cartílago y erosionando el hueso (Bartok y Firestein, 2010).



- Hiperplasia de la íntima sinovial
- ★ Infiltrado inflamatorio de la subíntima sinovial

**Figura 19.** Imagen histológica de una membrana sinovial de AR. Tinción Hematoxilina-Eosina. (Imagen obtenida de Bondeson *et al.*, 2010).

En este contexto, el **SF** juega un papel esencial en el inicio y perpetuación de la enfermedad adquiriendo un fenotipo patogénico promovido, tanto por mediadores inflamatorios liberados en el microambiente articular, donde cabe destacar la IL-1 $\beta$  y el TNF $\alpha$ , como por mutaciones o cambios epigenéticos en el propio SF, asemejándose a las células tumorales, con un aumento en su proliferación, migración y capacidad invasiva (Bartok y Firestein, 2010; Bottini y Firestein, 2013; Lefevre *et al.*, 2009; Muller-Ladner *et al.*, 1996). A este fenotipo invasivo se suma el hecho de que los SF de AR incrementan la liberación de factores angiogénicos, como **VEGF**; moléculas de adhesión, como **ICAM-1** o **VCAM-1**; mediadores inflamatorios, como las citocinas **IL-1**, **IL-6**, **IL-8**, **TNF $\alpha$**  o **GM-CSF**; quimiocinas, como **CCL2**; prostaglandinas, como **PGE2**, y factores de crecimiento, como el **FGF** o **PDGF**. Estos SF aumentan, además, la producción de enzimas de degradación, incluyendo colagenasas, como **MMP-1** o **MMP-13**, y agreganasas, **ADAMTS-4** y **-5**, favoreciendo la destrucción articular (Bartok y Firestein, 2010; Bottini y Firestein, 2013; Noss y Brenner, 2008).

### 7.3. Etiología y fisiopatología

A pesar de que en la actualidad se desconoce la etiología de la AR, se piensa que posee un origen multifactorial, en el que estarían implicados tanto factores genéticos como ambientales (Firestein, 2003). Entre los **factores genéticos** asociados a la patología se incluyen los subtipos alélicos **DR1** y **DR4** del gen HLA de clase II DRB1. Por otro lado, las **infecciones** o el **tabaquismo** como importantes **factores ambientales** que también influirían en el desarrollo de la enfermedad.

En el inicio de la AR son importantes los mecanismos de la **inmunidad innata**, ya que la activación de **SF** y **SM** está mediada por la interacción de **PAMPs** e **inmunocomplejos** con sus receptores **TLRs**, incluyendo TLR2, TLR3, TLR4 y TLR7, y **FcRs**, induciendo una serie de vías de señalización entre las que se destacan la vía de las **MAPK** y los factores de transcripción **NF- $\kappa$ B**, **AP-1**, y la vía de las quinasa Janus (**JAK**) y el transductor de señal y activador de transcripción (**STAT**). La activación de estas rutas induce la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo **citocinas**, **quimiocinas** y **factores de crecimiento** y, en consecuencia, una **reacción inflamatoria**

en la membrana sinovial, conocida como **sinovitis**. La liberación de dichos mediadores activa, a su vez, mecanismos de **inmunidad adaptativa** mediante el reclutamiento de otras poblaciones celulares, incluyendo **linfocitos T y B**, hacia el lugar de inflamación. Como consecuencia se origina un **infiltrado inflamatorio** en el que se ha descrito la producción de **autoanticuerpos**, entre los que se encuentran el factor reumatoide (**FR**), anticuerpos antipéptido citrulinado (**anti-CCP o ACPA**) y **anticolágeno**. La activación de todos estos mecanismos perpetúa la sinovitis y promueve la liberación de **enzimas de degradación** desde las células activadas, **cronificando** la enfermedad y originando una destrucción articular (Bartok y Firestein, 2010; Blanco *et al.*, 2007; Cañete *et al.*, 2008; Carrion *et al.*, 2011; Noss y Brenner, 2008; Okamoto *et al.*, 2008; Sweeney y Firestein, 2004).

## **8. LOS NEUROPEPTIDOS COMO MEDIADORES NEUROINMUNES**

### **8.1. Neuroinmunomodulación**

El término neuroinmunomodulación surge en 1987 con Spector (Spector, 1987), quien acuña esta palabra para referirse a la ciencia que estudia las interacciones existentes entre los sistemas **nervioso** y **endocrino** (o neuroendocrino), con el sistema **inmune** (Gomariz *et al.*, 2006; Vidal Gómez, 2006). Estos sistemas se consideran los principales responsables de las respuestas adaptativas en el organismo y se encuentran en continua comunicación para el mantenimiento de la homeostasis (Elenkov *et al.*, 2000). De esta manera se traen al presente ideas de antiguas civilizaciones de Egipto, Grecia, India o China, en la que se pensaba que la mente estaba involucrada en la defensa del cuerpo frente a la enfermedad (Gomariz *et al.*, 2006). El interés en el papel de la neuroinmunomodulación en las patologías inflamatorias se ha incrementado a partir de los años 90, adquiriendo gran importancia en la búsqueda de posibles dianas terapéuticas para su tratamiento (Straub *et al.*, 2013).

Durante el proceso inflamatorio de la sinovitis, se establecen una serie de interacciones entre los sistemas nervioso, endocrino e inmune, en los que **neurotransmisores**, incluyendo **neuropéptidos**, **hormonas** y **citocinas**, juegan un importante papel (Cutolo *et al.*, 2007). De esta forma se establece una comunicación bidireccional mediante la cual mediadores inflamatorios modulan vías nerviosas que indican la existencia de un proceso inflamatorio al resto de organismo y, a su vez, los neuropéptidos regulan la liberación local de dichos mediadores (Cutolo *et al.*, 2007; Sternberg, 2006). En este contexto, la influencia del sistema nervioso simpático (SNS) y las fibras nerviosas sensoriales es esencial en el proceso inflamatorio, principalmente en la fase crónica de la enfermedad. Las **fibras nerviosas simpáticas eferentes** llegan a la membrana sinovial, procedentes del sistema nervioso central (SNC), acompañando a los vasos sanguíneos y se ramifican en el tejido circundante. Mientras que las **fibras nerviosas sensoriales aferentes** salen desde el tejido sinovial inflamado hacia el SNC acompañando a grandes grupos de nervios (Cutolo *et al.*, 2007). En la sinovitis el SNS ejerce un papel dual. Mientras que al inicio de la enfermedad el SNS promueve el proceso inflamatorio, estimulando la migración, activación y extravasación de células hacia el foco inflamatorio, además de activar proteasas y nociceptores; en fases avanzadas posee un papel principalmente antiinflamatorio, inhibiendo la producción de ciertos mediadores. En la fase crónica de la sinovitis, además, la presencia de fibras simpáticas disminuye en el tejido sinovial, predominando las fibras sensoriales, que promueven la inflamación (Cutolo *et al.*, 2007; Straub *et al.*, 2013).

Entre las moléculas que participan en la neuroinmunomodulación de las enfermedades reumáticas, destacan las **hormonas sexuales**, andrógenos y estrógenos, que podrían explicar la mayor incidencia de estas patologías en mujeres. También es destacable la **melatonina**, que se relaciona con los ritmos circadianos que influyen en la sintomatología de la enfermedad (Cutolo *et al.*, 2007; Straub *et al.*, 2013). Además, la **sustancia P** y fragmentos derivados de su degradación parecen tener efectos sobre los SF y condrocitos, induciendo la liberación de mediadores proinflamatorios que contribuyen a la patología (Sutton *et al.*, 2009). Por otro lado, existen ciertas hormonas y neuropéptidos que se muestran como potenciales herramientas terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo patologías reumáticas. Entre ellos

destacan **ligandos de GPCRs de clase B**, entre los que se encuentran el péptido intestinal vasoactivo (**VIP**) y el factor liberador de corticotropina (**CRF**) (Couvineau y Laburthe, 2011; Sutton *et al.*, 2009) (Tabla 7, adaptada de Cuvineau y Laburte, 2011).

Ligando	Patología	Referencia
<b>VIP</b>	Inflamación y autoinmunidad Neurodegeneración Cáncer	(Abad <i>et al.</i> , 2003; Juarranz <i>et al.</i> , 2005) (Gozes <i>et al.</i> , 2003) (Vacas <i>et al.</i> , 2013a; Vacas <i>et al.</i> , 2013b)
<b>PACAP</b>	Inflamación Neurodegeneración	(Abad <i>et al.</i> , 2001) (Gozes <i>et al.</i> , 2003)
<b>GHRF</b>	Dwarfismo	(Campbell <i>et al.</i> , 1995)
<b>Glucagon</b>	Diabetes	(Brubaker, 2007)
<b>GLP-1</b>	Diabetes	(Brubaker, 2007)
<b>GLP-2</b>	Síndrome del intestino corto	(Jeppesen, 2006)
<b>GIP</b>	Diabetes	(Inzucchi y McGuire, 2008)
<b>CRF</b>	Estrés Inflamación	(Gilligan y Li, 2004) (Smith, 2008; Tsatsanis <i>et al.</i> , 2007a)

## 8.2. Péptido intestinal vasoactivo (VIP)

### 8.2.1. Caracterización y distribución

Descrito en 1969 por Said y Mutt en pulmón (Said y Mutt, 1969) y aislado por primera vez en 1970 del intestino delgado porcino (Mutt y Said, 1974), VIP es uno de los neuropéptidos más estudiados por su carácter multifuncional y pleiotrópico. Aunque originalmente se clasificó como una hormona gástrica, investigaciones posteriores confirmaron su implicación en la regulación de diversas actividades biológicas. VIP puede actuar como neurotransmisor, inmunorregulador, vasodilatador o secretagogo (Delgado y Ganea, 2011; Dickson y Finlayson, 2009; Gomariz *et al.*, 2001; Gomariz *et al.*, 2006), lo que le convierte en una potencial herramienta

terapéutica para el tratamiento de diversas patologías (Couvineau and Laburthe, 2011; Dinsmore et al., 1999; Gozes et al., 2003; Haghjoo et al., 1996; Petkov et al., 2003; Vacas et al., 2013) (Tabla 8).

Tabla 8. PRINCIPALES ACCIONES DE VIP	
FISIOLÓGICAS	FISIOPATOLÓGICAS
<b>A corto plazo</b>	<b>Efectos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secreciones exocrinas</li> <li>• Liberación de hormonas</li> <li>• Relajación muscular</li> <li>• Regulación metabólica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antiinflamatorio</li> <li>• Inmunomodulación</li> <li>• Neuroprotección</li> <li>• Analgesia</li> <li>• Vasodilatación y broncodilatación</li> <li>• Proliferación celular</li> </ul>
<b>A largo plazo</b>	<b>Aplicaciones terapéuticas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ritmos circadianos</li> <li>• Regulación del desarrollo cerebral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedades inflamatorias</li> <li>• Enfermedades autoinmunes</li> <li>• Enfermedades neurodegenerativas</li> <li>• Trastornos psiquiátricos</li> <li>• Cáncer</li> <li>• Disfunción eréctil</li> <li>• Hipertensión pulmonar</li> </ul>

VIP posee una amplia distribución. Se expresa tanto en el SNC como periférico, liberándose en diferentes órganos a través de las fibras nerviosas que los inervan. Entre estos órganos se incluye el corazón, pulmón, riñón, tiroides y los tractos gastrointestinal y urogenital, además de órganos del sistema inmune como bazo, timo, nódulos linfáticos y médula ósea (Delgado y Ganea, 2011). Además de por las neuronas, VIP es producido por células endocrinas e inmunes. La importancia de VIP en el **sistema inmune** surge en 1990, con su detección en linfocitos (Gomariz *et al.*, 1990). En este sistema, VIP modula, tanto de forma autocrina como paracrina, procesos de inmunidad innata y adquirida, teniendo un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis como inmunomodulador (Delgado *et al.*, 2002; Gomariz *et al.*, 2001; Gomariz *et al.*, 2006). Actualmente se sabe que, en el sistema inmune, VIP puede ser liberado tanto desde fibras nerviosas como por diferentes células inmunes en respuesta a diversos estímulos, como mediadores inflamatorios,

antigénicos o apoptóticos. Entre las células inmunes capaces de producir VIP se incluyen timocitos, linfocitos T y B, mastocitos, neutrófilos y eosinófilos (Gomariz *et al.*, 2001; Gomariz *et al.*, 2006). Aunque la función principal de VIP parece ser la antiinflamatoria, VIP posee un papel dual, pudiendo ejercer tanto efectos inhibidores como activadores (Abad *et al.*, 2010; Abad *et al.*, 2012b; Fernandez-Martinez *et al.*, 2010), dependiendo del microambiente, del tipo celular y del receptor al que se una, así como de la concentración del péptido (Delgado *et al.*, 2002; Gomariz *et al.*, 2001; Gomariz *et al.*, 2006).

### 8.2.2. Gen, regulación y procesamiento de VIP

El gen del VIP humano se clonó por primera vez en 1985 y se encuentra localizado en el cromosoma 6. Consta de 8837 pares de bases (pb) organizadas en 6 intrones y 7 exones, que codifican para diferentes dominios funcionales (Bodner *et al.*, 1985; Gozes *et al.*, 1986; Tsukada *et al.*, 1985) (Figura 20).

	Exón 1	Exón 2	Exón 3	Exón 4	Exón 5	Exón 6	Exón 7
<b>Región codificante</b>	Región 5'-UTR	Péptido señal	Extremo N-terminal	PHM	VIP	Extremo C-terminal	Región 3'-UTR
<b>pb</b>	165	117	123	105	132	89	723

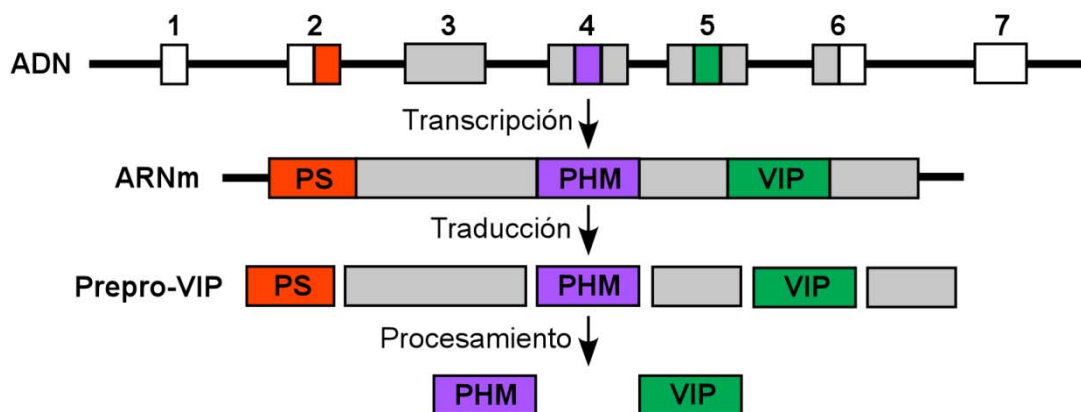


Figura 20. Estructura del gen de VIP. Transcripción, traducción y procesamiento del precursor de VIP.

La transcripción y traducción del gen de VIP da lugar a un precursor de 170 aminoácidos (aa) denominado **prepro-VIP**. El posterior procesamiento postranslacional de este precursor, origina un pro-péptido de 148 aa que, tras su procesamiento por

prohormonas convertidas, da lugar al péptido se conoce como **VIP**. Además de VIP, a partir del precursor se genera otro péptido de 27 aa denominado **PHM** (Bodner *et al.*, 1985; Dickson y Finlayson, 2009; Tsukada *et al.*, 1985). La estructura primaria de VIP posee una secuencia de 28 aa y un peso molecular de 3.326 Da. Se trata de una molécula de naturaleza básica y con carácter anfipático (Filizola *et al.*, 1997). La secuencia aminoacídica de VIP se encuentra altamente conservada en la filogenia de los vertebrados, siendo idéntica en distintas especies de mamíferos, incluyendo humano, vaca, rata, cabra, conejo, cerdo y perro (Dickson y Finlayson, 2009).

Existen diversos mecanismos que participan en la **regulación** de la expresión génica de VIP, en la que principalmente están implicadas secuencias reguladoras altamente conservadas, situadas en la región 5' del gen, entre las que se incluyen:

- Elemento regulador de la expresión dependiente de tejido (**TSE**) de 425pb, de unión a proteínas como Oct-1 y -2 (proteínas de homeodominios POU)(Hahm y Eiden, 1998a; Hahm y Eiden, 1998b).
- Elemento **AP-1/ets** estimulador y un elemento **VSE-1** silenciador (Liu *et al.*, 2001).
- Elemento de respuesta acetato de forbol miristato (**PMA**) de 7pb (Liu *et al.*, 2001).
- **Regiones B** con cajas E o hexámeros (CACCTG y CATGTG) y **regiones C y D** represoras (Hahm y Eiden, 1998a; Hahm y Eiden, 1998b).
- Elemento **CRE** de 17pb de respuesta a AMPc (Ohsawa *et al.*, 1985; Tsukada *et al.*, 1987). La proteína quinasa C (PKC) parece también parece estar implicada en dicha regulación, promoviendo la transcripción de VIP (Hahm y Eiden, 1996; Ohsawa *et al.*, 1985).
- Elemento **CyRE** de 180 pb de respuesta a citocinas, sensible a mediadores como el factor neurotrófico ciliar o el factor inhibidor de leucemia, de unión a STAT y AP-1 (Dickson y Finlayson, 2009; Symes *et al.*, 1994).

Además de estos elementos de regulación, el gen de VIP puede sufrir modificaciones postranscripcionales, donde tienen gran importancia mecanismos que

intervienen en la estabilización de la molécula de ARN mensajero (ARNm) (Sachs y Wahle, 1993; Wolford y Signs, 1995).

### 8.2.3. Familia de VIP

VIP pertenece a una familia de hormonas y neuropéptidos estructuralmente relacionados, con una secuencia altamente conservada a lo largo de la evolución, lo que sugiere un origen común a partir de un mismo gen ancestral. En esta familia también se incluyen el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (**PACAP**)**27** y **PACAP28**, la **helodermina**, el péptido histidina metionina (**PHM**), la **secretina**, el factor liberador de la hormona del crecimiento (**GHRF**), el **glucagón**, los péptidos relacionados con el glucagón (**GLP**)-**1** y **-2** y el péptido inhibidor gástrico (**GIP**), (Couvineau y Laburthe, 2011; Delgado y Ganea, 2011; Dickson y Finlayson, 2009) (Figura 21).

Péptido	Secuencia aa	Nº aa
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSILN	28
PACAP27	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL	27
PACAP28	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVLGKRYKQRVK NK	38
Helodermina	HSDAIFTEEYSKLLAKLALQKYLASILGSRTSPPP	35
PHM	HADGVFTSDFSKLLGQLSAKKYLES LM	27
Secretina	HSDG TFTSELSR LREGARLQRLQLGLV	27
GHRF	YADAYFTNSYR KVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL	44
Glucagon	HSQGTFTSDYS KYLDSRRAQDFVQWLMNT	29
GLP-1	HAEGTFTSDVS SYLEGQAAKEFIWLVKGR	30
GLP-2	HADGSFSDEMNTI LDNLAARDFINWLIQTKITD	33
GIP	YAE GTFISDYS IAMDKIHQQDFVNWLLAQKGGKNDWKHNITQ	42

Figura 21. Comparación de secuencias de los péptidos de la familia de VIP. La identidad de secuencia aparece marcada en verde y la homología de secuencia en morado (Figura modificada de Couvineau y Laburthe 2011).

Además de la homología en su secuencia, las proteínas de esta familia comparten otra serie de características, algunas de las cuales se describen a continuación (Dickson y Finlayson, 2009):

- El péptido precursor está conformado por un péptido señal, de 1 a 3 péptido bioactivos y péptidos N- y C-terminales.
- El péptido maduro consta de una secuencia lineal de 25 a 50 aa.

- Comparten características comunes en sus estructuras primaria y secundaria, con estructuras espirales al azar en el extremo N-terminal y extensas regiones  $\alpha$ -helicoidales en el C-terminal.
- Las regiones N- y C-terminal están implicadas en la actividad biológica de los péptidos y en el reconocimiento del receptor.
- Pueden poseer giros  $\beta$  hidrofóbicos en su extremo N-terminal, implicadas para en la afinidad por el receptor.

Esta familia posee una amplia distribución en los sistemas nervioso, endocrino e inmune, ejerciendo una gran diversidad de funciones biológicas, la mayoría de las cuales está mediada por la señalización mediante GPCRs (Dickson y Finlayson, 2009). La alta conservación de su secuencia, la amplia distribución y la gran variedad de funciones que ejercen, ponen de manifiesto la gran relevancia del papel que estas proteínas juegan en el organismo.

#### 8.2.4. Receptores de VIP

VIP ejerce sus efectos a través de su unión a receptores **GPCRs de clase B o clase II**. Esta subfamilia de receptores GPCR está compuesta por 15 miembros, entre los que se encuentran los receptores para los miembros de la familia de VIP, así como receptores para otras moléculas no relacionadas con él, como el CRF. Estos receptores tienen una gran importancia en diversas patologías humanas. Pueden además sufrir procesos de *splicing* alternativo, que afectan a la afinidad por el ligando y las vías de señalización. Los GPCRs de tipo B tienen una baja homología con otros miembros de la superfamilia y poseen una serie de características comunes y otras propias de la subfamilia (Couvineau y Laburthe, 2011; Couvineau y Laburthe, 2012; Dickson y Finlayson, 2009; Furness *et al.*, 2012; Laburthe *et al.*, 2007) (Figura 22):

- Siete dominios transmembrana (TM1-7) conectados por tres bucles extracelulares (EC1-3) y tres bucles intracelulares (IC1-3), encargados de regular la interacción con la proteínas G.
- Un dominio N-terminal extracelular largo con más de 120 residuos, principal encargado en la unión al ligando.

- Seis residuos de cisteína altamente conservados en el extremo N-terminal conectados por tres puentes disulfuro, que contribuyen a mantener la conformación espacial del receptor.
- Un péptido señal hidrofóbico, implicado en la inserción a la membrana plasmática.
- Varios sitios de glicosilación altamente conservados en el extremo N-terminal, implicados en el transporte del receptor.
- Ausencia de motivos arquetípicos de los GPCRs de clase A.
- Compleja organización génica con diversos intrones.

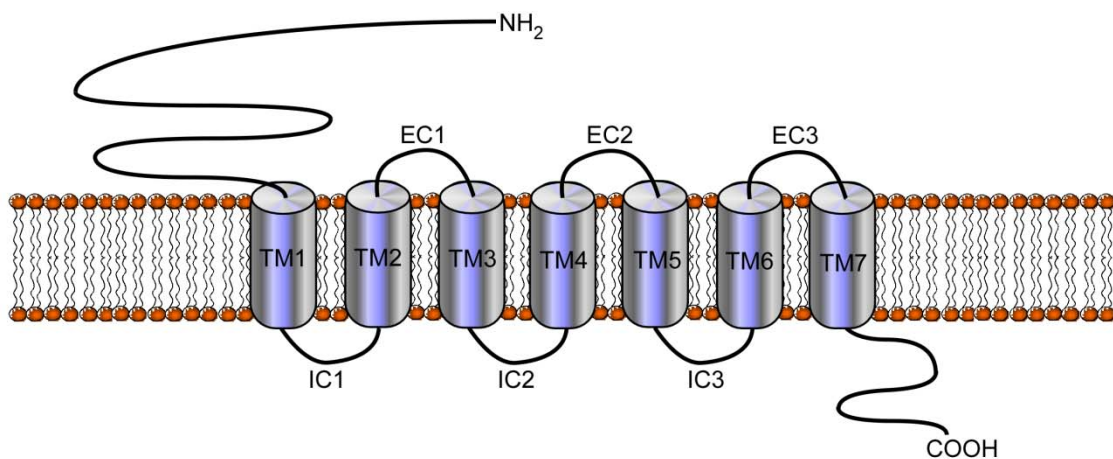
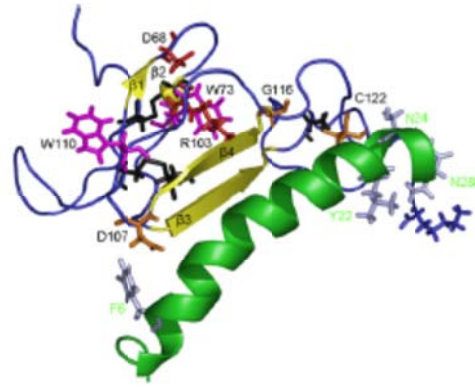


Figura 22. Representación esquemática de la estructura de los GPCRs.

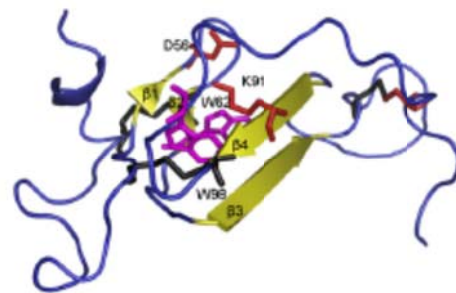
Los receptores de VIP fueron descubiertos en 1970 y clonados en los años 90. Estos GPCRs se localizan en la membrana plasmática de diferentes poblaciones celulares, tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos (Laburthe *et al.*, 2007), aunque recientemente se ha descrito su presencia intranuclear (Gobeil *et al.*, 2006; Valdehita *et al.*, 2010). Existen tres tipos de receptores de VIP y PACAP:

- El receptor para VIP y PACAP tipo I (**VPAC1**) (Figura 23), también llamado VIP1, VIP/PACAP tipo II o PVR2, une VIP y PACAP con la misma afinidad (Dickson y Finlayson, 2009; Laburthe *et al.*, 2007). Su gen se encuentra localizado en el cromosoma 3 en humanos y consta de 22kb, distribuidas en 13 exones y 12 intrones (Laburthe y Couvineau, 2002). VPAC1 se expresa en diferentes localizaciones del SNC y en numerosos órganos y tejidos periféricos, incluyendo riñón, próstata, pecho, bazo, pulmón, mucosa del tracto gastrointestinal y en la mayoría de tejidos epiteliales (Dickson y Finlayson, 2009). Respecto a las células del sistema inmune, se expresa constitutivamente en linfocitos, monocitos, macrófagos, CDs y timocitos (Gomariz *et al.*, 2001; Gomariz *et al.*, 2006; Jimeno *et al.*, 2014; Jimeno *et al.*, 2015).



**Figura 23. Modelo estructural de VPAC1 unido a VIP.** La cadena principal del receptor se muestra en azul, las láminas  $\beta$  en amarillo, los puentes disulfuro en negro, los anillos aromáticos en rosa y VIP en verde (Imagen obtenida de Laburthe *et al.*, 2007).

- El receptor para VIP y PACAP tipo II (**VPAC2**) (Figura 24), también conocido como VIP2, VIP/PACAP tipo III o PVR3, une VIP y PACAP con la misma afinidad, aunque une VIP con menos afinidad que VPAC1 (Dickson y Finlayson, 2009; Laburthe *et al.*, 2007; Usdin *et al.*, 1994). En humanos su gen se encuentra situado en el cromosoma 7, constituido por 13 exones y 12 intrones (Laburthe *et al.*, 2002; Mackay *et al.*, 1996). Al igual que VPAC1, posee una amplia distribución en el SNC, aunque la distribución de ambos suele ser complementaria. En tejidos periféricos se expresa predominantemente en la musculatura lisa y en vasos sanguíneos, pero también en otras localizaciones incluyendo páncreas, pulmón, retina, mucosa intestinal,



**Figura 24. Modelo estructural de VPAC2.** La cadena principal del receptor se muestra en azul, las láminas  $\beta$  en amarillo, los puentes disulfuro en negro, los anillos aromáticos en rosa y VIP en verde (Imagen obtenida de Laburthe *et al.*, 2007).

tiroides y médula adrenal (Dickson y Finlayson, 2009). En células del sistema inmune es inducible en linfocitos y macrófagos (Gomariz *et al.*, 2001; Gomariz *et al.*, 2006; Jimeno *et al.*, 2014; Jimeno *et al.*, 2015).

- El receptor de PACAP (**PAC1**) (Figura 25), también llamado VIP/PACAP tipo I o PVR1, presenta mayor afinidad por PACAP (Dickson y Finlayson, 2009; Laburthe *et al.*, 2007). El gen de PAC1 se localiza en el cromosoma 7 humano y consta de 15 exones y 14 intrones (Brabet *et al.*, 1996). Posee una amplia distribución en el SNC y en tejidos



**Figura 25. Modelo estructural de PAC1.** La cadena principal del receptor se muestra en azul, las láminas  $\beta$  en amarillo, los puentes disulfuro en negro, los anillos aromáticos en rosa y VIP en verde (Imagen obtenida de Laburthe *et al.*, 2007).

periféricos se expresa en tejido tales como la médula adrenal, pituitaria, intestino, útero y testículos (Dickson y Finlayson, 2009). En el sistema inmune se expresa únicamente en macrófagos y monocitos (Gomariz *et al.*, 2001; Gomariz *et al.*, 2006).

Los receptores VPAC pueden además **homodimerizar** o **heterodimerizar** entre sí, así como con otros miembros de la familia VIP/secretina o con proteínas modificadoras de la actividad del receptor (**RAMPs**), induciendo vías de señalización diferentes (Couvineau y Laburthe, 2011; Couvineau y Laburthe, 2012; Christopoulos *et al.*, 2003; Laburthe *et al.*, 2007; Langer *et al.*, 2006; Langer y Robberecht, 2007; Wootten *et al.*, 2013).

Existen diferentes mecanismos implicados en la **regulación** de los receptores de VIP, entre los que se incluyen:

- **Desensibilización homóloga** por fosforilación mediada por proteínas quinasas de los GPCRs (**GRKs**) (Mahavadi *et al.*, 2013; Shetzline *et al.*, 2002).
- **Desensibilización heteróloga** mediada por **PKA** o **PKC** (Shetzline *et al.*, 2002)
- **Internalización** mediada por **arrestinas** (Couvineau y Laburthe, 2012; Krupnick y Benovic, 1998; Mahavadi *et al.*, 2013).

- **Modificaciones transcripcionales** mediadas por **hormonas y citocinas** (Kakurai *et al.*, 2001; Pei, 1996).
- También se ha descrito la presencia de **miRNAs** que modulan la expresión de VPAC1 (Paladini *et al.*, 2014).

### 8.2.5. Vías implicadas en la señalización de VIP

En la vía canónica, la unión de VIP a sus receptores desencadena un cambio conformacional del receptor que permite la unión de los dominios citoplásmicos con proteínas G heterotriméricas, promoviendo el intercambio de GDP por GTP en la subunidad **G $\alpha$** , disociándose del dímero **G $\beta\gamma$** . Esta disociación desencadena la activación de diferentes vías de señalización que, finalmente, modulan la actividad de diferentes factores de transcripción. El subtipo de proteína G con la que interacciona el receptor va a determinar las diferentes rutas de señalización activadas (Laburthe y Couvineau, 2002; Langer, 2012). Entre las vías implicadas en la señalización de VIP se incluyen (Figura 26):

- **La vía de la AC**, es la principal vía activada por VIP, en la que están implicadas proteínas **G $\alpha$ s**. El acoplamiento a las proteínas G $\alpha$ s activa a la **AC**, la cual, mediante la producción de **AMPc**, activa a la **PKA** (Delgado *et al.*, 2002; Langer, 2012). Esta activación promueve a su vez la señalización de la **MAPK-ERK**, que induce procesos de proliferación y diferenciación (Gutierrez-Canas *et al.*, 2005; Le Pechon-Vallee *et al.*, 2000). Esta vía es la principal implicada en los efectos **antiinflamatorios** de VIP, mediante la inducción de la transcripción de **CREB** y la inhibición de **c-Jun**, generando la producción de citocinas antiinflamatorias e inhibiendo la expresión de mediadores proinflamatorios (Delgado *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 2002; Delgado y Ganea, 2011; Juarranz *et al.*, 2005; Langer, 2012). La vía de la AC también se relaciona con la **PI3K** (Gutierrez-Canas *et al.*, 2005).
- **La vía de la fosfolipasa C (PLC)**, en la que están implicadas principalmente proteínas **G $\alpha$ q/G $\alpha$ i**. Estas proteínas G activan a la **PLC**, generando la hidrólisis del **PIP<sub>2</sub>** y produciendo **IP<sub>3</sub>** y diacilglicerol (**DAG**). El DAG activa a la **PKC**,

mientras que el  $IP_3$ , promueve la liberación del  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplásmico, aumentando el  $Ca^{2+}$  intracelular. Asimismo, el dímero  $G\beta\gamma$  también puede activar canales de  $Ca^{2+}$  en superficie, induciendo también la activación de la PLC (Dickson y Finlayson, 2009; Langer, 2012). Por otro lado, existen también estudios que indican que las vías del AMPc y del  $Ca^{2+}$  se encuentran interrelacionadas (Hagen *et al.*, 2006). Esta vía también es capaz de inducir efectos antiinflamatorios, inhibiendo la transcripción por parte de **NF- $\kappa$ B** (Delgado *et al.*, 1998; Delgado *et al.*, 2002; Juarranz *et al.*, 2005).

- La señalización de VIP también puede estar mediada por otras rutas de señalización, entre las que se incluye la vía de la fosfolipasa D (PLD), que puede ser activada por VPAC1 y VPAC2 (Dickson y Finlayson, 2009; Langer, 2012).
- Interacciones de VPAC1 y VPAC2 con proteínas de interacción con GPCRs (GIPs), entre las que se incluyen las RAMPs, activan vías de señalización no canónicas (Couvineau y Laburthe, 2011; Couvineau y Laburthe, 2012).
- Estudios recientes ponen de manifiesto la relación de la señalización mediada por VIP y PACAP con rutas de señalización implicadas en procesos de condrogénesis y osteogénesis, como el factor de transcripción **Runx2** o las vías de **Wnt/ $\beta$ -catenina**, de **Hedgehog** y de la proteína morfogenética ósea (**BMP**) (Juhász *et al.*, 2015).

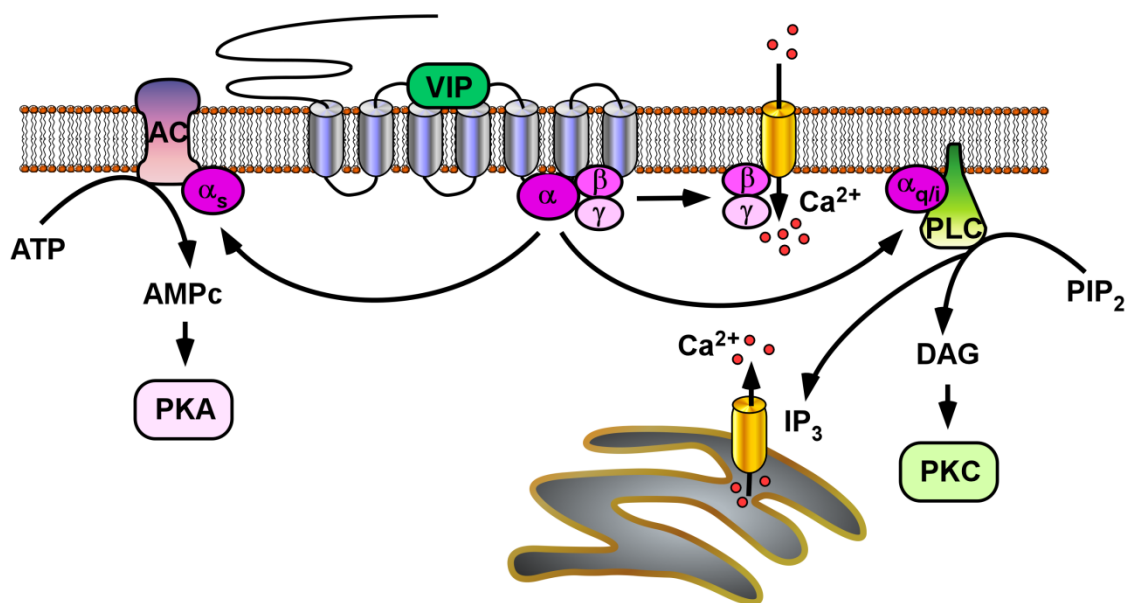


Figura 26. Principales vías implicadas en la señalización de VIP.

### 8.2.6. VIP en inflamación y enfermedades reumáticas

La amplia distribución de VIP y sus receptores, así como la multitud de procesos fisiológicos en los que se encuentra implicado, hacen que se perfile como un potencial agente terapéutico para el tratamiento de diversas patologías, entre las que se incluyen la impotencia sexual, el cáncer, enfermedades neurológicas como el Alzheimer o el Parkinson, o patologías vasculares como el infarto cerebral o la hipertensión pulmonar (Couvineau y Laburthe, 2011; Dinsmore *et al.*, 1999; Dogrukol-Ak *et al.*, 2004; Gozes *et al.*, 1996; Korkmaz *et al.*, 2010; Petkov *et al.*, 2003; Vacas *et al.*, 2013b). Además de su potencial terapéutico en estas patologías, en los últimos años VIP se ha identificado como un neuropéptido claramente **antiinflamatorio**, capaz de modular diferentes mediadores. Diversos estudios *in vitro* y modelos animales *in vivo* han demostrado su papel antiinflamatorio. Debido a su carácter pleiotrópico y a su capacidad de actuación incluso en fases avanzadas de la enfermedad, VIP se postula como un claro candidato para el diseño de medicamentos dirigidos al tratamiento de **patologías inflamatorias y autoinmunes** tales como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la esclerosis múltiple, la diabetes autoinmune, la sarcoidosis o el choque séptico (Abad *et al.*, 2003; Abad *et al.*, 2006; Abad *et al.*, 2012a; Gomariz *et al.*, 2006; Prasse *et al.*, 2010; Rosignoli *et al.*, 2006). El papel antiinflamatorio de VIP en el sistema inmune queda reflejado en su capacidad para inhibir diferentes acciones proinflamatorias como la migración, adhesión y proliferación de linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares, la actividad fagocítica de macrófagos o la acción de células NK. VIP además inhibe la producción de inmunoglobulinas, quimiocinas, citocinas proinflamatorias y otros mediadores inflamatorios como el NO. Por otro lado, VIP induce la liberación de citocinas antiinflamatorias, influye en el balance de células T (Delgado *et al.*, 1999b; Delgado *et al.*, 2002; Gomariz *et al.*, 2001; Leceta *et al.*, 2007) y modula la señalización mediada por TLRs (Arranz *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008b; Carrion *et al.*, 2011; Gutierrez-Canas *et al.*, 2006).

Entre las enfermedades inflamatorias y autoinmunes en las que VIP ha demostrado tener efectos beneficiosos, se incluyen **enfermedades reumáticas** como

la **AR** o la **OA**. En estas patologías, el efecto **antiinflamatorio** de VIP es el resultado de diferentes mecanismos de acción:

- En el modelos animales de AR, disminuye la frecuencia y retrasa el inicio de la enfermedad, reduce la sintomatología y previene el daño articular (Delgado *et al.*, 2001; Juarranz *et al.*, 2005).
- Regula el balance Th1/Th2, incrementando la respuesta Th2 mediante la reducción de interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e incrementando la IL-4 (Delgado *et al.*, 1999a; Delgado *et al.*, 2002; Gomariz *et al.*, 2001).
- Reduce el perfil patogénico de las células Th17 (Jimeno *et al.*, 2015; Leceta *et al.*, 2007).
- Disminuye los niveles de autoanticuerpos anticógeno (Delgado *et al.*, 2002).
- Reduce mediadores proinflamatorios incluyendo quimiocinas como MIP-2, MIP1- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , CCL2, CXCL8 o RANTES (regulador de la activación de células T normalmente expresadas y secretadas o CCL5), citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23, TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$ , además de otros mediadores inflamatorios como NO y alarminas (Carrion *et al.*, 2013; Carrion *et al.*, 2014; Delgado *et al.*, 2002; Gutierrez-Canas *et al.*, 2006; Juarranz *et al.*, 2004).
- Incrementa citocinas antiinflamatorias como IL-10 o IL-1Ra (Delgado *et al.*, 1999b; Delgado *et al.*, 2002).
- Disminuye la síntesis de MMPs (Carrion *et al.*, 2011; Carrion *et al.*, 2014; Delgado *et al.*, 2002).
- Modula la señalización de TLRs, incluyendo TLR2, TLR3, TLR4 y TLR7 (Arranz *et al.*, 2008a; Carrion *et al.*, 2011; Gomariz *et al.*, 2010; Gutierrez-Canas *et al.*, 2006).
- Induce la transcripción mediada por CREB e inhibe la MAPK JNK y c-Jun, de manera AMPc dependiente, y NF- $\kappa$ B, vía AMPc independiente (Delgado *et al.*, 1998; Juarranz *et al.*, 2005).

En la AR y la OA se observa además la presencia de VIP en el suero y el líquido sinovial de los pacientes (Lygren *et al.*, 1986). Asimismo, VIP también parece estar implicado en los procesos de remodelación ósea que tienen lugar en estas patologías,

aunque existen resultados contradictorios acerca de los efectos del péptido (Juarranz *et al.*, 2005; Persson y Lerner, 2011), que pueden ser debidos a las distintas vías de señalización activadas.

Tanto en AR como en OA, los efectos antiinflamatorios de VIP pueden estar en parte promovidos por sus efectos sobre el **SF**, como se demuestra en diversos estudios *in vitro* (Carrion *et al.*, 2011; Carrion *et al.*, 2013; Carrion *et al.*, 2014; Gutierrez-Canas *et al.*, 2006; Juarranz *et al.*, 2004). Dichos SF expresan VIP, siendo mayor su expresión en OA que en AR. En cuanto a sus receptores, los SF de **OA** expresan preferentemente **VPAC1**, mientras que los de **RA** expresan más **VPAC2**, el cual parece estar más implicado en los efectos antiinflamatorios del péptido. En ninguno de los dos tipos de SF se ha detectado la presencia del receptor PAC1 (Juarranz *et al.*, 2008). Por otro lado, también se han relacionado **alteraciones en los receptores** de VIP con el desarrollo de patologías reumáticas. Pacientes de OA, AR y espondilitis anquilosante, presentan bajos niveles de VPAC1 y una respuesta a VIP deficiente. Estudios recientes han descrito además una asociación entre la pérdida de expresión de VPAC1 con una mayor gravedad de la enfermedad en pacientes de artritis de reciente comienzo (Seoane *et al.*, 2016). Esta reducida expresión se asocia, además, con ciertos polimorfismos del gen de VPAC1 en RA (Delgado *et al.*, 2008; Juarranz *et al.*, 2008; Paladini *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2006). Asimismo, pacientes de esclerosis múltiple presentan una baja expresión de VPAC2 (Sun *et al.*, 2006).

Estudios recientes asocian también los niveles de VIP con la **progresión de las enfermedades reumáticas**. En pacientes de OA, los niveles de VIP en líquido sinovial y cartílago están inversamente relacionadas con la progresión del daño articular (Jiang *et al.*, 2012). Asimismo, en espondiloartritis y artritis de reciente comienzo, los niveles basales de VIP en suero son menores en los pacientes con peor pronóstico. Este hecho apunta también al uso de VIP como un potencial biomarcador pronóstico y de severidad de la enfermedad (Gonzalez-Alvaro *et al.*, 2015; Martinez *et al.*, 2014; Seoane *et al.*, 2015).



las funciones cognitivas (Kuperman y Chen, 2008). En el SNC forma parte del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (**HPA**), encargado de inducir regular la función adrenal. Neuronas del núcleo paraventricular del **hipotálamo** liberan **CRF** en respuesta a estímulos centrales y periféricos, llegando a la **pituitaria anterior** a través de la circulación portal, donde estimula la expresión de proopiomelanocortina (**POMC**). La rotura proteolítica de POMC da lugar a la generación de la hormona adrenocorticotropa (**ACTH**), que es liberada a la circulación sistémica, llegando a la **corteza adrenal** donde induce la síntesis y liberación de **glucocorticoides**, principalmente cortisol. A su vez fibras nerviosas del SNS inervan el propio eje HPA y el CRF también se expresa en las glándulas adrenales o suprarrenales, existiendo un circuito regulador intra-adrenal. Por otro lado, niveles altos de cortisol y de ACTH pueden inhibir la liberación de CRF desde el hipotálamo, y el cortisol, la liberación de ACTH desde la glándula pituitaria, y viceversa, niveles bajos promueven su liberación, regulando así el propio eje HPA (Tsatsanis *et al.*, 2007b) (Figura 27).

Además de su expresión en el SNC y su papel en la regulación del estrés, CRF también se expresa en diversos tejidos periféricos, pudiendo ejercer diferentes efectos de manera autocrina y paracrina, interviniendo en diversas funciones fisiológicas y patofisiológicas. En 1990 se detectó por primera vez la presencia de CRF en células del **sistema inmune** (Stephanou *et al.*, 1990). Entre los órganos del sistema inmune que expresan CRF se incluyen el timo, el bazo y nódulos linfáticos. También se ha detectado la presencia de CRF en la membrana sinovial. Además de la expresión a nivel local, el CRF se libera en estos órganos a través de las fibras nerviosas simpáticas que los inervan (Baigent, 2001; Bileviciute *et al.*, 1997; Crofford *et al.*, 1993). La expresión de péptidos de la familia de CRF se ha descrito también en distintas células del sistema inmune, incluyendo linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos, mastocitos y fibroblastos, además de células epiteliales (Baigent, 2001; Fekete y Zorrilla, 2007; Kempuraj *et al.*, 2004; Ottaviani *et al.*, 1998; Smith, 2008; Tsatsanis *et al.*, 2007b). Aunque estas células expresan CRF constitutivamente a bajos niveles, factores de estrés como la hipoxia, hipotermia o hiperosmolaridad, así como mediadores inflamatorios como la IL-1, la IL-6 o el TNF $\alpha$ , pueden promover su liberación, tanto a nivel local como en el eje HPA (Baigent, 2001; Smith, 2008; Tsatsanis *et al.*, 2007b). Por otro lado, macrófagos

residentes y células de la médula adrenal son también capaces de producir mediadores inflamatorios, como citocinas o prostaglandinas, en la propia glándula adrenal. Así pues, la relación entre el sistema inmune y el eje HPA se puede dar a diferentes niveles (Straub y Cutolo, 2001; Tsatsanis *et al.*, 2007b) (Figura 31):

- a. Mediadores inflamatorios actúan sobre receptores sensoriales, estimulando la liberación de **CRF** desde el **hipotálamo**, a través de fibras nerviosas, y a nivel **local**, desde las células activadas.
- b. Mediadores inflamatorios promueven la liberación de **glucocorticoides** desde la **glándula adrenal**, actuando directamente sobre el eje HPA, ya sea de manera sistémica o local.

A su vez péptidos de la familia de CRF son capaces de modular la respuesta inmunitaria, estableciéndose un bucle de retroalimentación entre ambos sistemas. Esta inducción puede ser (Tsatsanis *et al.*, 2007b):

- a. **Directa**: mediante la estimulación de la liberación de mediadores inmunes por parte del **CRF**.
- b. **Indirecta**: mediante la inducción de la síntesis y liberación de **glucocorticoides** con propiedades inmunomoduladoras.

Todas estas interacciones existentes entre el sistema inmune y los péptidos de la familia de CRF, ponen de manifiesto su importante papel en neuroinmunomodulación.

### 8.3.2. Gen, regulación y procesamiento de CRF

El promotor de CRF contiene una serie de regiones de unión para diferentes factores de transcripción (Kageyama y Suda, 2009; Kageyama *et al.*, 2011; King *et al.*, 2002; Ni *et al.*, 2002; Nicholson *et al.*, 2004) (Figura 28):



Figura 28. Imagen esquemática del promotor de CRF.

- Un elemento **CRE**, de unión a CREB. Este elemento está regulado por la vía del AMPc y la PKA, además de por glucocorticoides.
- Una región de unión a **AP-1**.
- Un elemento de respuesta a glucocorticoides (**GRE**).
- Un elemento de respuesta negativo a glucocorticoides (**nGRE**).
- Un elemento de respuesta a estrógenos (**ERE**).
- Elementos de respuesta a esterol (**SRE**).

El gen de CRF posee dos exones y un intrón corto de 700-800 pb, según la especie, que contiene un elemento **REST/NRSF** implicado en su regulación, pudiendo funcionar como inductor o inhibidor de su expresión. Mientras que el exón 1 contiene la mayor parte de la región 5' no traducida, el exón 2 codifica para el propéptido de CRF, originando una molécula de 191 pb que, tras su procesamiento, da lugar al péptido CRF de 41 pb en mamíferos (Gysling *et al.*, 2004).

### 8.3.3. Familia de CRF

Péptido	Secuencia aa	Nº aa
CRF	SE E P P I S L D L T F H L L R E V L E M A R A E Q L A Q Q A H S N R K L M E I I	41
UCN1	D N P S L S I D L T F H L L R T L L E L A R T Q S Q R E R A E Q N R I I F D S V	40
UCN2	I V L S L D V P I G L L Q I L L E Q A R A R A A R E Q A T T N A R I L A R V	38
UCN3	F T L S L D V P T N I M N L L F N I A K A K N L R A Q A A A N A H L M A Q I	38

**Figura 29.** Comparación de secuencias de los péptidos de la familia de CRF. La identidad de secuencia de la familia aparece marcada en verde. La homología de secuencia de las UCNs en rojo. La homología de secuencia de CRF y UCN1 en morado. La homología de secuencia de UCN2 y UCN3 en azul (Figura modificada de Fekete y Zorrilla

CRF pertenece a una familia formada por el propio **CRF** y por tres neuropéptidos estructuralmente relacionados con él, las urocortinas (UCNs) (Figura 29):

- **UCN1** o UCN recibe su nombre por su alta homología con la urotensina de los osteictios y con el CRF. Al igual que el CRF, se encuentra altamente conservada en los mamíferos y es también capaz de estimular la producción de ACTH desde la pituitaria (Tsatsanis *et al.*, 2007b). Además de su expresión en el SNC, donde posee principalmente una distribución caudal, en se expresa en diversos órganos y tejidos periféricos, incluyendo tejido adiposo, corazón, intestino,

testículos, riñón, médula adrenal y pituitaria anterior. Respecto al sistema inmune, se ha detectado su expresión en timo, bazo y piel, donde es producido por linfocitos, macrófagos, mastocitos y fibroblastos (Fekete y Zorrilla, 2007).

- **UCN2** o péptido relacionado con la estrescopina. Muestra una amplia distribución en tejidos periféricos, incluyendo músculo esquelético, corazón, pulmón, glándula adrenal, piel, placenta, membrana fetal y células sanguíneas (Fekete y Zorrilla, 2007). Entre sus funciones destaca su papel modulador en la homeostasis de la glucosa y en distintas funciones metabólicas (Kuperman y Chen, 2008).
- **UCN3** o estrescopina. Posee una alta homología con la UCN2, implicada también en la homeostasis de la glucosa y en funciones metabólicas. Se encuentra altamente expresada en páncreas (Kuperman y Chen, 2008) y en otros tejidos y órganos periféricos incluyendo bazo, tiroides, glándula adrenal, pituitaria, tejido adiposo, corazón, riñón, estómago, intestino, ovario, placenta y membranas fetales (Kuperman y Chen, 2008).

Tabla 9. FAMILIA DE CRF				
Características	CRF	UCN1	UNC2	UCN3
Año clonación	1981	1995	2001	2001
Cromosoma humano	8	2	3	10
Exones del gen	2	2	2	2
Precursor (aa)	191	124	112	161
Péptido (aa)	41	40	38	38
Afinidad CRFR1	Sí	Sí	No	No
Afinidad CRFR2	Sí	Sí	Sí	Sí

#### 8.3.4. Receptores de CRF

Los neuropéptidos de la familia de CRF regulan distintas actividades biológicas mediadas por dos receptores GPCR de clase B, a los que se unen con distinta afinidad (Tabla 9, adaptada de Gysling *et al.*, 2004):

- El receptor de CRF tipo 1 (**CRFR1**), expresado principalmente en el SNC y la pituitaria anterior, une únicamente CRF y UCN1. Se trata de una proteína de 415 aa, con una homología del 30% con el resto de péptidos de la familia de CRF (Chalmers *et al.*, 1996; Tsatsanis *et al.*, 2007b). Su gen se localiza en el cromosoma 17 y contiene 14 exones que pueden dar lugar a 8 variantes de *splicing* ( $\alpha$ ,  $\beta$ , c, d, e, f, g y h) en humanos (Grammatopoulos y Chrousos, 2002; Pisarchik y Slominski, 2004; Slominski *et al.*, 2004).
- El receptor de CRF tipo 2 (**CRFR2**), su mayor expresión se ha descrito en tejidos periféricos, aunque también se expresa en el SNC. Presenta mayor afinidad por las UCNs que por el CRF. Su gen codifica para una proteína de 411 aa, que comparte un 71% de homología con CRFR1 (Chalmers *et al.*, 1996; Tsatsanis *et al.*, 2007b). Se localiza en el cromosoma 17 y posee 15 exones que, en humanos, dan lugar a tres variantes de *splicing* ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), de las cuales el CRFR2 $\alpha$  se expresa principalmente en tejidos periféricos (Grammatopoulos y Chrousos, 2002; Kuperman y Chen, 2008; Slominski *et al.*, 2004).

Debido a su gran homología y al hecho de que ambos neuropéptidos son capaces de unirse a los dos tipos de receptores, CRF y UCN1 comparten un espectro farmacológico común, teniendo efectos fisiológicos similares. La principal diferencia entre ambos se debe a la afinidad por cada uno de los receptores. Mientras que CRF tiene mayor afinidad por CRFR1, la UCN1 se une con la misma afinidad a ambos receptores (Gysling *et al.*, 2004; Kuperman y Chen, 2008). Debido a que el CRFR1 es el principal implicado en las respuestas relacionadas con el estrés, mediando principalmente efectos ansiogénicos, CRF parece tener mayor implicación en este tipo de respuestas, mientras que el CRFR2 está más implicado en respuestas ansiolíticas (Gysling *et al.*, 2004; Tsatsanis *et al.*, 2007b).

Además de expresarse en el hipotálamo y otras localizaciones del SNC, tanto los péptidos de la familia de CRF como sus receptores se expresan también en tejidos periféricos, incluyendo las glándulas adrenales y células del sistema inmune, pudiendo ser liberadas además por neuronas del SNS, constituyendo un elaborado circuito (Tsatsanis *et al.*, 2007b).

Existen diferentes **mecanismos de regulación** destinados a impedir una excesiva señalización de los CRFRs. Entre estos mecanismos se incluyen (Hauger *et al.*, 2009):

- **Desensibilización homóloga** mediada por **GRKs**.
- **Desensibilización heteróloga** mediada por otras **quinasas**.
- **Internalización** mediada por **arrestinas**.
- **Antagonistas** selectivos del receptor.
- Proteínas de unión a CRF (**CRF-BP**), que funcionan como antagonistas endógenos del péptido impidiendo su unión al receptor. Se unen con gran afinidad a CRF y UCN1, y con menor afinidad a UCN2 (Kuperman y Chen, 2008; Potter *et al.*, 1991).
- También se ha descrito la presencia de **miRNAs** que modulan la expresión de los receptores (Nemoto *et al.*, 2013).

### 8.3.5. Vías implicadas en la señalización de CRF

Al igual que VIP, la señalización de CRF está mediada por GPCRs. La unión de CRF o de las UCNs a sus receptores CRFR1 y CRFR2, va a promover a disociación de la subunidad  $G\alpha$ , activándose diferentes rutas de señalización intracelular. Las principales vías implicadas en la señalización de los péptidos de la familia de CRF son (Figura 30):

- La vía de la **AC/AMPC/PKA** es la principal implicada en la señalización mediada por CRFR1 y CRFR2. En esta vía participan principalmente proteínas **G $\alpha$ s**. Desencadena la activación del factor de transcripción **CREB** y también está implicada en la señalización mediada por la **MAPK-ERK**, así como en la movilización de **Ca<sup>2+</sup>** intracelular. Defectos en esta vía están relacionados con

procesos de estrés, ansiedad y depresión (Hauger *et al.*, 2009; Stengel y Tache, 2009).

- La vía de la **PLC/PKC**. Implica principalmente a proteínas **Gαq** y promueve la formación de **IP<sub>3</sub>** y la movilización de **Ca<sup>2+</sup>** intracelular. Alteraciones en esta vía se relacionan con la ansiedad y el suicidio (Hauger *et al.*, 2009; Stengel y Tache, 2009).
- La vía de las **MAPK**. Los tres tipos de MAPK están implicados en la señalización mediada por CRFRs, pero la principal es la vía mediada por la **MAPK-ERK**. Esta vía regula procesos de plasticidad sináptica (Hauger *et al.*, 2009; Stengel y Tache, 2009).
- Vía de la **PI3K/Akt**. Relacionada también con la activación de **NF-κB** (Chandras *et al.*, 2009).

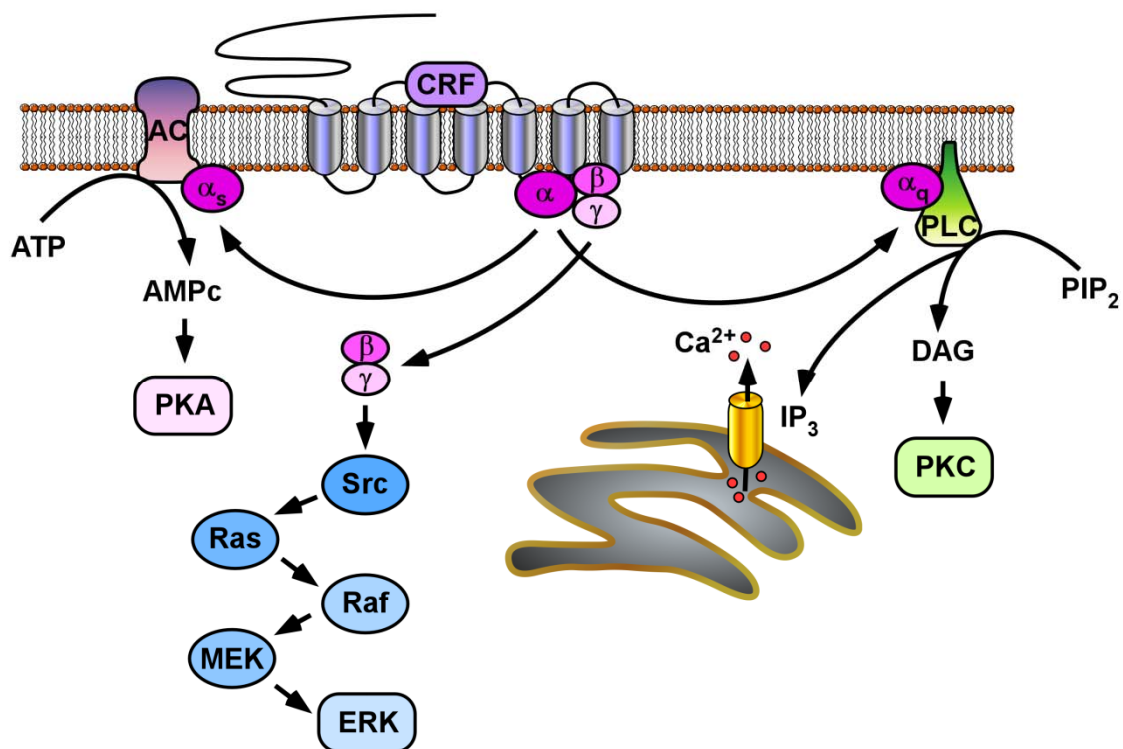


Figura 30. Principales vías implicadas en la señalización de CRF.

### 8.3.6. CRF en inflamación y enfermedades reumáticas

El sistema de CRF está estrechamente relacionado con el desarrollo de **trastornos psicológicos**. Una alteración en los mecanismos de respuesta al estrés puede conllevar importantes consecuencias a nivel fisiológico y psicológico, a la vez que una activación exacerbada del sistema CRF está relacionado con patologías tales como la ansiedad, depresión o anorexia nerviosa, así como con **enfermedades neurodegenerativas** como el Alzheimer (Chalmers *et al.*, 1996; Kuperman y Chen, 2008). El CRF tiene además efectos analgésicos, relacionados con la liberación de glucocorticoides (Yarushkina *et al.*, 2011).

La familia de CRF también se relacionada con **enfermedades inflamatorias y autoinmunes**. Ante una situación de inflamación el SNC responde activando el eje HPA y liberando glucocorticoides con capacidad antiinflamatoria, además de liberar neuropéptidos a través de las fibras nerviosas del SNS, modulando así el proceso inflamatorio. En condiciones patológicas estos mecanismos se alteran, lo que contribuye a la progresión de la enfermedad (Straub y Cutolo, 2001). En este sentido se han descrito tanto efectos proinflamatorios como antiinflamatorios del sistema CRF, que no sólo van a depender del péptido, sino también de otros factores entre los que se incluye el tipo de receptor y las vías de señalización activadas, así como la concentración del péptido y el tipo de tejido del que se trate.

Algunos de los efectos **proinflamatorios** descritos son:

- Promueve la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$  (Agelaki *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2005; Smith, 2008; Tsatsanis *et al.*, 2006; Tsatsanis *et al.*, 2007a).
- Induce la expresión de moléculas de adhesión y mediadores inflamatorios como NO (Wilbert-Lampen *et al.*, 2006).
- Favorece la expresión de TLR4 (Tsatsanis *et al.*, 2006).
- Promueve la liberación de histamina desde mastocitos (Singh *et al.*, 1999; Theoharides *et al.*, 1998).
- Induce proliferación de linfocitos (McGillis *et al.*, 1989).

- Protege de la apoptosis en monocitos (Chandras *et al.*, 2009).
- Induce la activación de MAPK, PI3K/Akt y NF-κB (Chandras *et al.*, 2009; Moss *et al.*, 2007; Smith, 2008).

Entre los efectos **antiinflamatorios** de la familia de CRF se incluyen:

- Induce liberación de citocinas antiinflamatorias como IL-10 (Kim *et al.*, 2006; Sashinami *et al.*, 2005; Tsatsanis *et al.*, 2007a; Wang *et al.*, 2006).
- Inhibe la expresión de citocinas proinflamatorias como IFNγ y TNFα (Kim *et al.*, 2006; Sashinami *et al.*, 2005; Tsatsanis *et al.*, 2007a; Wang *et al.*, 2006).
- Promueve apoptosis en macrófagos (Dermitzaki *et al.*, 2005).
- Inhibe la actividad fagocítica y de las células NK, así como la producción de anticuerpos (Leu y Singh, 1993; Pawlikowski *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1992a; Smith *et al.*, 1992b).
- Promueve la vía del AMPc/PKA e inhibe NF-κB (Auphan *et al.*, 1995; Singh y Leu, 1993).
- Induce la producción de glucocorticoides, suprimiendo la respuesta inflamatoria (Deng *et al.*, 2004; Dhingra *et al.*, 2001).
- El cortisol inhibe la fagocitosis, la presentación antigénica y mecanismos oxidativos, así como la producción de colagenasas, citocinas proinflamatorias y COX-2, además de promover la respuesta Th2 (Straub y Cutolo, 2001).

Respecto a las **enfermedades reumáticas**, el CRF también parece tener un carácter dicotómico, pues se han descrito tanto efectos inhibidores como inductores del proceso inflamatorio. Se ha descrito que alteraciones en el gen del CRF suponen un factor de riesgo para el desarrollo de AR (Fife *et al.*, 2000). Además se ha detectado la expresión de CRF en bazo y articulaciones de rata con artritis inflamatoria (Baigent, 2001; Crofford *et al.*, 1993). Asimismo, algunos estudios relacionan la actividad de CRF mediada por **CRFR1** con una acción **proinflamatoria**, estando implicado en la progresión de la enfermedad, así como en los cambios de la permeabilidad vascular que tienen lugar durante la sinovitis (McEvoy *et al.*, 2001; Ralph *et al.*, 2007). CRF contribuye también a la producción de PGE2 y modula la actividad de diferentes factores de transcripción, incluyendo la familia CREB/ATF y el receptor nuclear NR4A,

en la AR (McEvoy *et al.*, 2002; McEvoy *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2001). Además se han observado niveles elevados de péptidos de la familia de CRF, incluyendo CRF, UCN1 y CRFR1 en el líquido y tejido sinovial de pacientes con OA y AR, artritis psoriásica y artritis sarcóidea (Crofford *et al.*, 1993; McEvoy *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2001; Uzuki *et al.*, 2001), siendo mayor en AR que en OA (Kohno *et al.*, 2001). En estos pacientes, citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  o TNF $\alpha$  inducen su expresión (Murphy *et al.*, 2001). Además se ha detectado la presencia de UCN1 en SF de pacientes de OA y RA (Kohno *et al.*, 2001; Uzuki *et al.*, 2001), aunque existen pocos datos acerca de la expresión de los péptidos de la familia de CRF en este tipo celular.

Por otro lado, en modelos animales y en pacientes de AR, el cortisol promueve efectos beneficiosos induciendo una respuesta Th2 y la expresión de citocinas antiinflamatorias como IL-10 (Straub y Cutolo, 2001). Además algunos estudios indican que el CRFR2 inhibe la angiogénesis, pudiendo ser una diana terapéutica en el tratamiento de patologías como el cáncer (Bale *et al.*, 2002), lo que también se podría aplicar en AR y OA. Asimismo, se ha comprobado el efecto **antiinflamatorio** de **CRFR2** en respuesta a endotoxinas, inhibiendo la señalización mediada por TLR4 (Yuan *et al.*, 2016), donde CRF ejerce un efecto protector (Ullewar y Umathe, 2015). Estudios en patologías inflamatorias intestinales corroboran también el papel antiinflamatorio de CRFR2, en contraposición a CRFR1 (Fukudo, 2007). En pacientes de OA se ha observado además un efecto condroprotector de la UCN1 (Intekhab-Alam *et al.*, 2013), inhibiendo la resorción ósea mediada por los osteoclastos (Combs *et al.*, 2012). Asimismo, se han descrito efectos beneficiosos con la administración exógena de UCN1 en otras patologías inflamatorias y autoinmunes tales como la enfermedad de Crohn, el edema inducido por lesión térmica o la encefalomiелitis autoinmune, donde CRF ejerce también un efecto antiinflamatorio (Fekete y Zorrilla, 2007; Poliak *et al.*, 1997). En estas patologías el efecto modulador sobre la inflamación también se observa debido a la liberación de glucocorticoides, como es el caso de la esclerosis múltiple (Melief *et al.*, 2013). Niveles bajos de CRF se relacionan además con la obesidad, donde se ha descrito un efecto antiinflamatorio de CRF y UCN1 en adipocitos, disminuyendo la expresión de TLR4 y la producción de mediadores inflamatorios como IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ , CXCL1 y CCL2 (Dermizaki *et al.*, 2014).

## Objetivos

---

---



La artrosis es la enfermedad reumática más frecuente, tratándose de una patología crónica asociada con la destrucción del cartílago articular, la remodelación del hueso subcondral y la inflamación de la membrana sinovial.

Durante el desarrollo de la enfermedad, intervienen mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas, y productos de degradación de la matriz extracelular, perpetuando la sinovitis y la destrucción articular. El sinoviocito fibroblástico, como una de las principales células residentes en la íntima sinovial, podría jugar un papel importante en este proceso, mediante la liberación de mediadores proinflamatorios y proteinasas, implicadas en la degradación de la matriz extracelular del cartílago articular.

En la articulación sinovial se establecen además complejas interacciones entre los sistemas endocrino, nervioso e inmune. En este contexto, diferentes estudios han demostrado la presencia de neuropéptidos de las familias de VIP y CRF en la articulación sinovial de pacientes con artrosis y artritis reumatoide. Estudios *in vitro* e *in vivo* han descrito el papel antiinflamatorio de VIP. Además, los péptidos de la familia de CRF han sido descritos tanto como productores de efectos proinflamatorios como antiinflamatorios.

Hasta la fecha, las terapias disponibles para el tratamiento de la artrosis se han centrado en aliviar la sintomatología más que en frenar la progresión de la enfermedad. Por tanto, la búsqueda de nuevas dianas y herramientas terapéuticas es de gran importancia para el desarrollo de nuevos tratamientos para dicha patología.

Así, nos planteamos el desarrollo de los siguientes objetivos:

1. Caracterización de la familia de CRF, constituida por los péptidos CRF, UCN1, UCN2 y UCN3, y los receptores CRFR1 y CRFR2, en sinoviocitos fibroblásticos procedentes de pacientes con artrosis y artritis reumatoide.
2. Análisis del efecto de VIP sobre los neuropéptidos de la familia de CRF en sinoviocitos fibroblásticos de pacientes con artrosis y artritis reumatoide.
3. Estudio del sistema uPA en sinoviocitos fibroblásticos de pacientes con artrosis, en condiciones basales y tras la estimulación con IL-1 $\beta$  o con fragmentos de fibronectina de 45KDa.
4. Determinación del efecto de los neuropéptidos VIP y CRF sobre el sistema uPA en sinoviocitos fibroblásticos de artrosis.
5. Estudio, en sinoviocitos fibroblásticos de pacientes con artrosis, de las ADAMTS más representativas en la degradación del cartílago articular: ADAMTS-4, -5, -7 y -12, en condiciones basales y tras la estimulación con IL-1 $\beta$  o con fragmentos de fibronectina de 45KDa.
6. Análisis del efecto de los neuropéptidos VIP y CRF sobre las ADAMTS-4, -5, -7 y -12, en sinoviocitos fibroblásticos de artrosis.

Publicaciones





Mapping the CRF-urocortins system in human osteoarthritic and rheumatoid sinovial fibroblasts: effect of vasoactive intestinal peptide

Pérez-García S, Juarranz Y, Carrión M, Gutiérrez-Cañas I, Margioris A, Pablos JL, Tsatsanis C, Gomariz RP

*J Cell Physiol.* 2011 Dec;226(12):3261-9



# Mapping the CRF–Urocortins System in Human Osteoarthritic and Rheumatoid Synovial Fibroblasts: Effect of Vasoactive Intestinal Peptide

SELENE PÉREZ-GARCÍA,<sup>1</sup> YASMINA JUARRANZ,<sup>1</sup> MAR CARRIÓN,<sup>1</sup> IRENE GUTIÉRREZ-CAÑAS,<sup>1</sup> ANDREW MARGIORIS,<sup>2</sup> JOSÉ L. PABLOS,<sup>3</sup> CHRISTOS TSATSANIS,<sup>2</sup> AND ROSA P. GOMARIZ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Department of Clinical Chemistry, School of Medicine, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

<sup>3</sup>Servicio de Reumatología y Instituto de Investigación, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

In addition to the brain and pituitary gland, the corticotrophin-releasing factor (CRF) system is expressed in peripheral tissues. In this study we characterize the expression of CRF, urocortins (UCN1, UCN2, and UCN3), and their receptors (CRFR1 and CRFR2) in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLS). Moreover, we analyze the vasoactive intestinal peptide (VIP) effect on the CRF system, as well as its physiological consequences on mediators of inflammatory/destructive processes. CRF and UCNs exhibit differential pattern in OA and RA-FLS. By real-time PCR we detected more expression of CRF and UCN1 in RA, and UCN2 and UCN3 in OA, while the CRFR2 expression was similar. In RA-FLS VIP treatment resulted in a significant decrease of the proinflammatory peptides, CRF and UCN1, and a significant increase of the potential anti-inflammatory agents, UCN3 and CRFR2. Using Western blot assays, we showed that the ratio between phospho-CREB (p-CREB) and c-AMP response element-binding (CREB) is higher in OA and significantly lower in RA-FLS after VIP treatment, with consequences upon cAMP response element in CRF and UCN1 genes. Real-time PCR and EIA proved that VIP significantly inhibits cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E2 (PGE2) in RA-FLS. In all cases, we consider significant data when  $P < 0.05$ . These data indicate a role of endogenous CRF, UCNs, and CRFR2 in the OA and RA joint microenvironment. We confirm the anti-inflammatory function of VIP, through the modulation of the expression of CRF system that impacts in a reduction of mediators with inflammatory/destructive functions, supporting its therapeutic potential in rheumatic diseases. *J. Cell. Physiol.* 226: 3261–3269, 2011. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic immune-mediated disease caused by a complex interplay of individual genetic predisposition, environmental factors, and deregulated immune responses. It affects 1% of the adult population worldwide. In RA joints the intimal lining of the synovium exhibits significant alterations with an increase in macrophage-like cells and fibroblast-like synoviocytes (FLS), each one generating an array of inflammatory mediators (Firestein, 2003; Müller-Ladner et al., 2007). Both cell types, together with new recruited cells, establish an autocrine/paracrine network that perpetuates synovitis, degrading adjacent cartilage, and bone. Moreover, the synovial tissue in RA is a target in which complex interactions between the endocrine, nervous, and immune systems arise (Cutolo et al., 2007). Different hormones and neurotransmitters (including neuropeptides) released from distant organs have been found to affect the disease. Thus, the chronic stage in synovitis is characterized by a proinflammatory influence of sympathetic and sensory fibers. In addition, glucocorticoid, androgen, and estrogen receptors have been found to be expressed in RA synoviocytes, allowing androgens and estrogens to affect the inflammatory microenvironment (Schmidt et al., 2009). In this context, we have recently described differential expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) and its receptors in osteoarthritis (OA) and RA (Juarranz et al., 2008).

The VIP is one of the best-studied immunoregulatory neuropeptides having essential roles in several stages of the development of both innate and acquired immunity (Abad et al.,

2006; Delgado et al., 2004; Gomariz et al., 2001, 2006). The immunoregulatory properties of VIP are exerted by the engagement of two G-protein coupled receptors, VPAC1 and VPAC2 (Laburthe et al., 2007). VIP displays a plethora of beneficial effects in several experimental animal models of immune-mediated inflammatory disorders (Gomariz et al., 2001, 2006; Abad et al., 2003, 2006; Delgado et al., 2004; Said et al., 2007; Jimeno et al., 2010). In collagen-induced arthritis (CIA), VIP inhibits proinflammatory cytokines production, shifts Th1/Th2 balance, decreases IL-17 expression, and exerts a strong protective effect on joint destruction (Delgado et al., 2001; Juarranz et al., 2005; Leceta et al., 2007). Moreover, the potential therapeutic effects of VIP in human RA cells *ex vivo*

Selene Pérez-García and Yasmina Juarranz contributed equally to this work.

Christos Tsatsanis and Rosa P. Gomariz share senior authorship.

\*Correspondence to: Rosa P. Gomariz, Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense, José Antonio Novais No. 2, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. E-mail: gomariz@bio.ucm.es

Received 29 December 2010; Accepted 28 January 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com), 25 February 2011.  
DOI: 10.1002/jcp.22687

have been confirmed (Juarranz et al., 2004; Gutiérrez-Cañas et al., 2008). The corticotropin-releasing factor (CRF) and Urocortins (UCNs) family includes four structurally related peptides (CRF and UCN 1, -2, and -3). All are encoded by independent genes and show differential expression patterns within both central and peripheral tissues. The physiological effects of these peptides are mediated through binding with different affinities to two G-protein-coupled receptors, CRF-receptor 1 (CRFR1) and CRF-receptor 2 (CRFR2), which are expressed in central and peripheral tissues, including immune cells (Tsatsanis et al., 2007a; Kuperman and Chen, 2008). The CRF system is the major mediator of the stress response involved in disorders such as anxiety, depression, and drug addiction, and multiple studies indicate that it is a modulator of inflammatory responses. Hypothalamic CRF produces immunosuppressive and anti-inflammatory effects through endogenous glucocorticoid release by activation of the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis. In addition to the brain and pituitary gland, the CRF system is highly expressed in several peripheral tissues, functioning as regulators of the stress response and as mediators of immune/inflammatory responses (Tsatsanis et al., 2007b). The local production of CRF and UCNs directly promotes both, inflammatory and immunostimulatory actions (Baigent, 2001; Tsatsanis et al., 2007b; Kuperman and Chen, 2008; Smith, 2008) such as in streptococcal cell wall- and adjuvant-induced arthritic joints of rats (Crofford et al., 1992), the joints of patients with RA and OA (Crofford et al., 1993; Khono et al., 2001) and in inflammatory bowel disease (Pashos et al., 2009). Therefore, the CRF system could contribute to the development of many inflammatory conditions. All in all, VIP and CRF systems are both involved in the physiopathology of rheumatic diseases.

This study has two objectives: (1) to characterize the presence of the CRF system in OA and RA FLS and (2) to study the effect of the anti-inflammatory peptide VIP on the expression of the CRF system and its physiological consequences on inflammatory/destructive mediators.

## Materials and Methods

### Patients and FLS cultures

Synovial tissue samples were obtained from 16 patients with RA and 16 patients with OA at the time of knee prosthetic replacement surgery. All patients with RA fulfilled the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) 1987 revised criteria for the diagnosis of RA (Arnett et al., 1988). Patients with RA were heterogeneous in terms of therapy and were only selected by progressive disease in the knee requiring surgery. Most patients (80%) had received methotrexate, 30% other disease-modifying drugs, and 30% anti-TNF therapy (alone or combined). Patients had discontinued these therapies before surgery for an appropriate washout period to minimize infection risk. Patients with OA had also advanced disease and, in all cases, were diagnosed of primary OA, excluding trauma, inflammatory disease, and other structural causes of secondary OA. The study was performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Hospital 12 de Octubre. FLS cultures were established from homogenized synovium in 10% fetal calf serum in Dulbecco's modified Eagle's medium. FLS were used between passages 3 and 8.

In some experiments, FLS were cultured in the presence of 10 nM VIP (Neosystems, Strasbourg, France) for 24 h. Culture supernatants were harvested and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for enzyme immunoassay (EIA). RNA was also obtained from FLS cultures using TRI REAGENT (Sigma–Aldrich, Madrid, Spain) for cellular homogenization, chloroform for phase separation, and isopropanol for RNA precipitation. Total RNA was quantified with NanoDrop<sup>®</sup> and was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### Nuclear extract preparation

A Nuclear Extract Kit (Active Motif, Rixensart, Belgium) was used for nuclear extract preparation. Some FLS were previously cultured in the presence of 10 nM VIP for 6 h. Nuclear extracts were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Protein content was measured using a QuantiPro<sup>™</sup> BCA Assay Kit (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO).

### Semiquantitative real-time RT-PCR assay

CRF, UCN1, UCN2, UCN3, CRFR1, CRFR2, and cyclooxygenase-2 (COX-2) messenger RNA (mRNA) expression in cultured FLS was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA (2  $\mu\text{g}$ ) was reverse transcribed. cDNA was obtained by High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reverse transcriptase products (2  $\mu\text{l}$ ) were PCR-amplified with specific primers for  $\beta$ -actin, CRF, UCN1, UCN2, UCN3, CRFR1, and CRFR2. The PCR products were analyzed in agarose gels.

Semiquantitative real-time PCR analysis was also performed using SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), in the cases of  $\beta$ -actin, CRF, UCN1, and UCN2, specific set of primers were designed as follows: sense primer (5'-AGAAGGATTCCTATGTGGGCG-3') and anti-sense primer (5'-CATGTCTCGTCCCAGTTGGTGAC-3') for  $\beta$ -actin (accession no: E00829) amplifying a fragment in the sequence position 1,435–1,535; sense primer (5'-TCCGAGGAGCCTCCCATC-3') and anti-sense primer (5'-AATCTCCATGAGTTTCTGTTGC-3') for CRF (accession no: NM000756), amplifying a fragment in the sequence position 460–579; sense primer (5'-CAGGCGAGCGGCCGCG-3') and anti-sense primer (5'-CTTGCCACCGAGTCAAT-3') for UCN1 (accession number no: NM003353), amplifying a fragment in the sequence position 228–373 and sense primer (5'-GTGTCCGCCACTGCTGAGCCTGAGAGA-3') and anti-sense primer (5'-ATCTGATATGACCTGCATGACAGTGGCT-3') for UCN2 (accession number no: NM033199) amplifying a fragment in the sequence position 402–569. In the cases of UCN3, CRFR1, CRFR2, and COX-2 a TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) was used, with predesigned primers. For relative quantification, we compared the amount of target normalized to an endogenous reference ( $\beta$ -actin), using the formula  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , as previously described (Juarranz et al., 2008).

### Assay analysis of CRF, UCN1, and PGE2 in culture supernatants

The levels of CRF and UCN1 in FLS culture supernatants were also measured by EIA, using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Karlsruhe, Germany). The minimum detectable concentration was 0.25 ng/ml (UCN1) and 45 pg/ml (CRF) of sample, with intra- and inter-assay variation less than 5% and 15%, respectively. UCN2 and UCN3 proteins were not measured in FLS supernatants because of not availability of commercial EIA or ELISA antibodies for their detection.

The levels of prostaglandin E2 (PGE2) in FLS culture supernatants from OA and RA patients were measured by EIA using a commercial Express Kit according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). The minimum detectable concentration was 0.36 pg/ml of sample and the intra- and inter-assay variation depends on protein concentration.

### Immunofluorescence detection of CRF, UCN1, UCN2, and UCN3

To confirm CRF and UCNs protein expression in cultured FLS, we performed immunocytochemistry studies using a specific rabbit anti-CRF polyclonal antibody, goat anti-UCN1 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA), rabbit anti-UCN2 antibody and rabbit anti-UCN3 antibody (Phoenix

Pharmaceuticals, Inc.), respectively. OA or RA-FLS were cultured onto glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized for 10 min with 0.5% Triton X-100 in PBS at room temperature. Coverslips were incubated with primary antibody for 1 h at 37°C followed by 1 h incubation with an AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG antibody for CRF, UCN2, and UCN3, and anti-goat Alexa 488 and anti-goat Texas for UCN1 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Coverslips were counterstained with 1  $\mu$ g/ml DAPI to see nuclear bodies, mounted and examined under a fluorescence microscope.

#### Measurement of cAMP accumulation in cell cultures

Levels of cAMP were determined by means of an EIA kit (Cayman Chemical). OA- and RA-FLS were cultured in the presence of 10 nM VIP for 24 h. The cells were then homogenized in 5% trichloroacetic acid. After centrifugation, cAMP levels in the supernatants were measured according to the manufacturer's instructions. The protein concentration was determined by the Bradford method, using bovine serum albumin as a standard. Results are expressed in pmol of cAMP/ $\mu$ g of protein.

#### Determination of the CREB/ATF-1 transcription factor family in nuclear extracts

For Western blotting of CREB (c-AMP response element-binding), p-CREB (phospho-CREB) and p-ATF-1 (phospho-activating/CREB transcription factor), a PhosphoPlus<sup>®</sup> CREB (Ser 133) Antibody Kit (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) was used. Ten micrograms of protein from nuclear extracts was subjected to SDS-PAGE and blotted onto a nitrocellulose membrane (BioTrace INT, Pall Corporation, Ann Arbor, MI). The membrane was blocked with Tris-buffered saline (pH 7.6) containing 5% BSA

and 0.1% Tween-20 and then incubated with rabbit anti-CREB or rabbit anti-p-CREB antibody (1:1,000) at 4°C overnight. The anti-CREB antibody detects total CREB (phosphorylation state-independent levels) at 43 kDa and does not cross-react with any other CREB family members. The anti-p-CREB antibody detects Ser<sup>133</sup>-phosphorylated-CREB (43 kDa), as well as the phosphorylated form of the CREB-related protein ATF-1 (35 kDa). A secondary antibody to rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:5,000) was used and detected by Supersignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, Rockford, IL), according to the manufacturer's instructions.

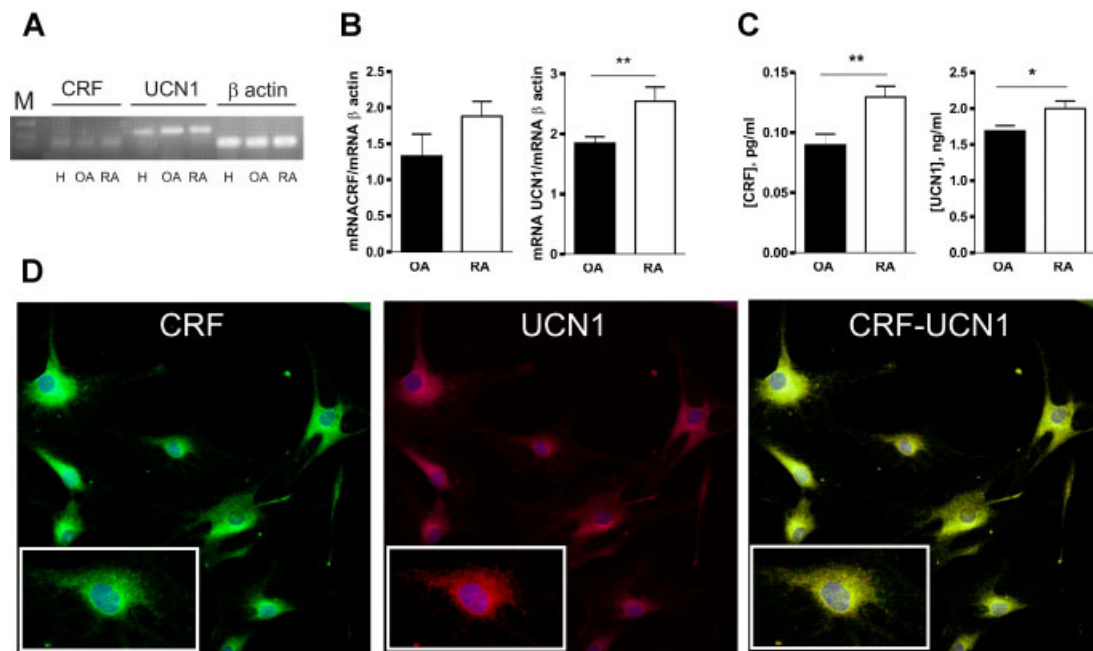
#### Statistical analysis

Results are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). The significance of the results was analyzed using Student's two-tailed *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

## Results

### CRF and UCN1 expression is higher in RA-FLS than in OA-FLS

Constitutive CRF and UCN1 mRNA expressions were detected by RT-PCR in all 16 cultured OA-FLS and all 16 RA-FLS lines; a representative assay is shown in Fig. 1A. The PCR products were analyzed in agarose gels and the correct size and sequence of the amplified products were checked. We have also used RNA from human hypothalamus as a positive control for both mRNA expressions. To confirm data, semiquantitative real-time PCR analysis of CRF and UCN1 mRNA expressions was performed (Fig. 1B). Semiquantitative real-time RT-PCR analysis showed a small but not significant increase of CRF



**Fig. 1. CRF and UCN1 expression in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLS).** A: Electrophoretic analysis of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) of CRF and UCN1 mRNA expression in OA- and RA-FLS. M = 10 bp ladder. We have used human hypothalamus as a positive control for both mRNA expressions (H). B: CRF and UCN1 mRNA expression in OA- and RA-FLS was measured by relative quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of  $\beta$ -actin in each sample (see Patients and Methods Section). Values are the mean and SEM of triplicate determinations ( $n = 16$  for both OA- and RA-FLS lines). C: Presence of CRF and UCN1 in the supernatants of OA- and RA-FLS cultures under basal unstimulated conditions, determined by enzyme immunoassay (EIA) after 24 h of culture. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations ( $n = 9$  for both OA- and RA-FLS). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  versus OA-FLS. D: Immunofluorescence labeling of CRF (green), UCN1 (red), and both in OA-FLS. Cells were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole (blue nuclei) (immunocytochemistry for RA-FLS showed the same appearance).

mRNA expression in RA-FLS compared to OA-FLS, and a significant elevation of UCN1 expression in RA-FLS compared to OA-FLS.

To determine whether these differences are reflected in differences in CRF and UCN1 secretion, presence of both peptides was determined in the supernatants of OA- and RA-FLS cultures by EIA (Fig. 1C). CRF and UCN1 protein levels were significantly increased in RA compared to OA-FLS. In order to corroborate the expression of both peptides, we carried out immunocytochemistry in OA- and RA-FLS. Both, CRF and UCN1, were detected in the cytoplasm of cultured synoviocytes, as determined by immunofluorescence labeling (Fig. 1D), with the co-expression of both peptides. We observed no staining when isotype controls were used (data not shown). Therefore, these data pointed to an increased production of CRF and UCN1 in RA-FLS, members of the CRF peptide family with pro-inflammatory properties.

#### RA-FLS have a lower expression of UCN2 and UCN3 than OA-FLS

UCN2 and UCN3 mRNA expression was detected by RT-PCR in the 16 cultured OA-FLS and 16 RA-FLS lines. A representative assay is shown in Fig. 2A. The PCR products were analyzed in agarose gels and the correct size and sequence of the amplified products were checked. We have also used RNA from human hypothalamus as a positive control. Semiquantitative real-time RT-PCR analysis demonstrated a significant decrease of UCN2 mRNA expression in RA-FLS

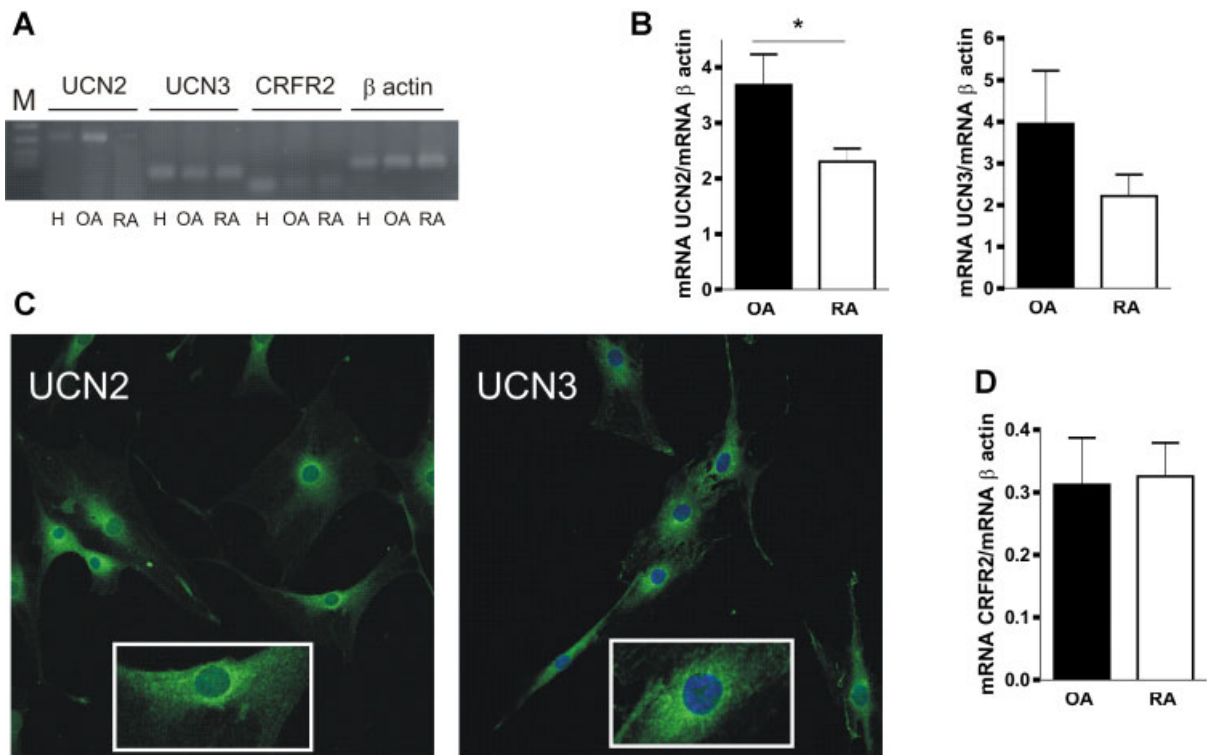
compared to OA-FLS, and a small but not significant decrease in UCN3 expression (Fig. 2B). Both urocortins were detected in the cytoplasm of OA and RA FLS by immunofluorescence (Fig. 2C), confirming their expression at the protein level. We observed no staining when isotype controls were used (data not shown).

#### CRFR2 expression in OA- and RA-FLS

To examine the expression of the receptors for the four peptides of this family of neuropeptides in these cells, we studied by RT-PCR the expression of CRFR1 and CRFR2 mRNA in OA- and RA-FLS. CRFR1 was detected in positive control tissue (human hypothalamus) but not in any of the 16 OA- and RA-FLS lines (data not shown). In contrast, CRFR2 mRNA was detected by RT-PCR in both OA- and RA-FLS (Fig. 2A). Semiquantitative real-time RT-PCR analysis showed that CRFR2 mRNA was expressed at similar levels in RA- and OA-FLS (Fig. 2D).

#### Differential effects of VIP in the CRF–UCN family in OA- and RA-FLS

In a previous study we have described the presence in the joint microenvironment of VIP both in OA and RA-FLS (Juarraz et al., 2008). Thus, following the characterization of the CRF–UCN system in FLS in both pathologies, we have studied the potential crosstalk in the joint between the two endogenous peptide families, the anti-inflammatory VIP and the immunomodulatory CRF. Both neuropeptides families are



**Fig. 2.** UCN2, UCN3, and CRFR2 expression in OA- and RA-FLS. **A:** RT-PCR of UCN2, UCN3, and CRFR2 mRNA expression in OA- and RA-FLS. **M** = 10 bp ladder. We have used human hypothalamus as a positive control for both mRNA expressions (H). **B:** UCN2 and UCN3 mRNA expression in OA- and RA-FLS was measured by relative quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of  $\beta$ -actin in each sample (see Patients and Methods Section). Values are the mean and SEM of triplicate determinations ( $n = 16$  for both OA- and RA-FLS lines). \* $P < 0.05$  versus OA-FLS. **C:** Immunofluorescence labeling of UCN2 (green), UCN3 (green), and both in OA-FLS. Cells were counterstained with 4',6-diamino-2-phenylindole (blue nuclei) (immunocytochemistry for RA-FLS showed the same appearance). **D:** CRFR2 mRNA expression in OA- and RA-FLS was measured by relative quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of  $\beta$ -actin in each sample (see Patients and Methods Section). Values are the mean and SEM of triplicate determinations ( $n = 16$  for both OA- and RA-FLS lines).

found to be co-expressed in several tissues and pathologies, such as the intestinal epithelium and the synovium, suggesting potential crosstalk. To this end, OA- and RA-FLS were treated for 24 h with VIP and expression of CRF, UCN 1, 2, and 3, as well as CRFR2 mRNA was measured. Our results showed differential actions of VIP in OA and in RA. Specifically, this anti-inflammatory peptide promoted the expression of CRF and UCN1 mRNA OA-FLS (Fig. 3A), but this effect was not detected at protein level (Fig. 3B). In contrast, VIP treatment resulted in a significant increase of UCN2 and UCN3 mRNA levels in OA-FLS compared to their basal expression (Fig. 3C). Regarding the expression of CRF receptors, treatment of OA-FLS with VIP resulted in a modest but not significant increase of CRFR2 mRNA compared to its constitutive expression (Fig. 3C).

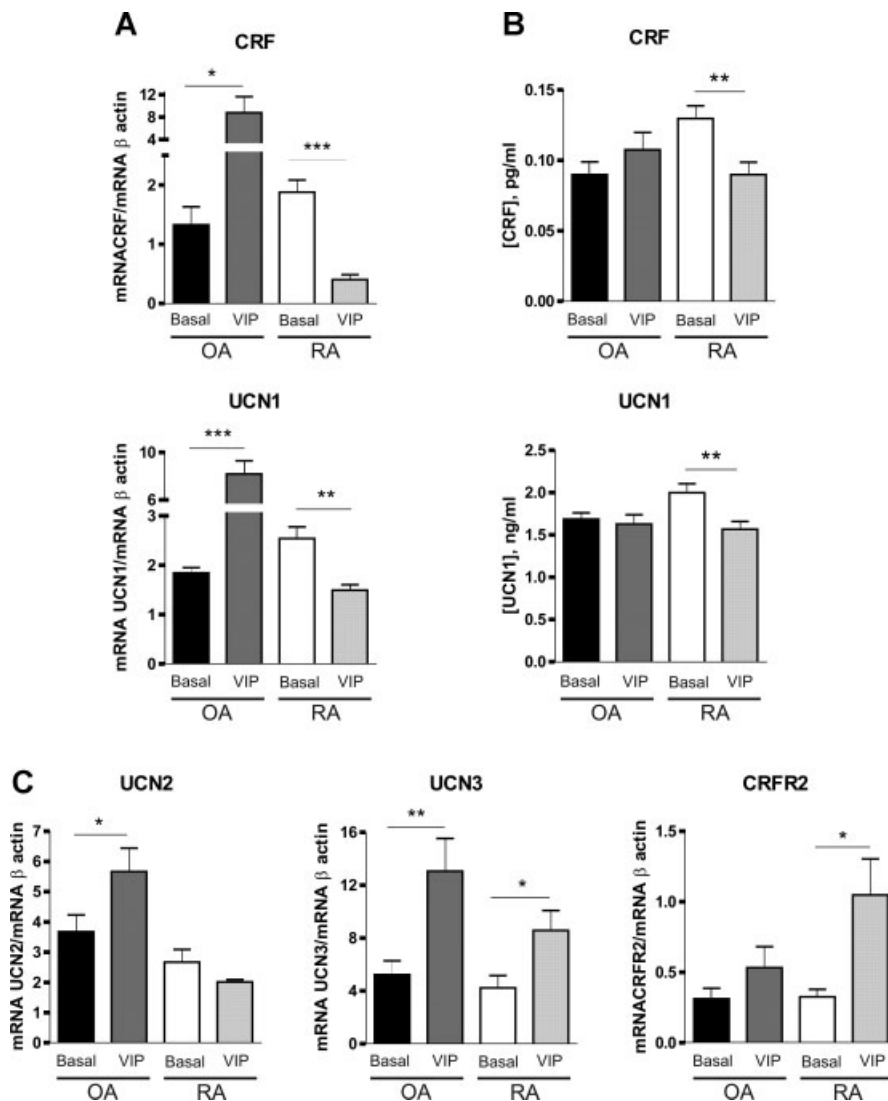
In contrast to OA-FLS, in RA-FLS VIP treatment resulted in a significant decrease of both mRNA and protein expression of

CRF and UCN1 peptides (Fig. 3A,B). VIP treatment did not alter the expression of UCN2 mRNA in RA-FLS compared to its basal levels (Fig. 3C), while UCN3 mRNA levels were significantly increased after VIP treatment. VIP-treated RA-FLS expressed higher levels of CRFR2 mRNA compared to untreated cultures.

Together, these results suggest that, following VIP treatment, the pattern of expression of CRF-UCNs system differed in OA-FLS compared with RA-FLS.

#### Effect of VIP upon the protein kinase A/cAMP response element binding (PKA/CREB) pathway in OA- and RA-FLS

Even though multiple signaling pathways are activated by VIP which are downstream or independent of cAMP (phospholipase C, phospholipase D,  $[Ca^{+2}]$ , etc.), to date cAMP



**Fig. 3.** Effects of VIP treatment on CRF-Urocortins family in OA- and RA-FLS. **A:** CRF and UCN1 mRNA expression in OA- and RA-FLS after 24 h VIP treatment was measured by relative quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of  $\beta$ -actin in each sample (see Patients and Methods Section). Values are the mean and SEM of triplicate determinations ( $n = 16$  lines). **B:** Presence of CRF and UCN1 in the supernatants of OA- and RA-FLS cultures under basal unstimulated conditions and after treatment with 10 nM of VIP for 24 h was determined by EIA. Values are the mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations ( $n = 8$  lines). **C:** UCN2, UCN3, and CRFR2 mRNA expression in OA- and RA-FLS after 24 h VIP treatment was measured by relative quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of  $\beta$ -actin in each sample (see Patients and Methods Section). Values are the mean and SEM of triplicate determinations ( $n = 16$  lines). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$  versus basal values from each OA and RA-FLS.

production still represents a prominent signaling pathway in VPAC receptor-mediated biological actions (Laburthe et al., 2002). In addition, our previous studies demonstrated that VIP used this signaling pathway in these cells, showing also differential expression of VIP and its functional receptor pattern in RA- and OA-FLS (Juarraz et al., 2008).

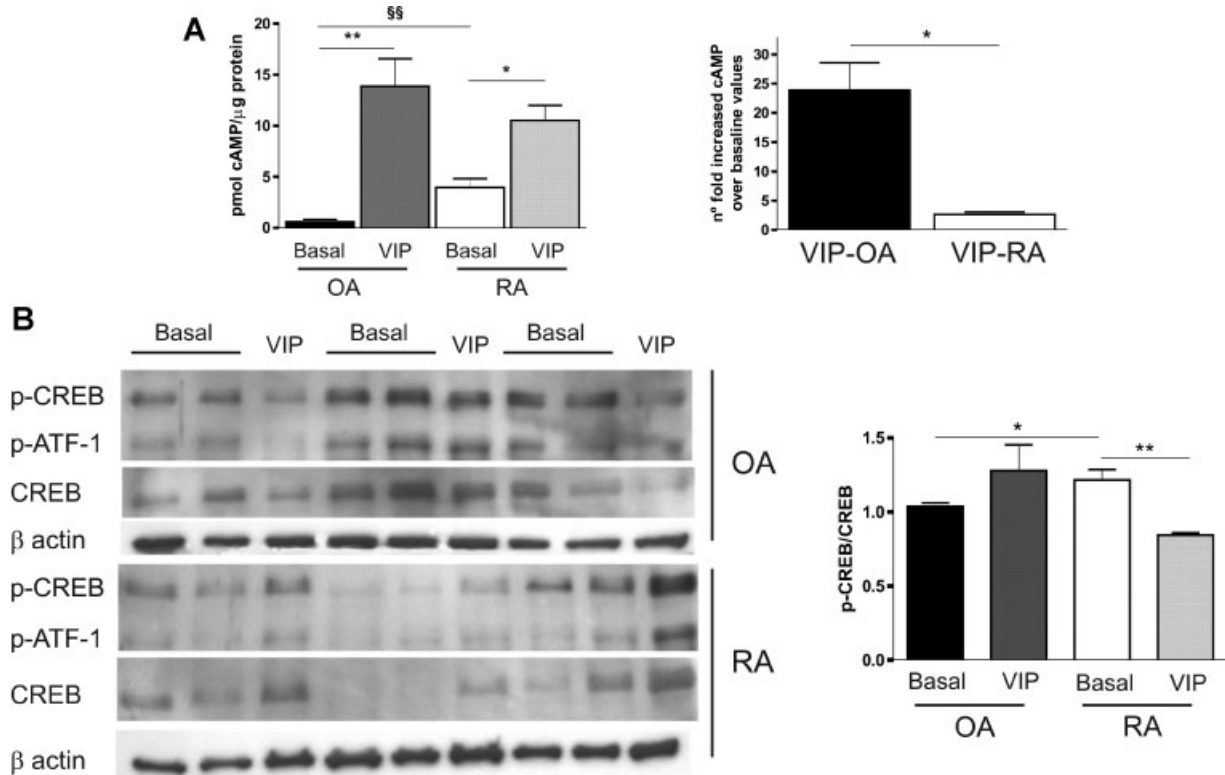
CRF and UCNs also mediate their effects via cAMP, since CRF receptors are GPCRs (Tsatsanis et al., 2007a). Moreover, CRF and UCNs are also regulated by the cAMP/PKA signaling cascade, suggesting that cAMP plays a central role in the regulation of the biological activity and the expression of CRF peptides and VIP. We therefore, determined the intracellular cAMP levels in intact cells and following treatment with 10 nM VIP for 24 h (Fig. 4A), as a marker of activation of both VPAC receptors and CRFR2. Basal levels of intracellular cAMP were significantly higher in RA-FLS than in OA-FLS (Fig. 4A, left). Stimulation of FLS with 10 nM of VIP increased intracellular levels of cAMP. However the extent of the increase over baseline values was significantly lower in the case of RA-FLS (Fig. 4A, right). This result correlated with the suppression of CRF and UCN1 in VIP-treated RA-FLS and not in VIP-treated OA-FLS.

Since cAMP-response element (CRE) controls CRF and UCN1 gene expression (Kageyama and Suda, 2009), we measured the active phosphorylated form of the CREB/ATF-1

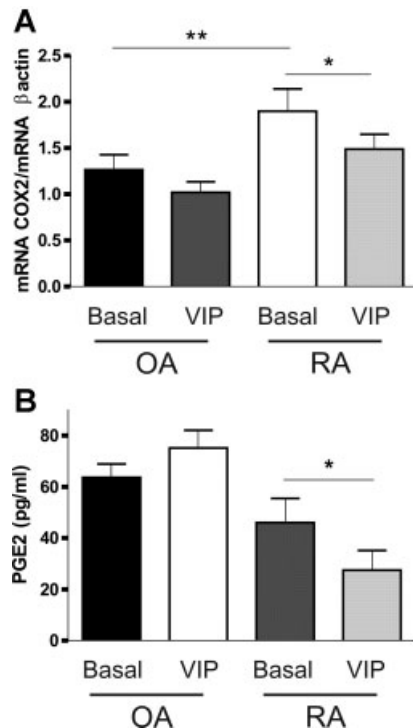
transcription factor family shortly following VIP treatment, to associate it with the effects of VIP on the CRF–UCN expression observed (Fig. 4B). The results indicated no significant increase in p-ATF-1/CREB ratio following VIP treatment in nuclear extracts from OA-FLS or RA-FLS (data not shown). The p-CREB/CREB ratio was significantly higher in the absence of VIP treatment in RA-FLS compared to OA-FLS, in accordance with the intracellular cAMP levels. A significant decrease in this ratio was observed after VIP treatment in RA-FLS. However, an increase in the p-CREB/CREB ratio was shown in OA-FLS after VIP treatment. These data correlated with the intracellular cAMP levels induced by VIP in FLS and the changes in CRF and UCN1 expression. Moreover, these indicate that the ratio of p-CREB/CREB present in the nucleus after VIP treatment is different in OA-FLS from RA-FLS, being higher in OA-FLS and lower in RA-FLS, having direct consequences upon cAMP response element (CRE) present in CRF and UCN1 gene.

#### VIP treatment reduces mediators with inflammatory/destructive functions in RA-FLS

It is known that CRF and UCN1 induce the expression of COX-2 (Tsatsanis et al., 2007b), an enzyme involved in the conversion of the arachidonic acid in PGE<sub>2</sub>, a key mediator of inflammatory/destructive functions in RA. Thus, we next examined whether



**Fig. 4.** Different response of intracellular cAMP levels and cAMP response element binding protein (CREB) activation after VIP stimulation in OA- and RA-FLS. **A** (left): Intracellular levels of cAMP under basal conditions and after 24 h treatment with 10 nM VIP. Differences between basal OA- and RA-FLS were statistically significant,  $^{ss}P < 0.01$ . Differences between basal and VIP treated FLS were statistically significant,  $^{*}P < 0.05$  and  $^{**}P < 0.01$ . Right: Number of fold increased intracellular cAMP over baseline values after 24 h treatment with 10 nM VIP in OA- and RA-FLS.  $^{*}P < 0.05$  OA-VIP versus RA-VIP FLS. Results are the mean SEM of duplicate determinations in three different FLS lines. **B** (left): Western blot analysis of CREB and phosphorylated CREB (p-CREB) either unstimulated conditions (basal) or 10 nM VIP stimulation for 6 h (VIP) in OA- and RA-FLS. Activating transcription factor-1 (p-ATF1), the other CREB family member, is also shown. As charge control, we performed  $\beta$ -actin Western blot. Right: Ratio p-CREB/CREB of relative densitometry units is shown. Values are the mean  $\pm$  SEM of relative densitometry units for each band ( $n = 6$  under unstimulated conditions and  $n = 3$  under VIP-treated conditions, for both OA- and RA-FLS lines).  $^{*}P < 0.05$  OA-basal versus RA-basal values and  $^{**}P < 0.01$  RA-VIP versus RA-basal values.



**Fig. 5.** Effect of VIP treatment on mediators with inflammatory/destructive functions in FLS. **A:** COX-2 mRNA expression in OA- and RA-FLS after 24 h VIP treatment was measured by relative quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of  $\beta$ -actin in each sample (see Patients and Methods Section). Values are the mean and SEM of triplicate determinations ( $n = 16$  for both OA- and RA-FLS lines). \*\* $P < 0.01$  OA-basal versus RA-basal values and \* $P < 0.05$  RA-VIP versus RA-basal values. **B:** The supernatants of OA- and RA-FLS cultures under basal unstimulated conditions and after treatment with 10 nM VIP for 24 h were collected, and levels of PGE2 were determined by EIA. \* $P < 0.05$  RA-VIP versus RA-basal values.

the VIP-mediated inhibition of the proinflammatory peptides CRF and UCN1 in RA had functional consequences (Fig. 5). VIP significantly inhibited both COX-2 mRNA expression and the secretion of PGE2 in RA-FLS (Fig. 5A,B). Significantly higher levels of COX-2 were detected in RA-FLS versus OA-FLS under unstimulated conditions, in agreement with the elevated levels of CRF and UCN1 in RA. However these differences were not detected at the product level of its enzymatic reaction, PGE2.

## Discussion

### CRF and UCN1 expression in human FLS

In the present study, we validate the presence of CRF and UCN1 in isolated OA and RA-FLS, at mRNA and protein level. These peptides were described previously in whole synovial tissue and in different cell types such as lymphocytes, macrophages, endothelial cells, and FLS (Khono et al., 2001; Uzuki et al., 2001). In addition, we demonstrate that both peptides are co-expressed in FLS and secreted to the joint microenvironment exerting their autocrine/paracrine effects. The expression of mRNA and the secretion of both peptides are higher in RA-FLS than in OA-FLS. These data in isolated FLS correlate with previous studies showing that CRF and UCN1

expression is higher in RA than in OA patients (Khono et al., 2001; Uzuki et al., 2001) both in synovial fluid and tissue.

In RA patients, the expression of these peptides has been related both with the degree of inflammation (Uzuki et al., 2001) in the joint and with decreased central hypothalamic CRF production (Crofford et al., 1997). At central level, a deregulation of the stress system in RA associates with reduced anti-inflammatory action of CRF/UCN1 peptides. Chronic stress has been related with the development of RA (Herrmann et al., 2000; Cutolo et al., 2007) and OA (Fuller-Thomson et al., 2009). Patients with RA have decreased plasma cortisol levels (Eijsbouts et al., 2005). Stress in RA stimulates proinflammatory processes due to a loss of sympathetic nerve fibers in the inflamed joint, as well as a failing of the HPA axis leading insufficient cortisol secretion. In contrast to the anti-inflammatory role of CRF and UCN1 via stimulation of the HPA axis, peripheral production of these peptides has a pro-inflammatory role. Thus, knock-out mice for CRF support that peripheral CRF is necessary for the induction of the inflammatory response in vivo (Karalis et al., 1999) and inflammatory arthritis is also significantly reduced in this model (Mattheos et al., 2003). Besides, autoimmune arthritis is reduced by Antalarmin, a CRFR1 specific nonpeptidic antagonist (Webster et al., 2002). On the other hand, UCNs have also been described as endogenous anti-inflammatory agents, suppressing the LPS-induced production of TNF $\alpha$  (Agnello et al., 1998). Gonzalez-Rey et al. (2007) support the finding that UCN1 has an anti-inflammatory action, in the CIA model of RA. In general, it is well accepted that, in in vivo experiments, the anti-inflammatory effects after CRF or UCN1 treatment are through glucocorticoid production mediating the responses to stress and inflammation.

### UCN2, UCN3, and CRFRs expression in FLS

UCN2 and UCN3 are expressed in different areas of the central nervous system, compared with CRF and UCN1. In the periphery, UCN2 has been detected in the adrenals, blood cells, and in the heart, whereas UCN3 has been described in the adrenals, gut, skin, and muscles (Kuperman and Chen, 2008). CRF and UCN1 have equal affinity for the CRFR1, although UCN1 is 40 times more potent than CRF in binding CRFR2. In contrast, UCN2 and UCN3 bind CRFR2 selectively. CRF, UCN1, and UCN2 have been described in normal fibroblasts of human skin (Slominski et al., 2004). We report for the first time, the presence, at mRNA and protein levels, of UCN2 and UCN3 peptides, as well as the expression of CRFR2 and the absence of expression of both peptides in OA compared to RA, whereas the expression of CRFR2 was similar. In summary, CRF and UCNs exhibit a differential pattern of expression in FLS from OA and RA. CRF and UCN1 were more expressed in RA, and UCN2 and UCN3 in OA, while CRFR2 levels were similar in both pathologies.

Previous studies have described the expression of CRFR1 in synovial tissue from patients with OA and RA (Khono et al., 2001; Uzuki et al., 2001), restricted to vascular endothelial (McEvoy et al., 2004) and mast cells (Kempuraj et al., 2004). In the present report we demonstrate that this receptor is not expressed in FLS, at least in the 16 OA- and RA-FLS samples tested. It is generally accepted that, in inflammation, the activation of CRFR1 favors proinflammatory responses (Ralph et al., 2007), whereas the role of CRFR2 remains unclear. CRFR2 can be anti-inflammatory (Dermitzaki et al., 2007), by promoting macrophage apoptosis (Tsatsanis et al., 2005), and proinflammatory, promoting TLR4 expression (Tsatsanis et al., 2006) or the development of intestinal inflammation (Kokkotou et al., 2006). The presence of both CRFR1 and CRFR2 ligands in OA and RA-FLS suggests that they can act either in an autocrine

or paracrine mode, modulating the inflammatory response. In this context, elevated levels of the selective CRFR2 ligands, UCN2 and UCN3 in OA-FLS, may account for anti-inflammatory actions.

### Effects of VIP in the CRF-UCN system

We also studied whether the well-established anti-inflammatory effect of VIP could be mediated, at least in part, by a modulation of the CRF system. VIP produced at mRNA level a significant increase in OA-FLS of the CRF, UCN1, UCN2, and UCN3 that was not apparent at protein level. However, in RA-FLS VIP induced a significant decrease at mRNA and protein levels of the pro-inflammatory peptides CRF and UCN1, and an increase of UCN3 and CRFR2 receptor expressions, potential anti-inflammatory agents. This differential VIP-mediated effect in OA and RA FLS could be explained by both direct and indirect actions. CRF and UCN1 have a CRE in their promoter to regulate their gene transcription (Tsatsanis et al., 2007a). In addition, CRFR2 signals result in the activation of cAMP and CREB. The fact that VIP treatment increased intracellular levels of cAMP 6.5 times more in OA-FLS than in RA, together with the higher p-CREB/CREB ratio in OA-FLS treated with VIP, could explain, at least in part, the differential expression in both pathologies through the effect on cAMP/PKA/CREB signaling. According to this, the decrease of p-CREB/CREB ratio in RA-FLS treated with VIP, could explain the decrease observed in CRF and UCN1 levels after this treatment.

Two indirect actions could also be involved. First, VIP production in OA-FLS is higher than in RA-FLS, and VPAC1 and VPAC2 are more expressed in OA and RA, respectively (Juarranz et al., 2008). Both facts could contribute to the differential effect on cAMP/PKA/CREB signaling. A second indirect cause for the decrease of CRF could be the VIP-mediated reduction of inflammatory mediators. Inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$  or IL-1 $\beta$ , enhanced levels of CRF mRNA in RA-FLS, and IL-6 increased CRF gene expression in the hypothalamus (Kageyama and Suda, 2009). VIP decreased both gene expression and production of TNF $\alpha$  and IL-6 in synovial tissue and FLS from RA patients (Juarranz et al., 2004). Moreover, CREB protein is also implicated in IL-6 production from arthritic synovial cells (Ishizu et al., 2010).

The proinflammatory potential of synovial CRF is mediated, at least in part, by its contribution to PEG2 production (McEvoy et al., 2004). CRF and UCN1 can directly induce COX-2 and PGE2 (Tsatsanis et al., 2007b). COX-2 inhibitors prevent the induction of PEG2 by CRF, and that CRF and PEG2 signal through the induction of CREB and phosphorylated CREB/ATF family members in RA synovial tissues. VIP treatment produced a significant reduction in COX-2/PGE2. Therefore, the VIP-induced inhibition of CRF and UCN1 production in RA-FLS could produce a suppression of COX-2 and PGE2, key mediators that generate joint inflammation and destruction. Finally, PGE2 enhanced the transcriptional activity of CRF promoter in FLS (Murphy et al., 2001), providing a positive feedback loop.

In summary, the data provided in this study point to a role of endogenous CRF, UCNs, and CRFR2 in the OA and RA joint microenvironment. In addition, we confirm the anti-inflammatory function of VIP, through the modulation of the expression of the CRF system that impacts in a reduction of mediators with inflammatory/destructive functions. This study supports an expansion of the therapeutic potential of VIP in the treatment of rheumatic diseases.

### Acknowledgments

This work was supported by grants PI080025, RETICS Program, RD08/0075 (RIER) from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), within VI PNDE I+D+I 2008/2011 and by FEDER funds, GR58/

08 from UCM-BSCH and a predoctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MC).

### Literature Cited

- Abad C, Martínez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, Gomariz RP. 2003. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 124:961–971.
- Abad C, Gomariz RP, Waschek JA. 2006. Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: Focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem* 6:151–163.
- Agnello D, Bertini R, Sacco S, Meazza C, Villa P, Ghezzi P. 1998. Corticosteroid independent inhibition of tumor necrosis factor production by the neuropeptide urocortin. *Am J Physiol* 275:E757–E762.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315–324.
- Baigent SM. 2001. Peripheral corticotrophin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22:809–820.
- Crofford LJ, Sano H, Karalis K, Webster EL, Goldmuntz EA, Chrousos GP, Wilder RL. 1992. Local secretion of corticotrophin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 90:2555–2564.
- Crofford LJ, Sano H, Karalis K, Friedman TC, Epps HR, Remmers EF, Mathern P, Chrousos GP, Wilder RL. 1993. Corticotrophin-releasing hormone in synovial fluids and tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Immunol* 151:1587–1596.
- Crofford LJ, Kalogeras KT, Mastorakos G, Magiakou MA, Wells J, Kanik KS, Gold PW, Chrousos GP, Wilder RL. 1997. Circadian relationships between interleukin (IL)-6 and hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones: Failure of IL-6 to cause sustained hypercortisolism in patients with early untreated rheumatoid arthritis. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1279–1283.
- Cutolo M, Straub RH, Bijlsma JWJ. 2007. Neuroendocrine-immune interactions in synovitis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3:627–634.
- Delgado M, Abad C, Martínez C, Leceta J, Gomariz RP. 2001. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 7:563–568.
- Delgado M, Pozo D, Ganea D. 2004. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev* 56:249–290.
- Dermitzaki E, Tsatsanis C, Minas V, Chatzaki E, Charalampopoulos I, Venihaki M, Androulidaki A, Lambropoulou M, Spiess J, Michalodimitrakis E, Gravanis A, Margioris AN. 2007. Corticotrophin-releasing factor (CRF) and the urocortins differentially regulate catecholamine secretion in human and rat adrenals, in a CRF receptor type-specific manner. *Endocrinology* 148:1524–1538.
- Eijsbouts AM, van den Hoogen FH, Laan RF, Hermus AR, Sweep CG, van de Putte LB. 2005. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 23:658–664.
- Firestein GS. 2003. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 423:356–361.
- Fuller-Thomson E, Stefanyk M, Brennenstuhl S. 2009. The robust association between childhood physical abuse and osteoarthritis in adulthood: Findings from a representative community sample. *Arthritis Rheum* 61:1554–1562.
- Gomariz RP, Martínez C, Abad C, Leceta J, Delgado M. 2001. Immunology of VIP: A review and therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des* 7:89–111.
- Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martínez C. 2006. VIP-PACAP system: New insights for multitarget therapy. *Ann N Y Acad Sci* 1070:51–74.
- Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, O'Valle F, Delgado M. 2007. Therapeutic effect of urocortin on collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory and Th1 responses and induction of regulatory T cells. *Arthritis Rheum* 56:531–543.
- Gutiérrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Martínez C, Gomariz RP, Pablos JL, Leceta J. 2008. Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets: Implications for rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 22:312–317.
- Herrmann M, Scholmerich J, Straub RH. 2000. Stress and rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 26:737–763.
- Ishizu A, Abe A, Miyatake Y, Baba T, Linuma C, Tomaru U, Yoshiki T. 2010. Cyclic AMP response element-binding protein is implicated in IL-6 production from arthritic synovial cells. *Mod Rheumatol* 20:134–138.
- Jimeno R, Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, Martínez C, Juarranz Y, Leceta J. 2010. New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes. *Immunol Cell Biol* 88:734–745.
- Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutiérrez-Cañas I, Palao G, Galindo M, Abad C, Martínez C, Leceta J, Pablos JL, Gomariz RP. 2004. Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology* 43:416–422.
- Juarranz Y, Abad C, Martínez C, Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, Rosignoli F, Gomariz RP, Leceta J. 2005. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:1034–1045.
- Juarranz Y, Gutiérrez-Cañas I, Santiago B, Carrión M, Pablos JL, Gomariz RP. 2008. Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 58:1086–1095.
- Kageyama K, Suda T. 2009. Regulatory mechanisms underlying corticotrophin-releasing factor gene expression in the hypothalamus. *Endocr J* 56:335–344.
- Karalis KP, Kontopoulos E, Muglia LJ, Majzoub JA. 1999. Corticotrophin-releasing hormone deficiency unmasks the proinflammatory effect of epinephrine. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7093–7097.
- Kempuraj D, Papadopoulou NG, Lytinas M, Huang M, Kandere-Grzybowska K, Madhappan B, Boucher W, Christodoulou S, Athanassiou A, Theoharides TC. 2004. Corticotrophin-releasing hormone and its structurally related urocortin are synthesized and secreted by human mast cells. *Endocrinology* 145:43–48.
- Khono M, Kawahito Y, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Yamada R, Inoue K, Kusaka Y, Kubo T, Elenkov JJ, Chrousos GP, Kondo M, Sano H. 2001. Urocortin expression in the synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: Relation to inflammatory activity. *J Clin Endocrinol* 86:4344–4352.
- Kokkotou E, Torres D, Moss A, O'Brien M, Grigoriadis DE, Karalis K, Pothoulakis C. 2006. Corticotrophin-releasing hormone receptor 2-deficient mice have reduced intestinal inflammatory responses. *J Immunol* 177:3355–3361.
- Kuperman Y, Chen A. 2008. Urocortins: Emerging metabolic and energy homeostasis perspectives. *Trends Endocrinol Metab* 19:122–129.

- Laburthe M, Couvineau A, Marie JC. 2002. VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels* 8:137–153.
- Laburthe M, Couvineau A, Tan V. 2007. Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: Structure, models of activation and pharmacology. *Peptides* 28:1631–1639.
- Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Carrión C, Arranz A, Juarraz Y. 2007. Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *Neuroimmunomodulation* 14:134–138.
- Mattheos S, Christodoulou S, Kempuraj D, Kempuraj B, Karalis K, Theoharides TC. 2003. Mast cells and corticotrophin-releasing hormone (CRF) are required for experimental inflammatory arthritis. *FASEB J* 17:C44.
- McEvoy AN, Bresnihan B, FitzGerald O, Murphy EP. 2004. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E<sub>2</sub> production by corticotrophin-releasing hormone contributes to the activated cAMP response element binding protein content in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 50:1132–1145.
- Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. 2007. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. *Synovial fibroblasts. Arthritis Res Ther* 9:223.
- Murphy EP, McEvoy A, Conneely OM, Bresnihan B, FitzGerald O. 2001. Involvement of the nuclear orphan receptor NURR1 in the regulation of corticotrophin-releasing hormone expression and actions in human inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 44:782–793.
- Pashos KA, Kolios G, Chatzaki E. 2009. The corticotrophin-releasing factor system in inflammatory bowel disease: Prospects for new therapeutic approaches. *Drug Discov Today* 14:713–719.
- Ralph JA, Zocco D, Bresnihan B, FitzGerald O, McEvoy AN, Murphy EP. 2007. A role for type I $\alpha$  corticotrophin-releasing hormone receptors in mediating local changes in chronically inflamed tissue. *Am J Pathol* 170:1121–1133.
- Said SI, Hamidi SA, Dickman KG, Szema AM, Lyubsky S, Lin RZ, Jiang YP, Chen JJ, Waschek JA, Kort S. 2007. Moderate pulmonary arterial hypertension in the male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation* 115:1260–1268.
- Schmidt M, Hartung R, Capellino S, Cutolo M, Pfeifer-Leeg A, Straub RH. 2009. Estrone/17 $\beta$ -estradiol conversion to, and tumor necrosis factor inhibition by, estrogen metabolites in synovial cells of patients with rheumatoid arthritis and patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 60:2913–2922.
- Slominski A, Pisarchik A, Tobin DJ, Mazurkiewicz JE, Wortsman J. 2004. Differential expression of a cutaneous corticotrophin-releasing hormone system. *Endocrinology* 145:941–950.
- Smith EM. 2008. Neuropeptides as signal molecules in common leukocytes and the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Brain Behav Immun* 22:3–14.
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Spiess J, Gravanis A, Margioris AN. 2005. Urocortin 1 and urocortin 2 induce macrophage apoptosis via CRFR2. *FEBS Lett* 579:4259–4264.
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Alissafi T, Dermitzaki E, Charalampopoulos I, Roger T, Gravanis A, Margioris AN. 2006. Corticotropin releasing factor and the urocortins induce TLR4 expression in macrophages via activation of PU.1 and AP.1. *J Immunol* 176:1869–1877.
- Tsatsanis C, Dermitzaki E, Venihaki M, Chatzaki E, Minas V, Gravanis A, Margioris AN. 2007a. The corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides as local modulators of adrenal function. *Cell Mol Life Sci* 64:1638–1655.
- Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermitzaki E, Gravanis A, Margioris AN. 2007b. Corticotropin releasing factor receptor 1 (CRF1) and CRF2 agonists exert an anti-inflammatory effect during the early phase of inflammation suppressing LPS-induced TNF- $\alpha$  release from macrophages via induction of COX-2 and PGE<sub>2</sub>. *J Cell Physiol* 210:774–783.
- Uzuki M, Sasano H, Muramatsu Y, Totsune K, Takahashi K, Oki Y, Lino K, Sawai T. 2001. Urocortin in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Sci* 100:577–589.
- Webster EL, Barrientos RM, Contoreggi C, Isaac MG, Ligier S, Gabry KE, Chrousos GP, McCarthy EF, Rice KC, Gold PW, Sternberg EM. 2002. Corticotropin releasing hormone (CRF) antagonist attenuates adjuvant induced arthritis: Role of CRF in peripheral inflammation. *J Rheumatol* 29:1252–1261.



Urokinase plasminogen activator system in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients: modulation by inflammatory mediators and neuropeptides

Pérez-García S, Carrión M, Jimeno R, Ortiz AM, González-Álvaro I, Fernández J, Gomariz RP, Juarranz Y

*J Mol Neurosci.* 2014 Jan;52(1):18-27



# Urokinase Plasminogen Activator System in Synovial Fibroblasts from Osteoarthritis Patients: Modulation by Inflammatory Mediators and Neuropeptides

Selene Pérez-García · Mar Carrión · Rebeca Jimeno · Ana M. Ortiz · Isidoro González-Álvaro · Julián Fernández · Rosa P. Gomariz · Yasmina Juarranz

Received: 24 September 2013 / Accepted: 18 November 2013 / Published online: 7 December 2013  
© Springer Science+Business Media New York 2013

**Abstract** Plasminogen activators are specific proteolytic enzymes implicated in a variety of basic biological processes. The expression of the urokinase plasminogen activator system components is increased in some human diseases, including osteoarthritis. We sought to study the effect of two components of the inflamed synovial microenvironment on this system, IL-1 $\beta$  and fibronectin fragments, elucidating whether corticotropin-releasing factor (CRF) and vasoactive intestinal peptide (VIP) neuropeptides modulate it, and analyzing the physiological consequences in joint destruction by measuring

matrix metalloproteinases-9 and metalloproteinases-13 levels in osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes. We showed that IL-1 $\beta$  and fibronectin fragments stimulated urokinase system contributing to the perpetuation of the destructive cascade in joint. VIP modulated, even at constitutive level, this system, also counteracting the effect of both inflammatory stimuli. However, CRF seemed to be ineffective in controlling the production of these proteinases. Moreover, VIP was able to reduce the constitutive expression of matrix metalloproteinase-13 and the levels of both matrix metalloproteinases after stimulation with the pro-inflammatory stimuli. Our results suggest that the presence of early and later inflammatory mediators, such as IL-1 $\beta$  and fibronectin fragments, increases the urokinase system and the matrix metalloproteinases levels. Whereas CRF did not affect this system, VIP counteracts these actions supporting its therapeutic potential for the treatment of osteoarthritis.

The last two authors share senior authorship.

S. Pérez-García · M. Carrión · R. Jimeno · R. P. Gomariz (✉) · Y. Juarranz (✉)

Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, José Antonio Novais n°2, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain  
e-mail: gomariz@ucm.es  
e-mail: yashina@ucm.es

S. Pérez-García  
e-mail: selene@ucm.es

M. Carrión  
e-mail: marcarrion@ucm.es

R. Jimeno  
e-mail: rebecajimeno@ucm.es

A. M. Ortiz · I. González-Álvaro  
Servicio de Reumatología, Hospital Universitario de la Princesa. Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa, Madrid, Spain

A. M. Ortiz  
e-mail: lanult@yahoo.es

I. González-Álvaro  
e-mail: isidoro.ga@ser.es

J. Fernández  
Servicio de Traumatología, Hospital Universitario de la Princesa. Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa, Madrid, Spain  
e-mail: julfergon@hotmail.com

**Keywords** Osteoarthritis · Urokinase plasminogen activator · VIP · CRF · Synovial fibroblast

## Introduction

Plasminogen activators (PAs) are specific proteolytic enzymes implicated in a variety of basic biological processes, such as fibrinolysis, extracellular matrix degradation, tumor invasiveness, tissue remodeling, and cellular differentiation and proliferation (Li 2005; Rengel 2007). The urokinase plasminogen activator system is composed of urokinase-type plasminogen activator (uPA), urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), and its major physiologic inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) (Smith 2010; Ghosh 2012). The expression of these uPA system components is increased in some human diseases, including cancer and inflammatory

process (Smith 2010). uPA is a serine proteinase that catalyses the conversion from proenzyme plasminogen (PLG) to serine proteinase plasmin. During joint destruction in osteoarthritis (OA), plasmin degrades the extracellular matrix (ECM) directly or indirectly, through activation of other proteolytic enzymes (Jin 2003; Smith 2010). uPA is activated through binding to its receptor, uPAR, which is an important regulator of ECM proteolysis, cell–ECM interactions, as well as an initiator of cell signalling (Smith 2010). uPA–uPAR binding also activates the plasminogen system of ECM proteolysis, where secreted matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role (Jin 2003; Blasi 2010; Smith 2010). Plasmin cleaves and activates MMPs, which are secreted as inactive pro-enzymes, such as MMP-9 and MMP-13 (Smith 2010). It has been shown that MMP-9, also named gelatinase B, is increased in OA joints and that its expression is enhanced by pro-inflammatory cytokines (Rengel 2007). Besides, MMP-13, known as collagenase 3, has been considered the major enzyme involved in OA cartilage erosion. It is able to degrade a wide range of collagenous and non-collagenous ECM macromolecules, and its expression is also induced by pro-inflammatory cytokines (Ahmad 2007; Kim 2012). In arthritic joints, MMP-9 and MMP-13 have been shown to be involved in degradation, there being a positive association with uPA (Kim 2012). uPA–uPAR signalling and PLG activation is controlled by PA inhibitors (PAIs), members of the serine proteinase inhibitors family (serpins) (Serrati 2011; Ghosh 2012). PAI-1 forms a covalent uPA–PAI-1 complex, which inhibits uPA activity by endocytosis, degrading the inactive uPA–PAI-1 complex and recycling the uPAR to the cell surface (Schwab 2004; Blasi 2010). In consequence, this inhibition results in the inactivation of PLG and subsequent block of plasmin-dependent MMP activation (Ghosh 2012).

Changes occurring in the joint synovium during OA generally involve an inflammatory process termed synovitis, including a synovial lining hyperplasia (Scanzello 2012) with an increase in the number of activated macrophage-like and fibroblast-like synoviocytes (MLS and FLS, respectively) (Fuchs 2004; Bian 2012). FLS are the most abundant cell type in synovial tissue, playing a key role by producing cytokines that perpetuate inflammation, and proteases that contribute to cartilage destruction (Bartok 2010). Among the pro-inflammatory cytokines involved in OA, IL-1 $\beta$  is considered one of the main players, mainly associated with cartilage destruction. In OA patients, levels of IL-1 $\beta$  are elevated in the synovial fluid, synovial membrane, and subchondral bone and cartilage (Kapoor 2011). MLS and FLS, together with new recruited cells, establish an autocrine/paracrine network that perpetuates synovitis by degrading adjacent cartilage and bone, and the subsequent liberation of their fragments

(Scanzello 2012). This degradation generates fragments of ECM components that exert inflammatory actions. Fibronectin (Fn) is an adhesive 450 kDa dimeric glycoprotein of the ECM present in many tissues including cartilage and synovium (Yasuda 2006). Its proteolytic cleavage during the cartilage degeneration process liberates fibronectin fragments (Fn-fs) to the joint microenvironment (Ding 2008). These fragments have cartilage proteolytic activities, enhancing MMPs production and suppressing proteoglycan synthesis (Ding 2008, 2009).

During synovitis, complex interactions arise between the endocrine, nervous, and immune systems (Cutolo 2007), wherein different hormones, cytokines, and neurotransmitters (including neuropeptides) interact (Smith 2008). In this context, the vasoactive intestinal peptide (VIP) is one of the best-studied immunoregulatory neuropeptides playing important roles in both innate and acquired immunity. Its immunomodulatory properties are mediated by binding to the G-protein-coupled receptors, VPAC<sub>1</sub> and VPAC<sub>2</sub> (Juarranz 2008). Several beneficial effects have been observed with VIP treatment in an animal model of rheumatoid arthritis (RA), showing a protective effect upon cartilage and bone destruction (Delgado 2001; Juarranz 2005). Furthermore, a potential therapeutic effect of VIP in RA and OA has been shown in different *ex vivo* studies (Juarranz 2004; Carrion 2011; Perez-Garcia 2011). On the other hand, the corticotropin-releasing factor (CRF) is the major mediator of the stress response, involved in different disorders. In addition to its immunosuppressive and anti-inflammatory functions in the hypothalamus–pituitary–adrenal (HPA) axis (Tsatsanis 2007b), inflammatory and immunostimulatory actions have been described at local level (Baigent 2001; Tsatsanis 2007a; Smith 2008). CRF exerts its effects by binding to CRFR1 and CRFR2 receptors, expressed in central and peripheral tissues, including immune cells, having different functions (Tsatsanis 2007b). We have previously described the expression of VIP, CRF, and their receptors, as well as the interrelation between both systems of neuropeptides in FLS from RA and OA patients (Juarranz 2008; Perez-Garcia 2011).

Taking into account that FLS are important elements that perpetuate synovitis and degrade adjacent cartilage and bone (Scanzello 2012) and that the constitutive expression of the uPA system has been previously described in FLS from OA patients (Cericic 1998), the main objectives of this study were: (1) to study whether two components of the inflamed synovial microenvironment, IL-1 $\beta$  as inflammatory cytokine, and Fn fragments derived from cartilage destruction, are able to modulate the uPA system in OA-FLS, (2) to elucidate if the effect of two neuropeptides, VIP and CRF, present also in the joint, modulates the uPA system, and (3) to analyze the

physiological consequences of these treatments in cartilage destruction by measuring MMPs levels.

## Materials and Methods

### Patients and FLS Cultures

Synovial tissue samples were obtained from active OA patients at the time of knee prosthetic replacement surgery. Patients had advanced disease and, in all cases, were diagnosed of primary OA, excluding trauma, inflammatory disease, and other structural causes of secondary OA. The study was approved by the clinical research ethics committee of the Hospital La Princesa in Madrid, Spain, and all biopsy samples were obtained after subjects gave their informed consent.

Fibroblast cultures were established by explant growth of 1 mm fragments of synovial villi dissected from synovial biopsies which were cultured in 10 % heat-inactivated fetal bovine serum/Dulbecco's modified Eagle's medium at 5 % CO<sub>2</sub> and 37 °C. After three passages, residual contamination by macrophages was avoided, and monocultures of FLS were obtained and used for experiments until passage 9.

### FLS Treatments

Synovial fibroblasts were cultured in 100 mm plates and allowed to grow to 80–90 % confluence. FLS were cultured in the presence of the following agents: 10 ng/ml IL-1 $\beta$  (Immunotools GmbH, Friesoythe, Germany) for 6 h, or 0.01 M Fn fragments 45 kDa for 24 h. Fn fragments were purchased commercially pre-designed from human plasma fibronectin. Briefly, the N-terminal 70 kDa fragment is obtained by cathepsin D digestion; tryptic digestion of this fragment yields two peptides: the N-terminal 30 kDa heparin binding fragment and the 45 kDa gelatin binding fragment (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). These treatments were applied alone or in combination with 10 nM VIP (Neosystems, Strasbourg, France) or 10 nM CRF (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Karlsruhe, Germany). Some FLS were cultured without treatment as the basal condition.

### Cellular Lysates Preparation

To detect uPAR in the FLS, cellular lysates were prepared. Briefly, FLS cultured in 100-mm Petri dishes with the different treatments described, were scraped into phosphate buffered saline (PBS), centrifuged and resuspended in lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), and other proteinase inhibitors. After the addition of the buffer, lysates were kept on ice for 20–30 min and centrifuged again.

Supernatants containing the plasma membrane extracts were collected and stored at -80 °C. Protein content was measured using a QuantiPro™ BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich).

### Semiquantitative Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay

FLS were cultured in 100-mm Petri dishes in the presence of the different treatments described before. Total RNA was obtained from FLS cultures using Tri® Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) for cellular homogenization, chloroform for phase separation, and isopropanol for RNA precipitation. Total RNA was quantified with NanoDrop® spectrophotometer and stored at -80 °C. The expression of mRNA in cultured FLS was analyzed by semi-quantitative real-time RT-PCR. Total RNA (2  $\mu$ g) was reverse-transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Semiquantitative real-time PCR analysis was performed using a TaqMan Gene Expression Master Mix with manufactured-pre-designed primers and probes for  $\beta$ -actin (NM\_001101.3) and uPA (NM\_001145031.1) (Applied Biosystems). For relative quantification, we compared the amount of target normalized with an endogenous reference ( $\beta$ -actin), using the formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , as previously described (Juarranz 2008). Culture supernatants were harvested and stored at -20 °C for the subsequent assay analysis.

### Detection of uPA Activity in Culture Supernatants

uPA activity was measured in FLS culture supernatants using an uPA activity assay kit (Millipore, Billerica, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. This kit contains a chromogenic substrate, pyroGlu-Gly-Arg-pNA\*HCl, which is cleaved by active uPA present in samples, releasing the pNA group and resulting in a colored product detectable at 405 nm, equivalent to the cleavage of the peptide bond between Arg 560 and Val 561 of the plasminogen.

### Assay Analysis of uPAR, PAI-1, MMP-9, and MMP-13

The levels of uPAR in the cellular lysates of the FLS were measured by using a commercial ELISA (enzyme-linked immunosorbent Assay) kit, according to the manufacturer's instructions (AbFrontier, Seoul, Korea). The minimum detectable was less than 4 pg/ml.

The levels of PAI-1, MMP-9, and MMP-13 in FLS culture supernatants was measured by using a commercial ELISA kit (eBioscience, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instruction. The minimum detectable was 29 pg/ml, 0.05, and 0.18 ng/ml, respectively.

## Statistical Analysis

Results are expressed as the mean±standard error of the mean (SEM). Samples were tested for normality by a Normality Test. The significance of the results was analyzed using Student's two-tailed *t* test, Mann–Whitney *W*-test, and ANOVA (analysis of variance) test, using the GraphPad Prism version 4.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA). *P* values less than 0.05 were considered significant.

## Results

### Effect of Neuropeptides on Constitutive Expression of uPA System in OA-FLS

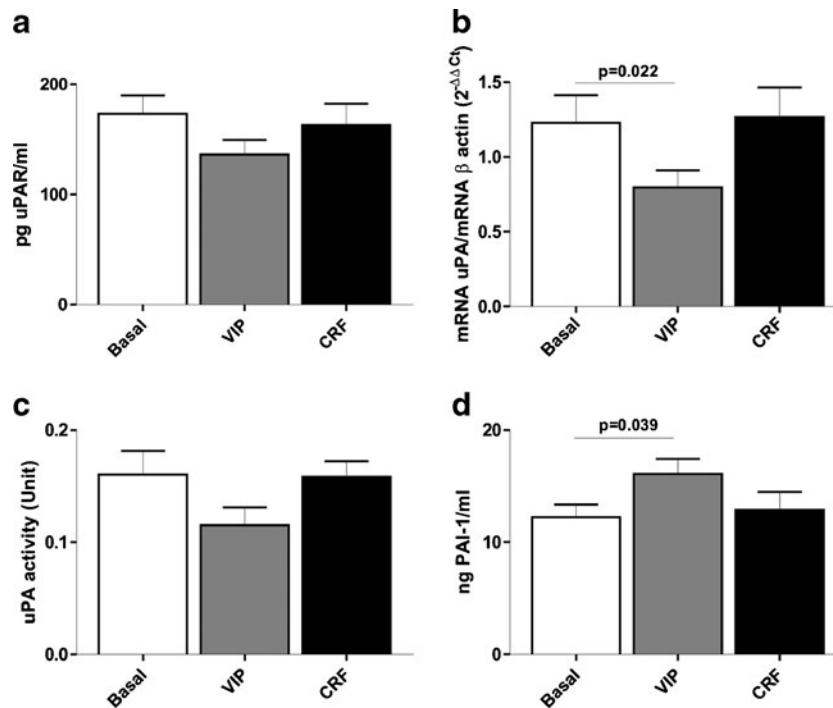
We first examined the effect of VIP and CRF on the constitutive expression of three uPA system components: uPAR, uPA, and PAI-1, in OA-FLS (Fig. 1).

uPAR is associated with the external surface of the plasma membrane by a glycosyl phosphatidylinositol anchor, so we measured the levels of uPAR protein present in cellular lysates of FLS under basal unstimulated conditions by ELISA. Non-significant effects were observed on uPAR expression after treatments. uPAR regulates the activity of the plasminogen

activation system by binding uPA. Thus, we next examined the constitutive uPA mRNA expression in OA-FLS under basal unstimulated conditions and after treatment with VIP or CRF. VIP treatment significantly reduced uPA mRNA expression. Since activated uPA cleaves plasminogen generating the active proteinase plasmin, we determined this activation in the supernatants cultures using an uPA Activity Assay kit, with a chromogenic substrate which is cleaved by uPA, equivalent to convert plasminogen to plasmin. We did not detect significant effects on its activity. Moreover, the proteolytic activities of uPA and plasmin are inactivated by PAI-1. Then, we determined its levels in the culture supernatants by ELISA, showing that VIP significantly increased PAI-1 expression. All in all, VIP decreased constitutive uPA system in OA-FLS by the reduction of uPA mRNA expression and the increase of PAI-1, whereas CRF did not have any significant effect on the constitutive uPA system.

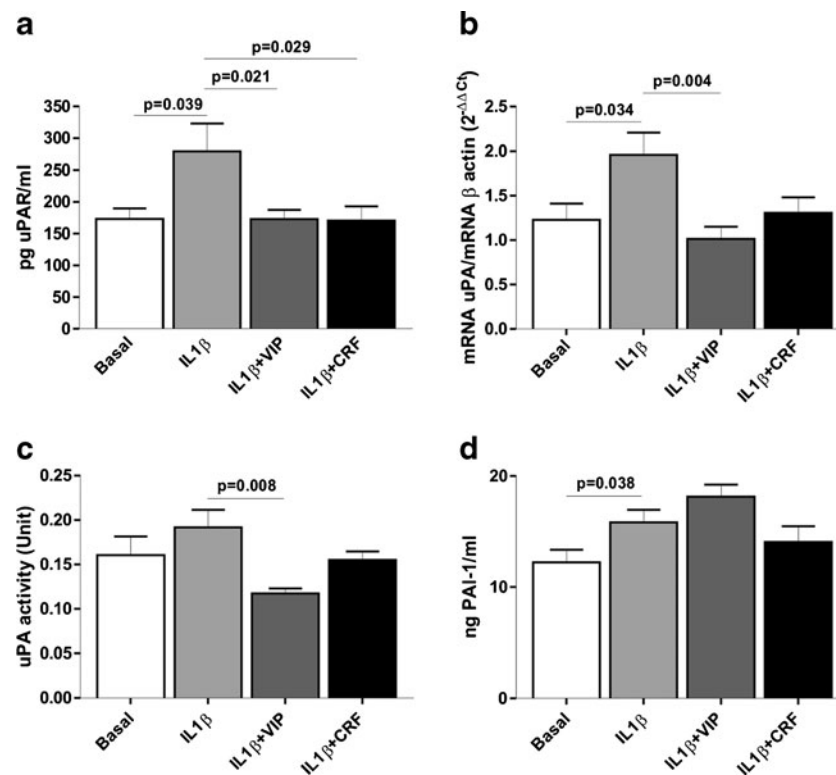
### Effect of IL-1 $\beta$ and Modulation by Neuropeptides on the uPA System in OA-FLS

IL-1 $\beta$  is a pro-inflammatory mediator present in the joint microenvironment at the beginning of the inflammatory course of OA. Thus, we analyzed the effect of this cytokine



**Fig. 1** Effect of neuropeptides on constitutive uPA system expression in OA-FLS. OA-FLS were cultured under basal unstimulated conditions and after treatments with VIP or CRF 10 nM for 6 h. **a** uPAR levels were determined in the cellular lysates of OA-FLS cultures by ELISA. Values are the mean±SEM of eight FLS lines measured in duplicate. **b** uPA mRNA expression in OA-FLS was measured by semi-quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of  $\beta$ -actin in each sample (see

“Materials and Methods” section). Values are the mean±SEM of nine FLS lines measured in triplicate. **c** uPA activity was determined in the supernatants of OA-FLS cultures using an uPA Activity Assay kit. Values are the mean±SEM of five FLS lines measured in duplicate. **d** PAI-1 release in the supernatants of OA-FLS cultures was analyzed by ELISA. Values are the mean±SEM of 7 FLS lines measured in duplicate. *P* values are shown when differences between groups of treatments were statistically significant



**Fig. 2** Effect of IL-1 $\beta$  on the uPA system in OA-FLS. Modulation by neuropeptides. OA-FLS were cultured under basal unstimulated conditions and after treatments with IL-1 $\beta$  10 ng/ml $\pm$ VIP or CRF 10 nM for 6 h. **a** uPAR levels were determined in the cellular lysates of OA-FLS cultures by ELISA. Values are the mean $\pm$ SEM of eight FLS lines measured in duplicate. **b** uPA mRNA expression in OA-FLS was measured by semi-quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of  $\beta$ -actin in each sample (see “Materials and Methods” section). Values

are the mean $\pm$ SEM of nine FLS lines measured in triplicate. **c** uPA activity was determined in the supernatants of OA-FLS cultures using an uPA Activity Assay kit. Values are the mean $\pm$ SEM results of five FLS lines measured in duplicate. **d** PAI-1 release in the supernatants of OA-FLS cultures was analyzed by ELISA. Values are the mean $\pm$ SEM of seven FLS lines measured in duplicate. *P* values are shown when differences between groups of treatments were statistically significant

on the uPA system in OA-FLS, as well as how neuropeptides are able to modulate it after 6 h treatments (Fig. 2).

Focusing on uPAR, IL-1 $\beta$  increased significantly uPAR levels in the plasma membrane extracts of the FLS. Both, VIP and CRF significantly reduced the IL-1 $\beta$ -stimulated uPAR expression in OA-FLS. In addition, stimulation with IL-1 $\beta$  significantly increased the uPA mRNA expression. Here again, VIP counteracted its effect decreasing uPA mRNA expression and activity. On the other hand, the treatment with IL-1 $\beta$  even augmented the PAI-1 levels in the FLS culture supernatants. None of the neuropeptides modified the IL-1 $\beta$ -stimulated PAI-1 expression in OA-FLS.

According to these results, VIP was able to counteract IL-1 $\beta$  stimulated uPA system, decreasing uPAR and uPA expression as well as its activity. However, CRF only had effect on the uPAR, reducing its levels on the plasma membrane of the OA-FLS.

#### Activation of the uPA System by Fn Fragments and Effect of Neuropeptides in OA-FLS

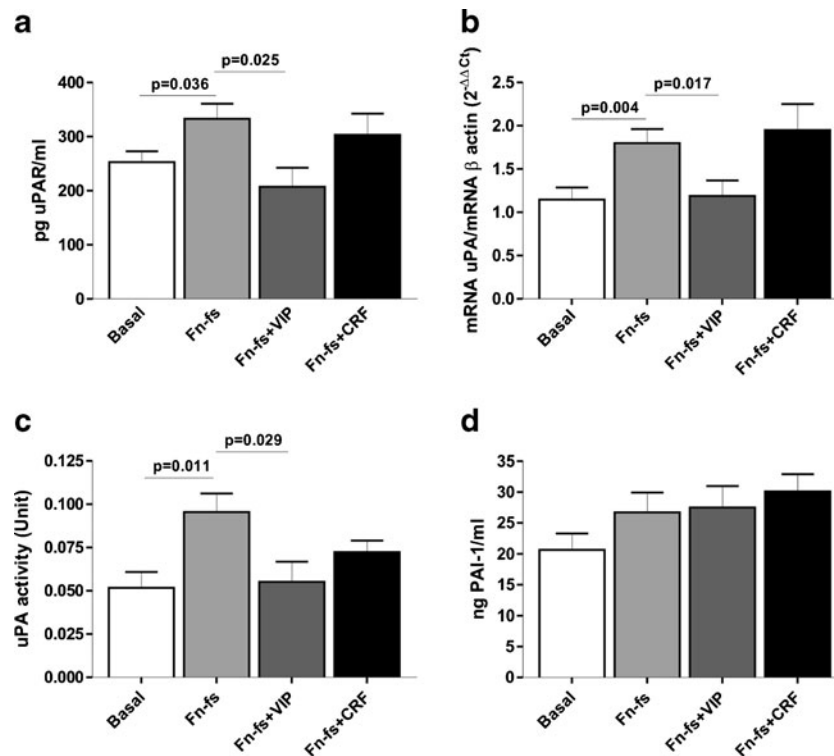
The proteolytic cleavage of fibronectin during the cartilage degeneration liberates Fn fragments with proteolytic activities

(Kapoor 2011; Bian 2012), functioning as one of the later stimuli in the degradative process of OA. Thus, we consider study the effect of the treatment with Fn fragments 45 kDa for 24 h in the uPA system expression, as well as its modulation by neuropeptides in OA-FLS (Fig. 3).

Fn fragments induced a significant augment of the uPAR expression which was also significantly decreased after VIP treatment. Moreover, Fn fragments induced a significant increase in uPA mRNA expression and activity, while VIP significantly reduced these levels. Fn fragments did not affect the PAI-1 levels, and no changes were observed in its expression with VIP in the Fn fragment-stimulated FLS. No effects were observed with the CRF treatment in any of the parameters studied.

#### Constitutive, IL-1 $\beta$ and Fn Fragments-Mediated Production of Matrix Metalloproteinases

The active plasmin generated by the action of uPA is able to activate MMPs, such as the gelatinase MMP-9 and the collagenase MMP-13 (Smith 2010). Therefore, we measured by ELISA in the supernatants of the FLS cultures, the levels of



**Fig. 3** Effect of Fn fragments 45 kDa on the uPA system in OA-FLS. Modulation by neuropeptides. OA-FLS were cultured under basal unstimulated conditions and after treatments with Fn fragments 45 kDa, 0.01 M±VIP, or CRF 10 nM for 24 h. **a** uPAR levels were determined in the cellular lysates of OA-FLS cultures by ELISA. Values are the mean±SEM of five FLS lines measured in duplicate. **b** uPA mRNA expression in OA-FLS was measured by semi-quantitative real-time RT-PCR and corrected

for mRNA expression of  $\beta$ -actin in each sample (see “Materials and Methods” section). Values are the mean±SEM of eight FLS lines measured in triplicate. **c** uPA activity was determined in the supernatants of OA-FLS cultures using an uPA Activity Assay kit. Values are the mean±SEM results of five FLS lines measured in duplicate. **d** PAI-1 release in the supernatants of OA-FLS cultures was analyzed by ELISA. *P* values are shown when differences between groups of treatments were statistically significant

MMP-9 and MMP-13 to reflect the relationship between the above-mentioned effects on uPA system (Fig. 4).

Since CRF did not show critical effects on the uPA system, we decided to exclude it from this study. Both IL-1 $\beta$  and Fn fragments significantly increased MMP-9 production. Despite that no effects were observed with VIP treatment alone, co-treatment with VIP in the presence of the pro-inflammatory stimuli resulted in a significant decrease of MMP-9. In the case of MMP-13, VIP significantly reduced its constitutive levels. Stimulation with IL-1 $\beta$  resulted in a significant augment of MMP-13 production, while the co-treatment with VIP tended to counteract this effect. Moreover, Fn fragments also increased MMP-13 production, and treatment with Fn fragments plus VIP also induced a significant decrease of MMP-13.

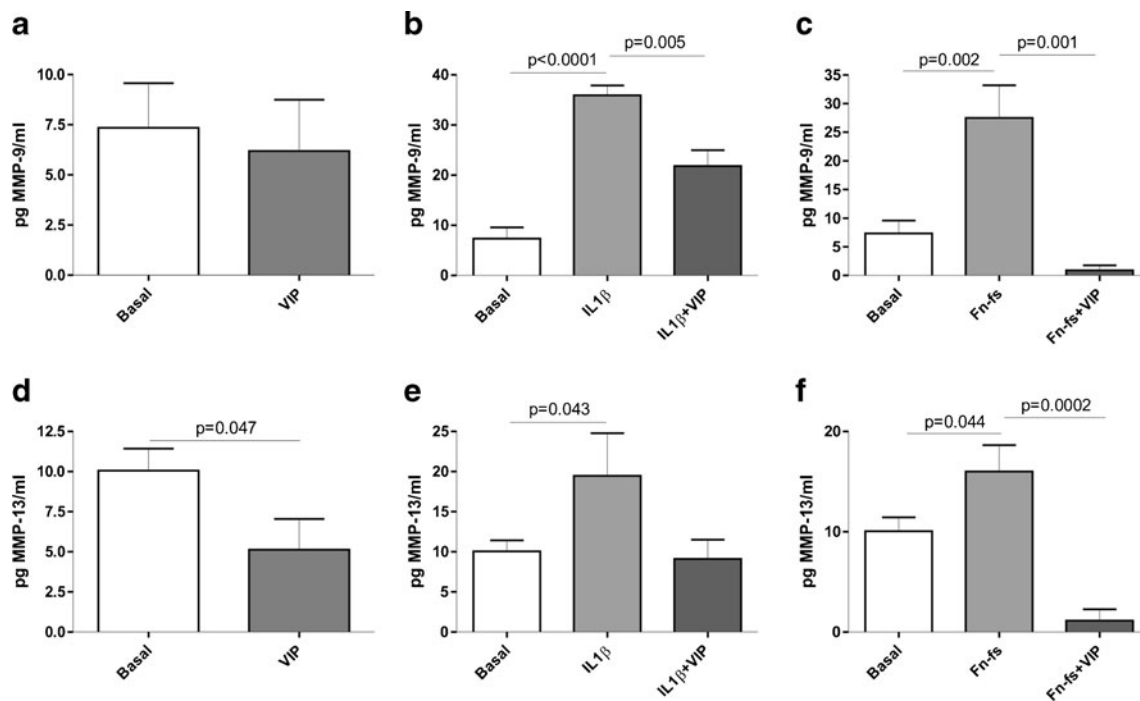
In conclusion, the effect produced on uPA system by early and later inflammatory mediators and VIP correlated with the production of MMPs involved in its destruction.

## Discussion

To date, the role of chondrocyte proteinases in cartilage destruction has been studied broadly, but the contribution of other cell types present in joint has been less assessed.

Previous studies have shown that RA-FLS secrete uPA and PAI-1 and express uPAR constitutively (Ronday 1996; Guiducci 2005), being less known their presence and function in OA. In this study, we examined in OA-FLS the effect of two inflammatory mediators, IL-1 $\beta$  and Fn fragments. These mediators play crucial roles in the initiation and development of OA, on the expression and activity of the uPA system, as well as on the MMP-9 and MMP-13 production. Besides, we studied the modulatory action of two peptides present in the OA inflamed microenvironment, VIP and CRF, to elucidate its therapeutic potential in osteoarthritis.

In agreement with early studies, our results confirmed the constitutive expression of uPA system in OA (Busso 1997; Cerinic 1998). Overexpression of uPA, uPAR, and PAI-1 has been previously described in the synovial tissue of patients with RA (Serrati 2011), and after IL-1 $\beta$  stimulation in rat and human chondrocytes (Schwab 2004; Zhu 2009). Moreover, increased levels of Fn fragments have been described before, in cartilage and synovial fluid from OA patients (Long 2013). In the present study, we analyzed, for the first time, the modulation of the uPA system by these Fn fragments. We showed that both IL-1 $\beta$ , as early pro-inflammatory cytokine, and Fn fragments, as late mediators produced after ECM degradation, increased uPA and uPAR expression. However,



**Fig. 4** Constitutive, IL-1 $\beta$  and Fn fragments-mediated production of matrix metalloproteinases. OA-FLS were cultured under basal unstimulated conditions and after treatment with VIP 10 nM for 6 h. OA-FLS were also cultured with IL-1 $\beta$  10 ng/ml $\pm$ VIP 10 nM for 6 h, or Fn fragments 45 kDa 0.01 M $\pm$ VIP 10 nM for 24 h. **a–c** MMP-9 levels released into the culture supernatants were determined by ELISA. Values

are the mean $\pm$ SEM of five FLS lines measured in duplicate and expressed as protein concentration. **d–f** MMP-13 levels released into the culture supernatants were determined by ELISA. Values are the mean $\pm$ SEM of five FLS lines measured in duplicate and expressed as protein concentration. *P* values are shown when differences between groups of treatments were statistically significant

PAI-1 production was increased after IL-1 $\beta$  stimulation, whereas Fn fragments had no effect on it, suggesting that the presence of these fragments contribute to the perpetuation of the destructive cascade in the joint. Furthermore, only the Fn fragments significantly induced the conversion of PLG to plasmin by increasing uPA activity.

VIP is a neuropeptide with beneficial effects in the inflammatory process and a potential therapeutic agent in the treatment of RA and OA (Delgado 2001; Juarranz 2004, 2005; Carrion 2011; Perez-Garcia 2011). Moreover, it has been shown that high VIP levels correlate with a decrease of the OA severity progress (Jiang 2012). Besides, some data suggest that VIP can also exert actions considered to be pro-inflammatory. VIP KO mice were found to be remarkably resistant to encephalomyelitis induction, playing an unanticipated permissive and/or pro-inflammatory role in the propagation of the inflammatory response in the central nervous system. As the authors suggested, it could be explained by the impaired induction in endothelial, astroglial, or myeloid cell expression of any of several molecules implicated in T cell penetrance of the blood–brain barrier (Abad 2010). Furthermore, some authors have described the pro-inflammatory effect of VIP on cancer cells. In human prostate epithelial cells transformation, VIP acts as a cytokine-inducing tumorigenic potential, including stimulation of MMP-2 and MMP-9 expression and activity (Fernandez-

Martinez 2010). However, a recent study indicates that VIP induces oxidative stress and suppresses metastatic potential in human clear cell renal cell carcinoma (Vacas 2013). Further studies are required to clarify these pro-inflammatory effects of VIP. On the other hand, the role of CRF is controversial, having different effects in the inflammatory process (Intekhab-Alam 2013).

Here we described that VIP modulates, even at constitutive level, the uPA fibrinolytic system by reducing the expression of uPA and increasing PAI-1 production. In addition, in the presence of both inflammatory stimuli, IL-1 $\beta$  and Fn fragments, VIP counteracted their effect reducing uPA and uPAR expression. All together, these data support the potential of VIP as an anti-inflammatory agent in rheumatic diseases, corroborating its protective role (Sethi 2013). Concerning CRF, the only effect observed was the downregulation of uPAR after IL-1 $\beta$  stimulation. Thus, this peptide seems to be ineffective in controlling the production of these serin proteinases.

In addition to plasminogen, other substrates susceptible to be activated by uPA and plasmin are MMPs (Jin 2003; Blasi 2010; Smith 2010). MMP-9 degrades a number of ECM molecules including type XI collagen, which is condrospecific. In this regard, a correlation of the uPA system with MMP-9 in synovial fluid from patients with gouty arthritis (Chu 2006), as well as a MMP-9 increased expression in human OA joints have been described (Rengel 2007).

Likewise, MMP-13 degrades type II collagen, an abundant matrix protein that provides to cartilage its resistance to mechanical loads. Mice lacking MMP-13 are resistant to cartilage erosion, a characteristic of OA (Little 2009).

To date, the role of these MMPs in OA has been mainly studied in joint cartilage. In this sense, IL-1 $\beta$  increases MMP-9 and MMP-13 expression in rabbit articular chondrocytes (Yang 2010). MMP-9 expression is increased in human RA and OA joints and enhanced after IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  treatment (Poduval 2007; Rengel 2007). These cytokines, together with IFN $\gamma$ , induce also MMP-13 expression in human chondrocytes (Su 2005; Ahmad 2007). MMP-9 production by FLS had been previously reported in RA and OA patients (Poduval 2007; Xue 2007). Our results corroborated that FLS also contributed to the production of MMP-9 constitutively and after IL-1 $\beta$  stimulation. Moreover, we showed that FLS produced MMP-13 constitutively and after IL-1 $\beta$  stimulation. Fuchs et al. had demonstrated MMP-13 production only after IL-1 $\beta$  combined with TNF $\alpha$  in FLS (Fuchs 2004). Discrepancies among these results might be attributed to the IL-1  $\beta$  exposure time.

Primarily, the physiological role of MMP-9 has been focused in cancer. In this sense, the fibronectin-mediated MMP-9 production by human and murine macrophages, as well as in human prostatic epithelial cells lines, has been described (Hartney 2011; Moroz 2013). However, nowadays, its vascular and inflammatory involvement is emerging (Vandooen 2013). Supporting this fact, we reported for the first time that Fn fragment treatment induced the upregulation of MMP-9 production in OA. Regarding Fn fragment effects on MMP-13, previous studies have reported its induction in pig chondrocytes (Stanton 2002), and more recently, in human ankle articular cartilage (Long 2013). Here we showed the Fn fragment induction of MMP-13 expression in OA-FLS. The finding that MMP-9 and MMP-13 are induced by IL-1 $\beta$  and Fn fragments could be of interest to target these MMPs in acute exacerbations of chronic diseases such as OA.

Modulation of VIP on the uPA system could have its physiological outcome in the MMP-9 and MMP-13 production by OA-FLS. MMPs levels were reduced with VIP treatment after stimulation with IL-1 $\beta$  and Fn fragments. Even VIP was able to reduce the constitutive expression of MMP-13. The VIP effect on the MMP-9 production has been previously studied in human renal cell carcinoma, where VIP also decreased its expression (Vacas 2013). Moreover, it has been described in FLS from RA patients that the IL-1 $\beta$ -induced expression of MMP-13 and MMP-9 is mediated through the activation of the RANKL receptor and NF $\kappa$ B transcription factor (Kim 2009; Frank 2013). Previously, it has been reported that VIP decreases these osteoclastogenic molecules in RA (Juarranz 2005). Although more experiments are needed to clarify the mechanism, the inhibitory effect of VIP on this system could be mediated by these molecules.

Diverse studies have shown uPA system as a potent target for the treatment of different diseases. Some drugs have been demonstrated to be effective in the inhibition of uPA and uPAR in cancer treatment (Szinwong 2013). Concerning rheumatic diseases, inhibitors of uPA and uPAR reduce RA-FLS invasion and proliferation (Serrati 2011). Besides, in OA patients, intra-articular sodium hyaluronate injections seem to decrease the uPA system expression, alleviating pain (Tang 2010).

Our results support that activation of the uPA system signalling, together with its impact on the MMP-9 and MMP-13 production, could contribute to the perpetuation of ECM degradation and articular destruction. In summary, both uPA system and MMPs point to be promising therapeutic targets in OA. Furthermore, this study corroborates the healing potential of VIP in OA by the modulation of the uPA system, MMP-9, and MMP-13, supporting the development of new OA therapies based in VIP treatment.

**Acknowledgments** This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (PI11/00195, PI12/00758, PI11/00505, RETICS RD08/0075, and RD12/0009/0002, RIER) within VI PNDE I+D+I by FEDER funds from EU and SIII0/BMD-2350 from Comunidad Autónoma de Madrid (CAM). By grants from ISCIII to RJ, MC, and a predoctoral fellowship (SPG) from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

## References

- Abad C, Tan YV, Lopez R et al (2010) Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19555–19560
- Ahmad R, Qureshi HY, El Mabrouk M, Sylvester J, Ahmad M, Zafarullah M (2007) Inhibition of interleukin 1-induced matrix metalloproteinase 13 expression in human chondrocytes by interferon gamma. *Ann Rheum Dis* 66:782–789
- Baigent SM (2001) Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides* 22:809–820
- Bartok B, Firestein GS (2010) Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 233:233–255
- Bian Q, Wang YJ, Liu SF, Li YP (2012) Osteoarthritis: genetic factors, animal models, mechanisms, and therapies. *Front Biosci* 4:74–100
- Blasi F, Sidenius N (2010) The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett* 584:1923–1930
- Busso N, Peclat V, So A, Sappino AP (1997) Plasminogen activation in synovial tissues: differences between normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis joints. *Ann Rheum Dis* 56:550–557
- Carrion M, Juarranz Y, Perez-Garcia S et al (2011) RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum* 63:1626–1636
- Cerinic MM, Generini S, Partsch G et al (1998) Synoviocytes from osteoarthritis and rheumatoid arthritis produce plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 and display u-PA receptors on their surface. *Life Sci* 63:441–453

- Chu SC, Yang SF, Lue KH, Hsieh YS, Hsiao TY, Lu KH (2006) Urokinase-type plasminogen activator, receptor, and inhibitor correlating with gelatinase-B (MMP-9) contribute to inflammation in gouty arthritis of the knee. *J Rheumatol* 33:311–317
- Cutolo M, Straub RH, Bijlsma JW (2007) Neuroendocrine-immune interactions in synovitis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3:627–634
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP (2001) Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 7:563–568
- Ding L, Guo D, Homandberg GA (2008) The cartilage chondrolytic mechanism of fibronectin fragments involves MAP kinases: comparison of three fragments and native fibronectin. *Osteoarthr Cartil* 16:1253–1262
- Ding L, Guo D, Homandberg GA (2009) Fibronectin fragments mediate matrix metalloproteinase upregulation and cartilage damage through proline rich tyrosine kinase 2, c-src, NF-kappaB and protein kinase Cdelta. *Osteoarthr Cartil* 17:1385–1392
- Fernandez-Martinez AB, Bajo AM, Isabel AM, Sanchez-Chapado M, Prieto JC, Carmena MJ (2010) Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces malignant transformation of the human prostate epithelial cell line RWPE-1. *Cancer Lett* 299:11–21
- Frank S, Peters MA, Wehmeyer C et al (2013) Regulation of matrixmetalloproteinase-3 and matrixmetalloproteinase-13 by SUMO-2/3 through the transcription factor NF-kappaB. *Ann Rheum Dis* 72:1874–1881
- Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B (2004) Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthr Cartil* 12:409–418
- Ghosh AK, Vaughan DE (2012) PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 227:493–507
- Guiducci S, Del Rosso A, Cinelli M et al (2005) Rheumatoid synovial fibroblasts constitutively express the fibrinolytic pattern of invasive tumor-like cells. *Clin Exp Rheumatol* 23:364–372
- Hartney JM, Gustafson CE, Bowler RP, Pelanda R, Torres RM (2011) Thromboxane receptor signaling is required for fibronectin-induced matrix metalloproteinase 9 production by human and murine macrophages and is attenuated by the Arhgef1 molecule. *J Biol Chem* 286:44521–44531
- Intekhab-Alam NY, White OB, Getting SJ et al (2013) Urocortin protects chondrocytes from NO-induced apoptosis: a future therapy for osteoarthritis? *Cell Death Dis* 4:e717
- Jiang W, Gao SG, Chen XG et al (2012) Expression of synovial fluid and articular cartilage VIP in human osteoarthritic knee: a new indicator of disease severity? *Clin Biochem* 45:1607–1612
- Jin T, Tarkowski A, Carmeliet P, Bokarewa M (2003) Urokinase, a constitutive component of the inflamed synovial fluid, induces arthritis. *Arthritis Res Ther* 5:R9–R17
- Juarranz MG, Santiago B, Torroba M et al (2004) Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)* 43:416–422
- Juarranz Y, Abad C, Martinez C et al (2005) Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7:R1034–1045
- Juarranz Y, Gutierrez-Canas I, Santiago B, Carrion M, Pablos JL, Gomariz RP (2008) Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 58:1086–1095
- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 7:33–42
- Kim KW, Cho ML, Oh HJ et al (2009) TLR-3 enhances osteoclastogenesis through upregulation of RANKL expression from fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 124:9–17
- Kim KS, Lee YA, Choi HM, Yoo MC, Yang HI (2012) Implication of MMP-9 and urokinase plasminogen activator (uPA) in the activation of pro-matrix metalloproteinase (MMP)-13. *Rheumatol Int* 32:3069–3075
- Li J, Ny A, Leonardsson G, Nandakumar KS, Holmdahl R, Ny T (2005) The plasminogen activator/plasmin system is essential for development of the joint inflammatory phase of collagen type II-induced arthritis. *Am J Pathol* 166:783–792
- Little CB, Barai A, Burkhardt D et al (2009) Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum* 60:3723–3733
- Long DL, Willey JS, Loeser RF (2013) Rac1 is required for matrix metalloproteinase-13 production by chondrocytes in response to fibronectin fragments. *Arthritis Rheum* 65:1561–1568
- Moroz A, Delella FK, Lacorte LM, Deffune E, Felisbino SL (2013) Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 430:1319–1321
- Perez-Garcia S, Juarranz Y, Carrion M et al (2011) Mapping the CRF-urocortins system in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts: effect of vasoactive intestinal peptide. *J Cell Physiol* 226:3261–3269
- Poduval P, Sillat T, Beklen A, Kouri VP, Virtanen I, Kontinen YT (2007) Type IV collagen alpha-chain composition in synovial lining from trauma patients and patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56:3959–3967
- Rengel Y, Ospelt C, Gay S (2007) Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res Ther* 9:221
- Ronday HK, Smits HH, Van Muijen GN et al (1996) Difference in expression of the plasminogen activation system in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 35:416–423
- Scanzello CR, Goldring SR (2012) The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* 51:249–257
- Schwab W, Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Dressler J, Kotsch M, Shakibaei M (2004) Interleukin-1beta-induced expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor and its colocalization with MMPs in human articular chondrocytes. *Histol Histopathol* 19:105–112
- Serrati S, Margheri F, Chilla A et al (2011) Reduction of in vitro invasion and in vivo cartilage degradation in a SCID mouse model by loss of function of the fibrinolytic system of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 63:2584–2594
- Sethi V, Rubinstein I, Kuznis A, Kastrissios H, Artwohl J, Onyukel H (2013) Novel, biocompatible, and disease modifying VIP nanomedicine for rheumatoid arthritis. *Mol Pharm* 10:728–738
- Smith EM (2008) Neuropeptides as signal molecules in common with leukocytes and the hypothalamic–pituitary–adrenal axis. *Brain Behav Immun* 22:3–14
- Smith HW, Marshall CJ (2010) Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:23–36
- Stanton H, Ung L, Fosang AJ (2002) The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. *Biochem J* 364:181–190
- Su SL, Tsai CD, Lee CH, Salter DM, Lee HS (2005) Expression and regulation of Toll-like receptor 2 by IL-1beta and fibronectin fragments in human articular chondrocytes. *Osteoarthr Cartil* 13:879–886
- Szinwong M, Sidek SM, Mahmud R, Stanslas J (2013) Molecular targets in the discovery and development of novel antimetastatic agents: current progress and future prospects. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40:307–319
- Tang YL, Zhu GQ, Hu L et al (2010) Effects of intra-articular administration of sodium hyaluronate on plasminogen activator system in temporomandibular joints with osteoarthritis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 109:541–547

- Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermitzaki E, Gravanis A, Margioris AN (2007a) Corticotropin releasing factor receptor 1 (CRF1) and CRF2 agonists exert an anti-inflammatory effect during the early phase of inflammation suppressing LPS-induced TNF- $\alpha$  release from macrophages via induction of COX-2 and PGE2. *J Cell Physiol* 210:774–783
- Tsatsanis C, Dermitzaki E, Venihaki M et al (2007b) The corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides as local modulators of adrenal function. *Cell Mol Life Sci: CMLS* 64:1638–1655
- Vacas E, Bajo AM, Schally AV, Sanchez-Chapado M, Prieto JC, Carmena MJ (2013) Vasoactive intestinal peptide induces oxidative stress and suppresses metastatic potential in human clear cell renal cell carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 365:212–222
- Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G (2013) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48:222–272
- Xue M, March L, Sambrook PN, Jackson CJ (2007) Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein C: relevance to inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56:2864–2874
- Yang S, Kim J, Ryu JH et al (2010) Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nat Med* 16:687–693
- Yasuda T (2006) Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod Rheumatol* 16:197–205
- Zhu G, Tang Y, Liang X et al (2009) Role of hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  in the regulation of plasminogen activator activity in rat knee joint chondrocytes. *Osteoarthr Cartil* 17:1494–1502

Healthy and osteoarthritic synovial fibroblasts 1 produce ADAMTS-4, -5, -7 and -12: induction by IL-1 $\beta$  and fibronectin, and contribution to cartilage damage

Selene Pérez-García, Irene Gutiérrez-Cañas, Iria V. Seoane, Julián Fernández, Mario Mellado, Javier Leceta, Laura Tío, Yasmina Juarranz, Rosa P. Gomariz

*Am J Pathol.* (Under review)





## IMMUNOPATHOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

# Healthy and osteoarthritic synovial fibroblasts produce ADAMTS-4, -5, -7 and -12: Induction by IL-1 $\beta$ and fibronectin and contribution to cartilage damage

Selene Pérez-García,<sup>\*</sup> Irene Gutiérrez-Cañas,<sup>\*</sup> Iria V. Seoane,<sup>\*</sup> Julián Fernández,<sup>†</sup> Mario Mellado,<sup>‡</sup> Javier Leceta,<sup>\*</sup> Laura Tío,<sup>§</sup> Yasmina Juarranz,<sup>\*</sup> Rosa P. Gomariz,<sup>\*</sup>

From the Department of Cell Biology,<sup>\*</sup> Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Spain; the Traumatology Service,<sup>†</sup> Hospital Universitario de La Princesa, Medical Research Institute, Madrid, Spain; the Department of Immunology and Oncology,<sup>‡</sup> Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; and the Cellular Inflammation and Cartilage Research Group,<sup>§</sup> IMIM, Hospital del Mar Research Institute, Barcelona, Spain.

Under revision  
December 21, 2015.

Address correspondence to  
Rosa P. Gomariz, Ph.D.,  
Department of Cell Biology,  
Faculty of Biology,  
Complutense University,  
Madrid, Spain. C/ José  
Antonio Novais n<sup>o</sup> 2,  
Ciudad Universitaria, 28040  
Madrid. E-mail: [gomariz@  
bio.ucm.es](mailto:gomariz@bio.ucm.es).

Current description of osteoarthritis includes the involvement of synovial inflammation. Studies contributing to understanding the mechanisms of cross-talk and feed-back among the joint tissues could be relevant to the development of therapies that block disease progression. During osteoarthritis synovial fibroblasts exposed to anomalous mechanical forces and to an inflammatory microenvironment, release factors that mediate tissue damage and perpetuate inflammation such as the ADAMTS metalloproteinases. Thus, we studied the production of ADAMTS by synovial fibroblasts and their contribution to cartilage degradation. Two mediators present in the osteoarthritis joint, IL-1 $\beta$ , and fibronectin fragments (Fn-fs) as products of matrix degradation, were used as proinflammatory stimuli. We reported that healthy donors and osteoarthritic synovial fibroblasts express and release aggrecanases (ADAMTS-4 and -5), ADAMTS-7, and ADAMTS-12. IL-1 $\beta$  and Fn-fs increased ADAMTS production and stimulated Runx2 and  $\beta$ -catenin, signaling pathways involved in ADAMTS expression, also promoting degradation of aggrecan and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) from the cartilage extracellular matrix in cartilage-synovial fibroblasts cocultures. Higher effects in ADAMTS induction were observed after Fn-fs stimulation in osteoarthritis, contributing to the maintenance of the disease. Moreover, higher levels of ADAMTS-7 and a specific regulation of ADAMTS-12 were observed in osteoarthritis, turning them into new potential targets for the design of therapies. Therefore, synovial fibroblasts provide the biochemical tools to the chronicity and destruction of the osteoarthritic affected joints. (*Am J Pathol* 2016, Under Review)

Osteoarthritis (OA), one of the leading causes of substantial physical and psychological disability worldwide, is a complex disease with a prevalence of more than 70% in the population over 55 years.<sup>1,2</sup> Current description of OA includes not only the remodeling of articular cartilage and adjacent bone, but also the involvement of synovial inflammation which is characterized by thickening of synovium or, indirectly, by joint effusion. Synovial membrane inflammation and proliferation in OA joints trigger the production of cytokines and proteinases that damage connective tissues, including the cartilage.<sup>3,4</sup> In this sense, research on inhibitory mediators of synovial activation could identify

ways to avoid the progressive cartilage degradation and functional impairment. The role of synovial fibroblasts (SF) as active drivers of joint destruction in rheumatoid arthritis is well established,<sup>5</sup> but their behavior in healthy subjects and OA patients is poorly understood.

Supported by a grant from Red de Investigación en Inflamación y Enfermedades Reumáticas (RIER) (RD12/0009/0002 to MC), a grant from Instituto de Salud Carlos III, Spain, co-financed by FEDER, European Union (PI12/00758 to SPG), and a grant from Comunidad de Madrid/FEDER (RAPHYME program, S2010/BMD2350).

Y.J. and R.P.G. contributed equally to this work.

Disclosures: None declared.

It has been described that OA-SF exposed to anomalous mechanical forces and to an inflammatory microenvironment, release factors such as the ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs), that mediate tissue damage and perpetuate inflammation. Therefore, studies contributing to a better understanding of the cross-talk and feed-back mechanisms among the joint tissues could be relevant to the development of new therapies able to block disease progression.

The aim of this study was to elucidate the role of SF in healthy donors (HD) and in the cartilage joint degradation of OA patients through the production of ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs).

The aim of this study was to elucidate the role of SF in the cartilage joint degradation in OA patients through the production of ADAMTS and to characterize these metalloproteinases in HD-SF. We have mapped the expression and function of aggrecanases ADAMTS-4 and -5, which degrade aggrecan, one of the main components of the cartilage extracellular matrix (ECM) that facilitates cartilage to resist compression.<sup>6</sup> We have also characterized ADAMTS-7 and -12, involved in destruction of cartilage oligomeric matrix protein (COMP), a non-collagenous component of the cartilage ECM which contributes to its assembly and to the cartilage integrity.<sup>7</sup> Moreover, we studied the physiopathological effect of two mediators present in OA joint microenvironment: the catabolic cytokine interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and the fibronectin fragments (Fn-fs) as products of cartilage ECM degradation. This study is the first to report the expression and release of ADAMTS-7 and -12 by SF from HD and OA patients, both constitutively and after IL-1 $\beta$  or Fn-fs stimulation. Besides, the capacity of SF to attach and degrade the cartilage ECM, generating glycosaminoglycans (GAGs) and COMP degradation products is also described. Finally, we study the activation of Runx2 and  $\beta$ -catenin, two signaling pathways related to ADAMTS expression.<sup>8-10</sup>

Our study reports that SF activated by mediators present in the joint, such as a proinflammatory cytokines and Fn-fs, release ADAMTS which contribute to the maintenance of cartilage destruction in osteoarthritic patients.

## Materials and Methods

### Patients and synovial fibroblasts cultures

Synovial tissue was obtained from 20 active OA patients (16 women and 4 men) aged between 48-87, at the time of knee prosthetic replacement surgery. Patients had advanced disease and were diagnosed of primary OA, excluding trauma, inflammatory disease, and other structural causes of secondary OA. Control samples from HD were obtained from 4 patients (2 women and 2 men) aged between 35-72, diagnosed with meniscopathy, excluding inflammatory and rheumatic diseases, at the time of knee arthroscopic evaluation. The study was performed according to the recommendations of the

Declaration of Helsinki and approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital La Princesa (Madrid, Spain). All biopsy samples were obtained after subjects gave informed consent.

SF cultures were established by explant growth of synovial biopsies, cultured in heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Lonza Ibérica S.A.U., Barcelona, Spain), with L-glutamine and antibiotic-antimycotic, (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After 3 passages, residual contamination by macrophages was avoided and monocultures of SF were obtained and used for experiments until passage 8.

For treatments, HD- and OA-SF were cultured in serum-free complete DMEM in the absence (untreated) or presence of the following agents: 10ng/ml IL-1 $\beta$  (ImmunoTools) or 10 nM Fn-fs 45 KDa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 24 hours.

### RNA extraction and RT-qPCR for ADAMTS gene expression

Total RNA from cultured SF was obtained using Tri@Reagent (Sigma-Aldrich). 2 $\mu$ g of RNA were reverse transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Semiquantitative real-time PCR (qPCR) analysis was performed using a TaqMan® Gene Expression Master Mix with manufactured-predesigned primers and probes for  $\beta$ -actin (NM001101.3), ADAMTS-4 (NM005099.4), ADAMTS-5 (NM007038.3), ADAMTS-7 (NM014272.3) and ADAMTS-12 (NM030955.2) (Applied Biosystems). We normalized the target gene expression to the housekeeping gene,  $\beta$ -actin (2- $\Delta$ Ct). For relative quantification, results were presented as the relative expression with respect to the untreated condition using the formula 2- $\Delta\Delta$ Ct, as previously described.<sup>11</sup>

### Immunocytochemistry

SF were cultured on glass coverslips, fixed with paraformaldehyde, and permeabilized with Tween-20 in phosphate buffered saline (PBS). Cells were blocked with PBS containing donkey serum and incubated with rabbit polyclonal anti-human antibodies for ADAMTS-4, -5, -7 or -12 (Sigma-Aldrich). After washing, cells were incubated with AlexaFluor 488 donkey anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen). Coverslips were counterstained with Hoechst. Background fluorescence was reduced with Sudan Black in ethanol. Negative controls were performed in the absence of primary antibodies (data not shown). Fluorescence was examined using an Olympus BX51 microscope with DP72 camera model (objective 40X).

### Quantification of ADAMTS in culture supernatants

Levels of ADAMTS were measured in the culture supernatants using commercial ELISA kits for

ADAMTS-4 and -5 (Cloud-Clone Corp, Houston, Texas, USA), and ADAMTS-7 and -12 (MyBioSource, San Diego, CA, USA).

### Aggrecanase activity assay

Aggrecanase activity was measured in the SF culture by a Sensitive Aggrecanase Activity ELISA Kit (MD Bioproducts, Zürich, Switzerland), according to the manufacturer's instructions. Briefly, this assay consists in two modules. In the Aggrecanase Module, a modified interglobular domain (aggrecan-IGD-s) is digested with aggrecanases, and its proteolytic cleavage releases an aggrecan peptide (ARGSVIL-peptide-s), which is then quantified with antibodies in the ELISA Module.

### GAGs and COMP assays in cartilage-SF cocultures

Release of GAG and COMP degradation products from cartilage was measured in culture supernatants from wells containing cocultures of SF over cartilage explants.<sup>12</sup> OA human cartilages were obtained from 3 patients undergoing total hip arthroplasty from Hospital del Mar (Barcelona, Spain). Fixed diameter (6mm) and height (2mm) sections were collected from cartilage areas without macroscopically signs of OA. Samples were frozen at -80°C and stored until testing. 1 explant per well was attached to a 24 well plate. HD- or OA-SF were added drop-wise on top of the cartilage surface. After 3 hours of incubation, wells were filled with the treatments described in DMEM, and cultures were continued for 14 days. Culture supernatants were collected for detection of GAG and COMP degradation products, using a Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay (Biocolor Ltd County Antrim, Ireland, UK), and a Quantikine® Human COMP Immunoassay (R&D Systems, Abingdon, OX, UK), respectively. Frozen sections were prepared using a cryostat and stained with Alcian blue and Callejas's trichomic. Sections were observed using an Olympus BX51 microscope with DP72 camera model (objective 20X).

### Runx2 assay

SF were incubated with IL-1 $\beta$  or Fn-fs for 60 and 30 minutes, respectively. A Nuclear Extract Kit (Active Motif, Rixensart, Belgium) was used for nuclear extracts preparation, and the protein content was measured with a QuantiPro™ BCA Assay Kit (QBCA) (Sigma-Aldrich). Cytoplasmic extracts obtained were stored at -80°C for later use in the Western blot. Nuclear extracts (12 $\mu$ g/well) were added to a 96-well plate and Runx2 activity was measured using a TransAM™ AML-3/Runx2 kit (Active Motif). Time-course of Runx2 activation after incubation with IL-1 $\beta$  or Fn-fs was studied (data not shown), and the experiments were performed at 60 or 30 minutes of treatment, respectively.

### B-catenin assay

To detect  $\beta$ -catenin levels, a  $\beta$ -catenin (Total) and a (Phospho) InstantOne™ ELISA kits were used (eBioscience, San Diego, CA, USA) with SF cellular lysates. Briefly, SF were scraped into PBS, centrifuged and resuspended in the Cell Lysis Buffer Mix (eBioscience). Protein content was measured by QBCA. Levels of  $\beta$ -catenin in the cellular lysates were measured after 60 minutes of treatment with IL-1 $\beta$  or Fn-fs.

### Western blot

For the detection of ADAMTS SF culture supernatants were collected. For Runx2 and  $\beta$ -catenin, cytoplasmic extracts previously obtained were used and protein content was measured by QBCA. Cytoplasmic extracts (15 $\mu$ g/well) or culture supernatants were subjected to SDS-PAGE and blotted on a PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, France).

Membranes were blocked with Tris-buffered saline containing BSA and Tween-20, and incubated with mouse monoclonal anti-human ADAMTS-4, ADAMTS-5 (R&D Systems), Runx2 or  $\beta$ -catenin (Santa Cruz Biotechnology) antibodies, or rabbit polyclonal anti-human ADAMTS-7 or ADAMTS-12 antibodies (Abcam, UK). Appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were applied and detected by Western blot Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology). For Runx2 and  $\beta$ -catenin, we used  $\beta$ -actin as a loading control. Protein bands were scanned and quantified with the Bio-Rad Quantity One program.

### Statistical analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism software (version 6). Data were subjected to normality test (Kolmogórov-Smirnov test) and equal variance test (F-test). Statistical differences between sample groups were assessed using Student's two-tailed t-test or unpaired t-test with Welch's correction, in case of groups with different variances.  $P < 0.05$  were considered statistically significant. Results are presented as the means  $\pm$  SEM.

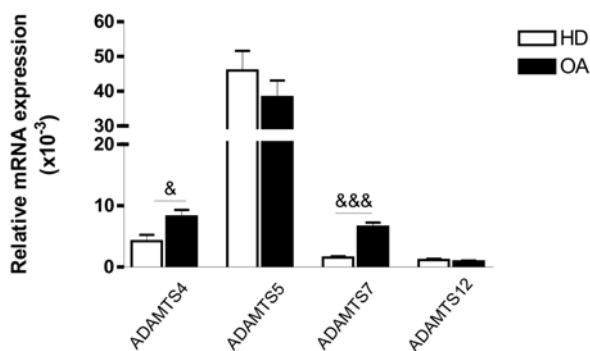
## Results

### SF express and release ADAMTS-4, -5, -7 and -12 in HD and OA patients

We explored the constitutive expression of ADAMTS in HD- and OA-SF by qPCR (Figure 1). Patterns of constitutive ADAMTS gene expression were similar in HD- and OA-SF. ADAMTS-5 was the most expressed followed by ADAMTS-4, ADAMTS-7 and ADAMTS-12. ADAMTS-5 transcripts were nearly 50-fold higher than ADAMTS-12. Comparing HD- and OA-SF, ADAMTS-4 and -7 transcripts were 2 and 4-fold higher in OA- than in HD-SF, respectively. However, ADAMTS-5 and -12 mRNA levels were similar.

ADAMTS protein expression was confirmed by immunocytochemistry. HD- and OA-SF displayed cytoplasmic immunostaining for ADAMTS-4, -5, -7 and -12 (Figure 2). No staining was observed in isotype controls (data not shown).

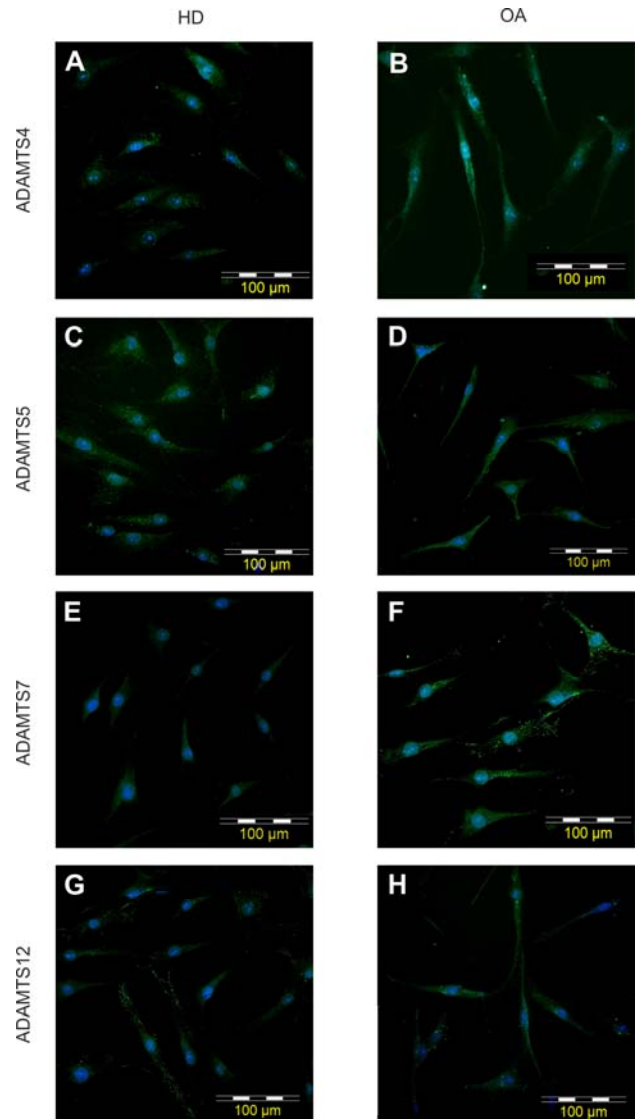
ADAMTS were also evaluated in SF culture supernatants by Western blot (Figure 3). We confirmed that all ADAMTS are released to the medium by HD- and OA-SF. Western blots for ADAMTS-4 and -5 revealed bands corresponding to the active forms (~50kDa), and additional bands of 90 kDa for ADAMTS-4 and 100 kDa for ADAMTS-5 corresponding to the proenzymes. ADAMTS-7 and ADAMTS-12 Western blots revealed a band with the predicted size of the active forms (~180 kDa). Additional smaller bands (~80 kDa) could represent truncated forms of both proteins.



**Figure 1** mRNA expression of ADAMTS in HD- and OA-SF. ADAMTS-4, -5, -7 and -12 mRNA expression was measured by RT-qPCR and normalized to  $\beta$ -actin using the formula  $2^{-\Delta Ct}$  (see Patients and Methods). Values are presented as mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations (HD, n=4; OA, n=11).  $^{\&}p<0.05$  and  $^{\&\&\&}p<0.001$  HD vs OA.

## IL-1 $\beta$ and Fn-fs enhance the expression of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 in SF

Since SF has been suggested to represent an important source of aggrecanases within the joint mediating cartilage destruction,<sup>6</sup> we next studied the effect of IL-1 $\beta$  and Fn-fs on their production. IL-1 $\beta$  and Fn-fs increased the transcript and protein of ADAMTS-4 in HD- and OA-SF compared with the untreated cells. While the IL-1 $\beta$  induction of ADAMTS-4 was similar in HD- and OA-SF, the stimulation with Fn-fs was higher in OA-SF (Figure 4A). A significant increase in ADAMTS-5 transcripts was detected only in OA-SF after stimulation, with no effect in HD-SF (Figure 4B, left). However, at protein level we detected comparable increases in HD- and OA-SF after IL-1 $\beta$  treatment. The effect of Fn-fs stimulation was confirmed at protein level in OA-SF (Figure 4B, right). Altogether, these results show that IL-1 $\beta$  increased ADAMTS-4 and -5 in HD- and OA-SF, while Fn-fs showed more specific effects in OA, resulting in a significant augmented expression of ADAMTS-4 in OA-SF compared with HD, as well as a restricted stimulation of ADAMTS-5 production in OA-SF.



**Figure 2** Immunocytochemistry of ADAMTS in HD- and OA-SF. Protein expression of ADAMTS-4 (A,B), ADAMTS-5 (C,D), ADAMTS-7 (E,F), and ADAMTS-12 (G,H) was analyzed by immunofluorescence staining (green). Nuclei were counterstained with Hoeschst (blue). Figure shows a representative image of three independent experiments for HD-SF (A,C,E,G) and OA-SF (B,D,F,H). Fluorescence was examined on an Olympus BX51 microscope with DP72 camera mode (Objective 40x).

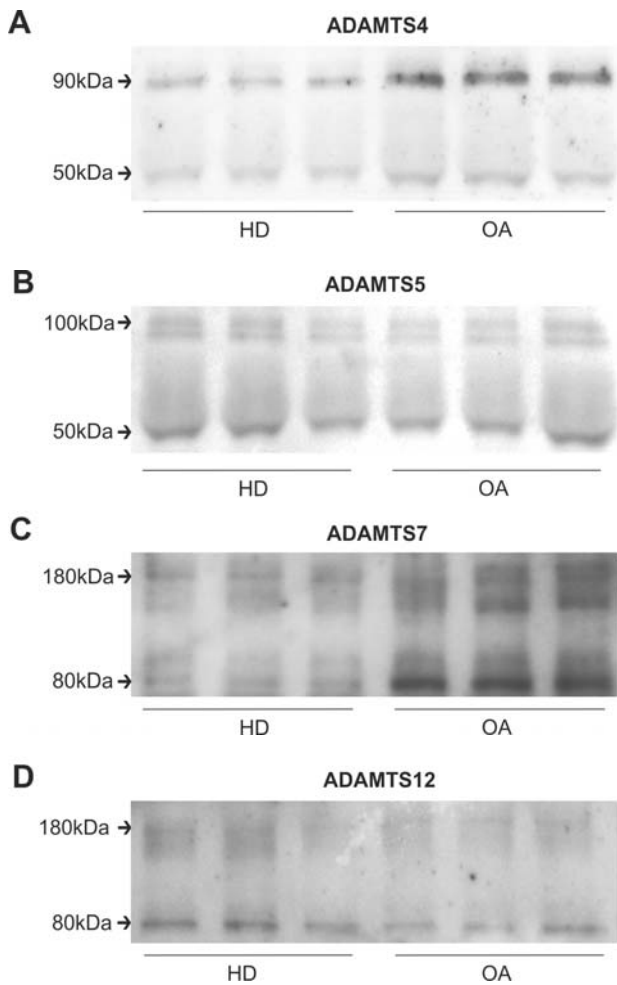
## Aggrecanase activity in SF and GAGs release in cartilage-SF cocultures

ADAMTS-4 and -5 cleave aggrecan within the interglobular domain at the Glu-373 and Ala-374 bond. Thus, we assessed the ability of ADAMTS-4 and -5 produced by cultured SF to this cleavage by measuring aggrecanase activation and the ARGSVL-peptide-s released in culture supernatants by means of ELISA.

Both the constitutive aggrecanase activity and the derived peptide were significantly greater in OA- compared to HD-SF (Figure 4C, top). Fn-fs significantly increased aggrecanase activity and the derived peptide exclusively in OA-SF, while IL-1 $\beta$  did not induce any

change (Figure 4C, bottom). Interestingly, these results correlated with the Fn-fs induction of ADAMTS-4 and -5 in OA-SF.

The aggrecanase activity yields the generation of GAGs from the aggrecan in cartilage ECM. Hence, we next studied the potential capacity of SF to degrade cartilage by measuring GAG release in supernatants from cartilage-SF cocultures (Figure 4D). The effects of IL-1 $\beta$  and Fn-fs after 14 days of treatment were evaluated. The constitutive release of GAGs to the medium was significantly greater in OA-SF compared to HD-SF. IL-1 $\beta$  induced no change in GAGs levels, whereas Fn-fs enhanced significantly the release of GAGs in both HD- and OASF (Figure 4E).

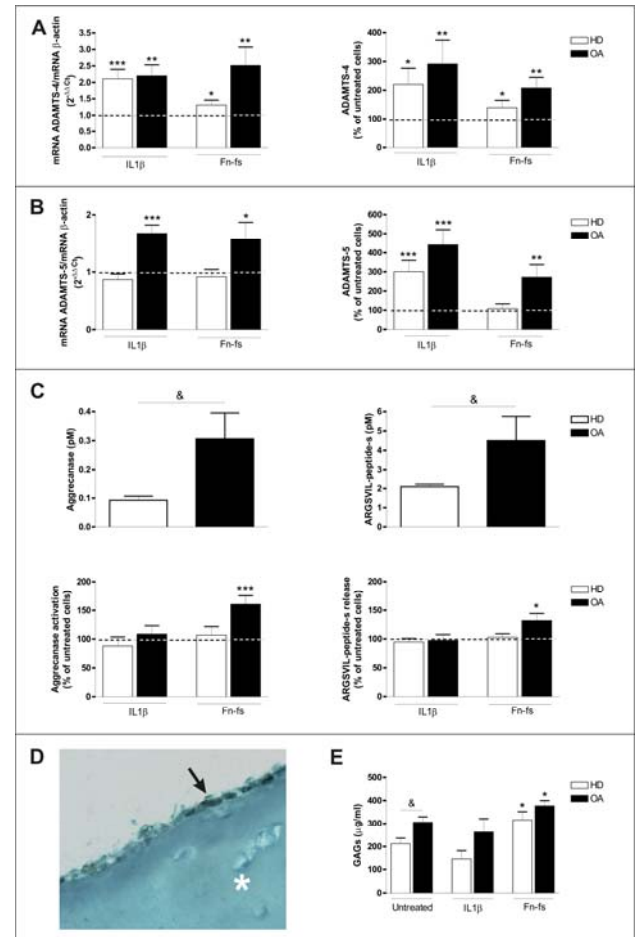


**Figure 3** Western blot of ADAMTS in HD- and OA-SF culture supernatants. Presence of ADAMTS-4 (A), ADAMTS-5 (B), ADAMTS-7 (C), and ADAMTS-12 (D) was detected by Western blot in culture supernatants. In all cases, two bands corresponding to each ADAMTS were detected. (HD, n=3; OA, n=3).

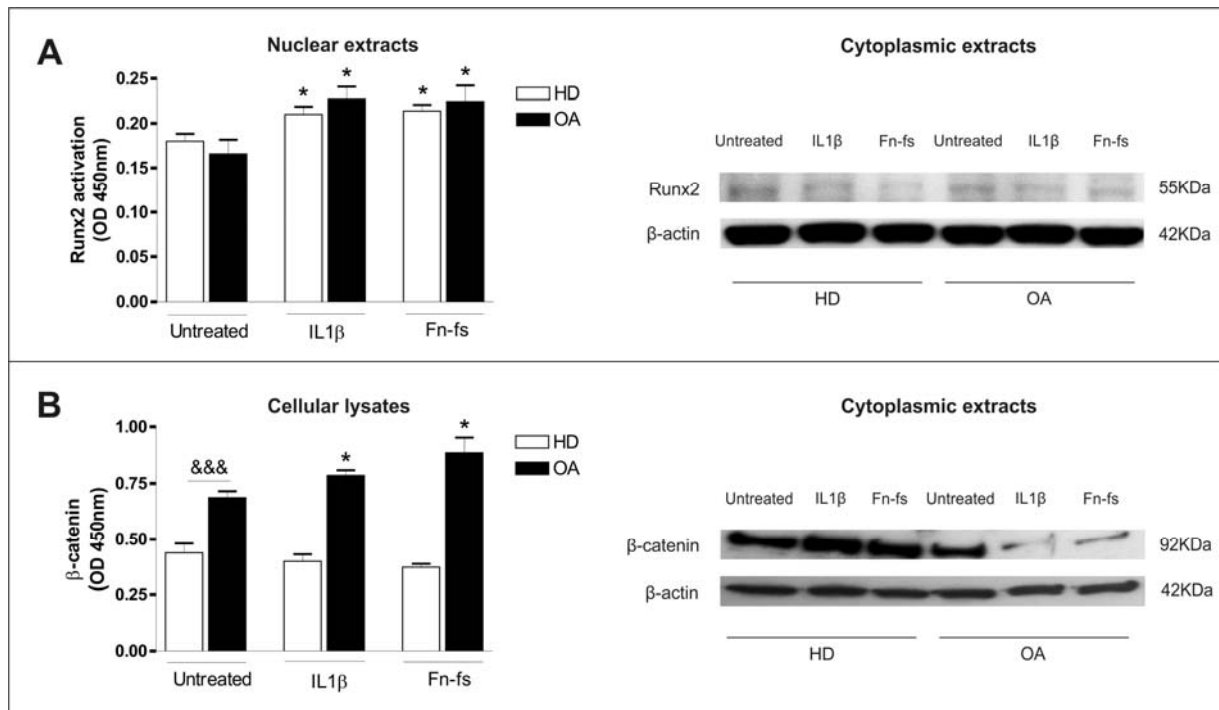
### Runx2 and $\beta$ -catenin activation in SF

Runx2 and  $\beta$ -catenin are two transcription factors involved in chondrocytes metabolism and aggrecanase gene expression.<sup>8,9</sup> We investigated whether they could mediate the stimulatory effects of IL-1 $\beta$  and Fn-fs on the

ADAMTS expression. IL-1 $\beta$  and Fn-fs significantly induced the Runx2 nuclear activation in HD- and OA-SF (Figure 5A, left). Moreover, western blotting analysis confirmed that IL-1 $\beta$  and Fn-fs treatments decreased the inactive Runx2 protein (55KDa) in cytoplasmic extracts of SF (Figure 5A, right).



**Figure 4** Induction of ADAMTS-4 and -5 by Fn-fs and IL-1 $\beta$  in HD- and OA-SF. **Left A,B:** ADAMTS-4 and -5 mRNA expression was measured after 24h of treatment by RT-qPCR, normalized to  $\beta$ -actin and presented as the relative quantification with respect to the untreated cells using the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (see Patients and Methods). Values are presented as mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations (HD, n=4; OA, n=7). **Right A,B:** Presence of ADAMTS-4 and -5 after 24h of treatment was determined by ELISA in the culture supernatants. Values are presented as the percentage of untreated cells (mean  $\pm$  SEM of duplicate determinations) (HD, n=4; OA, n=7). **C:** Aggrecanase activity was measured in culture supernatants by an Aggrecanase Activity ELISA kit after 24h of treatment. The aggrecanase activation (*left*) and the ARGSVL-peptide-s released (*right*) are shown, in untreated cells (*top*) and after stimulation (percentage of untreated cells) (*bottom*). Values are presented as mean  $\pm$  SEM of duplicate determinations (HD, n=4; OA, n=5). **D:** Representative histological section of a cartilage explant (asterisk) with SF (arrow); Alcian blue and Calleja's tricom staining (objective 20X). **E:** GAGs were detected in cartilage-SF cocultures supernatants after 14 days of treatment by a Blyscan<sup>TM</sup> Sulfated Glycosaminoglycan Assay. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of duplicate determinations (HD, n=3; OA, n=3). Dashed lines represent the untreated condition.  $\&$ p<0.05 HD vs OA; \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 HD or OA vs untreated.



**Figure 5** Activation of Runx2 and  $\beta$ -catenin by Fn-fs and IL-1 $\beta$  in HD- and OA-SF. **A left:** Runx2 activation was measured in nuclear extracts after 24h of treatment using a TransAM<sup>TM</sup> AML-3/Runx2 kit. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of duplicate determinations (HD, n=4; OA, n=4). **B left:**  $\beta$ -catenin was detected in cellular lysates after 24h of treatment by ELISA. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of duplicate determinations (HD, n=4; OA, n=5). \*\*\*p<0.001 HD vs OA; \*p<0.05 HD or OA vs untreated. **Right A,B:** Western blot of Runx2 and  $\beta$ -catenin in cytoplasmic extracts. Images are representative of three independent experiments.

In the cytoplasm,  $\beta$ -catenin is regulated by interaction with a multiprotein complex that phosphorylates it to be degraded by proteasomes. Upon activation of Wnt signaling, non-phosphorylated  $\beta$ -catenin is transported to the nucleus, where it couples with the complex TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid-enhancing factor) to initiate the transcription of ADAMTS-4 and -5 genes.<sup>13</sup> We measured both  $\beta$ -catenin forms in cellular lysates of SF, where levels of phosphorylated  $\beta$ -catenin were undetectable by ELISA (data not shown). Thus, we measured the total  $\beta$ -catenin that mainly represented the active form. Significantly greater amounts of constitutive  $\beta$ -catenin were found in OA-SF than in HD-SF. Moreover, we detected  $\beta$ -catenin induction exclusively in OA-SF after IL-1 $\beta$  and Fn-fs treatment (Figure 5B, left). These results were confirmed by Western blot with a decrease in cytoplasmic  $\beta$ -catenin (92KDa), corresponding to the inactive form (Figure 5B, right).

#### Induction of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 by IL-1 $\beta$ and Fn-fs in SF, and COMP production in cartilage-SF cocultures

We further studied the effects of IL-1 $\beta$  and Fn-fs on the ADAMTS involved in the degradation of COMP. ADAMTS-7 and -12 share a C-terminal COMP/GEP-binding TSP domain. Their effects in OA are due to the association of this domain with COMP and its subsequent degradation. Significant increases in ADAMTS-7 transcript and protein were detected after IL-1 $\beta$  and Fn-fs

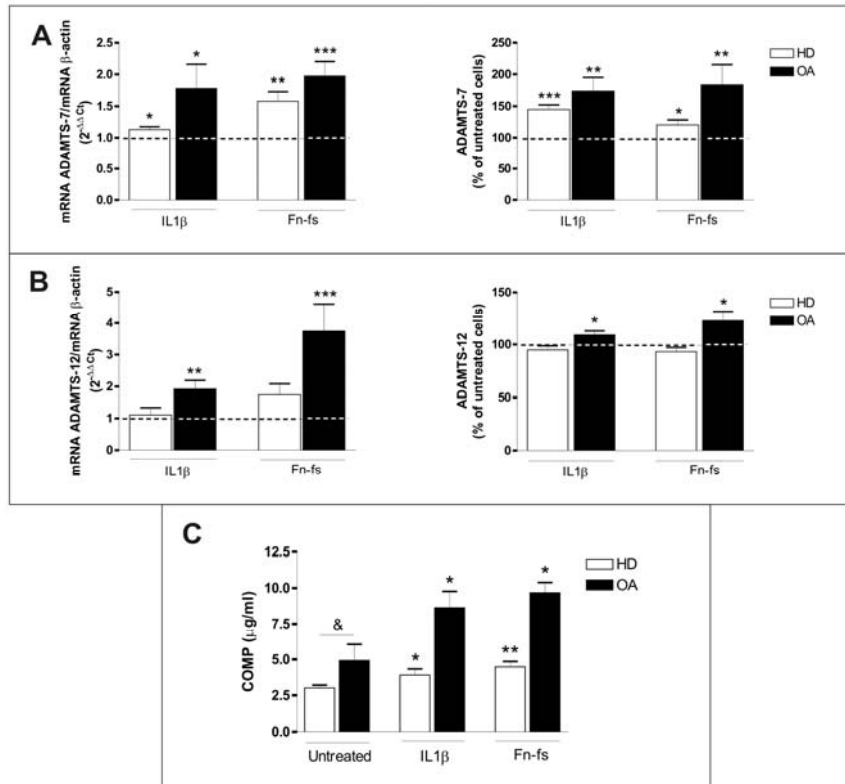
stimulation. However, this augment was higher in OA than in HD (Figure 6A). Regarding ADAMTS-12, we observed an increase of mRNA and protein induced by both stimuli exclusively in OA-SF (Figure 6B).

Production of COMP fragments was measured in the supernatants of the cultures after 14 days of treatment with IL-1 $\beta$  and Fn-fs. The constitutive COMP fragments release was significantly greater in OA-SF. Moreover, significant increases were detected after IL-1 $\beta$  and Fn-fs stimulation being in OA- more than twice the induced in HD-SF (Figure 6C).

## Discussion

ADAMTS metalloproteinases play key roles in cartilage homeostasis and in the pathogenesis of OA, where the disruption of this balance, in favor of proteolysis, leads to a pathological cartilage destruction.<sup>3</sup> ADAMTS-4, -5, -7 and -12 have been implicated in the breakdown of cartilage in OA,<sup>14, 15</sup> ADAMTS-4 and -5 degrading aggrecan, and ADAMTS-7 and -12 degrading COMP. Although their functions are well understood in cartilage, few studies have addressed the contribution of SF to their expression and release.

We showed that ADAMTS-5 was the most expressed in both HD- and OA-SF. While ADAMTS-4 gene expression was higher in OA than in HD, ADAMTS-5 mRNA expression was similar in both. However, lower levels of ADAMTS-4 and -5 have been reported in OA cartilage and synovium compared with non-OA tissues.<sup>16</sup>



**Figure 6** Induction of ADAMTS-4 and -5 by Fn-fs and IL-1 $\beta$  in HD- and OA-SF. **Left A,B:** ADAMTS-7 and -12 mRNA expression was measured after 24h of treatment by RT-qPCR, normalized to  $\beta$ -actin and presented as the relative quantification with respect to the untreated cells using the formula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (see Patients and Methods). Values are presented as mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations (HD, n=4; OA, n=7). **Right A,B:** Presence of ADAMTS-4 and -5 after 24h of treatment was determined by ELISA in the culture supernatants. Values are presented as the percentage of untreated cells (mean  $\pm$  SEM of duplicate determinations) (HD, n=4; OA, n=7). **C:** COMP degradation products were detected in cartilage-SF cocultures supernatants after 14 days of treatment by a Quantikine<sup>®</sup> Human COMP Immunoassay. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations (HD, n=3; OA n=3). Dashed lines represent the untreated condition. &p<0.05 HD vs OA; \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001 HD or OA vs untreated.

Nevertheless, this discrepancy could be explained by the fact that whole synovium was used in their experiments. In addition, discordant data in the constitutive mRNA expression of ADAMTS-4 and -5 in non-OA and OA cartilage have been described,<sup>6</sup> likely due to the different stages of the disease.

The complexity of ADAMTS regulation, by both pre- and post-transcriptional mechanisms, which ultimately determine the levels of secreted enzymes, has been reported.<sup>6</sup> In this study we demonstrated that both HD- and OA-SF release aggrecanases. Western blot analysis of ADAMTS-4 and -5 in SF culture supernatants revealed the presence of the 50 kDa active forms of both enzymes similar to those reported in OA synovial fluids.<sup>17</sup> We also observed the major 90 kDa form of ADAMTS-4, which has been described as the proenzyme in cartilage from OA patients<sup>15</sup> and in SF.<sup>18</sup> Regarding ADAMTS-5, we observed a major 100 kDa band in the culture medium, whereas other authors have reported a 70 kDa proenzyme form of ADAMTS-5 in cartilage and SF from OA patients,<sup>15,18</sup> that could represent a different degradation fragment.

We reported that the aggrecanase activity and GAGs release are constitutively greater in OA than in HD. By contrast, no differences in the expression of aggrecanases between non-OA and OA synovium have been reported,<sup>18,19</sup> with no data about their activity. Our results showed that IL-1 $\beta$ , a major mediator of cartilage degradation and joint inflammation,<sup>20</sup> increased the production of ADAMTS-4 and -5 with no impact in the aggrecanase activity or GAGs production. A recent study reported that IL-1 $\beta$  induced expression of ADAMTS-4 in SF but did not measure the aggrecanase activity.<sup>21</sup> At functional level, our results are in

agreement with previous findings showing that ADAMTS-4 and -5 are not regulated by this cytokine in SF.<sup>18,19</sup> Since synovial inflammation intensity is greater in OA initial stages,<sup>4</sup> and matrix degradation in early OA begins with the activation of MMP-3 and ADAMTS-5,<sup>22</sup> our results could be explained by the advanced disease stage of our patients.

Articular cartilage matrix proteins are degraded in OA resulting in the production of fragments with pro-inflammatory properties, including those of fibronectin.<sup>23,24</sup> Whereas in chondrocytes it has been described the role of N-terminal Fn-fs 45KDa inducing matrix metalloproteinases synthesis and aggrecan degradation,<sup>25-27</sup> there are no data about its action in other joint cells. Here we describe for the first time the aggrecanases induction by Fn-fs in SF. In line with these previous reports, we noticed that Fn-fs produced a more specific effect in OA-SF increasing aggrecanases production and activity, as well as cartilage degradation, evaluated by GAGs release from SF-cartilage cocultures. Thus, in stages of SF hyperplasia in OA, Fn-fs could establish a feedback loop contributing to the maintenance of cartilage erosion.

Runx2 is a master transcription factor that regulates chondrocyte hypertrophy in OA with binding sites in ADAMTS-4 and -5 promoter regions.<sup>8,9</sup> Besides, Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is a potent stimulator of chondrocyte matrix catabolic action triggering joint destruction, playing an important role in the OA pathophysiology,<sup>28,29</sup> which also regulates aggrecanases expression.<sup>10</sup> We showed that IL-1 $\beta$  and Fn-fs induced Runx2 in HD- and OA-SF. Of interest, we detected  $\beta$ -catenin induction exclusively in OA-SF. These results could shed some light on the understanding of how synovitis is triggered in

OA which is an issue under exploration. The disruption of the articular cartilage matrix is the most differentiating feature in OA, and the resulting fragments of ECM catabolism have been associated to inflammation through the triggering of Toll-like receptors (TLRs) signaling pathways. Thus, fibronectin as an endogenous ligand of TLR4 could act through its engagement, given that TLR4 is present in SF.<sup>30,31</sup>

ADAMTS-7 and -12 have been detected mainly in cartilage, with an upregulated expression of their transcripts in OA compared with HD. Regarding other joint tissues, ADAMTS-7 and -12 mRNA expression have been previously described in whole synovium, with similar levels in OA and HD.<sup>16</sup> In the present study we show for the first time, that isolated SF express and release ADAMTS-7 and -12. ADAMTS-7 transcripts were higher in OA- than in HD-SF, while expression of ADAMTS-12 was similar in both.

Our results are the first to describe the presence of ADAMTS-7 and -12 proteins in SF. Western blots of ADAMTS-7 showed the band of approximately 180 kDa, similar to the active form previously described in a human kidney cell line.<sup>32</sup> Regarding ADAMTS-12 we reported two bands, a band around 180 kDa of the active form, equivalent to the previously reported in the same human line,<sup>33</sup> and a smaller band of 80 kDa that could represent the C-terminal fragment containing the TS-1 repeats.<sup>34,35</sup>

As ADAMTS-7 and -12 are involved in the breakdown of arthritic articular cartilage,<sup>33,36</sup> SF represent other source of both metalloproteinases that would contribute to the maintenance of the cartilage damage. In this sense, COMP fragments have been identified in cartilage, synovial fluid and serum from OA and rheumatoid arthritis patients.<sup>37</sup> Different joint tissues such as bone, cartilage, synovium and tendon contain and express ADAMTS-7, which co-localizes with ADAMTS-12 and COMP in the cytoplasm of chondrocytes.<sup>38,39</sup> In line with this, we reported here that cartilage-OA-SF cocultures constitutively release COMP fragments to the medium at significant higher levels than cartilage-HD-SF cocultures.

TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  increase ADAMTS-7 and -12 mRNA in cartilage explants,<sup>40</sup> whereas ADAMTS-12 is not induced in human fetal fibroblasts.<sup>34</sup> We report for the first time in SF that IL-1 $\beta$  and Fn-fs promoted significant increases in ADAMTS-7 transcripts and protein levels, being greater in OA- than in HD-SF. Similarly, ADAMTS-12 transcripts and protein were stimulated by IL-1 $\beta$  and Fn-fs specifically in OA-SF. Interestingly, ADAMTS-12 was the only ADAMTS studied exclusively induced in OA-SF. Those facts are important for the development of combined therapies based on the blockade of these ADAMTS. Emergent data indicate that ADAMTS-12 has multiple functions in the inflammatory response,<sup>40</sup> angiogenesis, and apoptosis.<sup>41-43</sup> Thus, further studies are needed to clarify whether ADAMTS-12 is also involved in those functions during OA development.

Our results showed that the stimulation of COMP degradation products by IL-1 $\beta$  and Fn-fs was greater in OA-SF. Since specific antibodies against ADAMTS-7

and -12 inhibited the TNF $\alpha$ - or IL-1 $\beta$ -induced COMP degradation in the cartilage of OA patients,<sup>44</sup> this increased production of COMP fragments after IL-1 $\beta$  and Fn-fs treatments could be ascribed to the increased expression of both ADAMTS. Since, by contrast to ADAMTS-12, IL-1 $\beta$  and Fn-fs also induced ADAMTS-7 in HD-SF, COMP degradation may be mainly attributed to its action. Although studies blocking ADAMTS-7 and -12 expression are needed to confirm these results, our data suggest that, in the late phase of OA, IL-1 $\beta$  and Fn-fs may contribute to the damage of noncollagenous components of the ECM by increasing ADAMTS-7 and -12.

Overall, our data indicate that SF provide aggrecanases, ADAMTS-7, and ADAMTS-12 that contribute to the chronicity and destruction of OA joint. IL-1 $\beta$  and Fn-fs play important roles in the disease, promoting the degradation of aggrecan and COMP from the cartilage ECM by increasing ADAMTS production and signaling pathways involved in their expression and cartilage degradation. In this process Fn-fs are more effective in the induction of aggrecanases. We showed that levels of ADAMTS-4, one of the main aggrecanases in cartilage destruction, were higher in OA than in HD. Interestingly, the higher levels of ADAMTS-7 in OA compared to HD, as well as the specific regulation of ADAMTS-12 in SF from OA patients, suggest their potential as new therapeutic targets for the treatment of the disease. Altogether, our results point to an important contribution of SF, providing the biochemical tools, to the chronicity and destruction of the osteoarthritic affected joint.

## Acknowledgments

We are grateful to all patients and the collaborating clinicians for their participation in this study. We also appreciate the contributions to the final edition of the manuscript of Prof. M. B. Goldring of the Hospital for Special Surgery of NY.

## References

1. Brooks P: Inflammation as an important feature of osteoarthritis. *Bull World Health Organ* 2003, 81:689-90.
2. Goldring MB, Goldring SR: Osteoarthritis. *Journal of cellular physiology* 2007, 213:626-34.
3. Goldring MB, Marcu KB: Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009, 11:224.
4. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B: Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005, 64:1263-7.
5. Lefevre S, Meier FM, Neumann E, Muller-Ladner U: Role of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Current pharmaceutical design* 2015, 21:130-41.
6. Fosang AJ, Rogerson FM: Identifying the human aggrecanase. *Osteoarthritis Cartilage* 2010, 18:1109-16.
7. Acharya C, Yik JH, Kishore A, Van Dinh V, Di Cesare PE, Haudenschild DR: Cartilage oligomeric matrix protein and its binding partners in the cartilage extracellular matrix: interaction, regulation and role in chondrogenesis. *Matrix Biol* 2014, 37:102-11.
8. Thirunavukkarasu K, Pei Y, Moore TL, Wang H, Yu XP, Geiser AG, Chandrasekhar S: Regulation of the human ADAMTS-4

- promoter by transcription factors and cytokines. *Biochemical and biophysical research communications* 2006, 345:197-204.
9. Thirunavukkarasu K, Pei Y, Wei T: Characterization of the human ADAMTS-5 (aggrecanase-2) gene promoter. *Molecular biology reports* 2007, 34:225-31.
  10. Yuasa T, Otani T, Koike T, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M: Wnt/ $\beta$ -catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Laboratory Investigation* 2008, 88:264-74.
  11. Juarranz Y, Gutierrez-Canas I, Santiago B, Carrion M, Pablos JL, Gomariz RP: Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2008, 58:1086-95.
  12. Pretzel D, Pohlers D, Weinert S, Kinne RW: In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage. *Arthritis Res Ther* 2009, 11:R25.
  13. Thomas RS, Clarke AR, Duance VC, Blain EJ: Effects of Wnt3A and mechanical load on cartilage chondrocyte homeostasis. *Arthritis Res Ther* 2011, 13:R203.
  14. Zhang Q, Huang M, Wang X, Xu X, Ni M, Wang Y: Negative effects of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 on endplate cartilage differentiation. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2012, 30:1238-43.
  15. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD: Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 2002, 277:22201-8.
  16. Davidson RK, Waters JG, Kevorkian L, Darrah C, Cooper A, Donell ST, Clark IM: Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther* 2006, 8:R124.
  17. Zhang E, Yan X, Zhang M, Chang X, Bai Z, He Y, Yuan Z: Aggrecanases in the human synovial fluid at different stages of osteoarthritis. *Clinical rheumatology* 2013, 32:797-803.
  18. Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, Maki RA, Tortorella MD, Arner EC, Firestein GS: Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF- $\beta$ . *J Immunol* 2002, 168:1405-12.
  19. Vankemmelbeke MN, Hohen I, Wilson AG, Ilic MZ, Handley CJ, Kelner GS, Clark M, Liu C, Maki RA, Burnett D, Buttle DJ: Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium. *Eur J Biochem* 2001, 268:1259-68.
  20. Goldring MB, Otero M: Inflammation in osteoarthritis. *Current opinion in rheumatology* 2011, 23:471-8.
  21. Kataoka Y, Ariyoshi W, Okinaga T, Kaneuji T, Mitsugi S, Takahashi T, Nishihara T: Mechanisms involved in suppression of ADAMTS4 expression in synoviocytes by high molecular weight hyaluronic acid. *Biochemical and biophysical research communications* 2013, 432:580-5.
  22. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB: Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum* 2012, 64:1697-707.
  23. Homandberg GA, Wen C, Hui F: Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage* 1998, 6:231-44.
  24. Zack MD, Arner EC, Anglin CP, Alston JT, Malfait AM, Tortorella MD: Identification of fibronectin neoepitopes present in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* 2006, 54:2912-22.
  25. Stanton H, Ung L, Fosang AJ: The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. *The Biochemical journal* 2002, 364:181-90.
  26. Ding L, Guo D, Homandberg GA: The cartilage chondrolytic mechanism of fibronectin fragments involves MAP kinases: comparison of three fragments and native fibronectin. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16:1253-62.
  27. Ding L, Guo D, Homandberg GA: Fibronectin fragments mediate matrix metalloproteinase upregulation and cartilage damage through proline rich tyrosine kinase 2, c-src, NF- $\kappa$ B and protein kinase C $\delta$ . *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17:1385
  28. Luyten FP, Tylzanowski P, Lories RJ: Wnt signaling and osteoarthritis. *Bone* 2009, 44:522-7.
  29. Tomero-Esteban P, Peralta-Sastre A, Herranz E, Rodriguez-Rodriguez L, Mucientes A, Abasolo L, Marco F, Fernandez-Gutierrez B, Lamas JR: Altered Expression of Wnt Signaling Pathway Components in Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis Patients. *PLoS One* 2015, 10:e0137170.
  30. Gutierrez-Canas I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martinez C, Galindo M, Paya M, Gomariz RP, Pablos JL: VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 2006, 45:527-32.
  31. You R, Zheng M, McKeown-Longo PJ: The first type III repeat in fibronectin activates an inflammatory pathway in dermal fibroblasts. *J Biol Chem* 2010, 285:36255-9.
  32. Bai XH, Wang DW, Kong L, Zhang Y, Luan Y, Kobayashi T, Kronenberg HM, Yu XP, Liu CJ: ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. *Mol Cell Biol* 2009, 29:4201-19.
  33. Bai XH, Wang DW, Luan Y, Yu XP, Liu CJ: Regulation of chondrocyte differentiation by ADAMTS-12 metalloproteinase depends on its enzymatic activity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2009, 66:667-80.
  34. Cal S, Arguelles JM, Fernandez PL, Lopez-Otin C: Identification, characterization, and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats. *J Biol Chem* 2001, 276:17932-40.
  35. Beristain AG, Zhu H, Leung PC: Regulated expression of ADAMTS-12 in human trophoblastic cells: a role for ADAMTS-12 in epithelial cell invasion? *PLoS One* 2011, 6:e18473.
  36. Liu CJ, Kong W, Xu K, Luan Y, Ilalov K, Sehgal B, Yu S, Howell RD, Di Cesare PE: ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *J Biol Chem* 2006, 281:15800-8.
  37. Liu CJ, Kong W, Ilalov K, Yu S, Xu K, Prazak L, Fajardo M, Sehgal B, Di Cesare PE: ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006, 20:988-90.
  38. Hedbom E, Antonsson P, Hjerpe A, Aeschlimann D, Paulsson M, Rosa-Pimentel E, Sommarin Y, Wendel M, Oldberg A, Heinegard D: Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage. *J Biol Chem* 1992, 267:6132-6.
  39. DiCesare P, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, Paulsson M: Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS Lett* 1994, 354:237-40.
  40. Moncada-Pazos A, Obaya AJ, Llamazares M, Heljasvaara R, Suarez MF, Colado E, Noel A, Cal S, Lopez-Otin C: ADAMTS-12 metalloprotease is necessary for normal inflammatory response. *J Biol Chem* 2012, 287:39554-63.
  41. Llamazares M, Obaya AJ, Moncada-Pazos A, Heljasvaara R, Espada J, Lopez-Otin C, Cal S: The ADAMTS12 metalloproteinase exhibits anti-tumorigenic properties through modulation of the Ras-dependent ERK signalling pathway. *Journal of cell science* 2007, 120:3544-52.
  42. Moncada-Pazos A, Obaya AJ, Fraga MF, Vilorio CG, Capella G, Gausachs M, Esteller M, Lopez-Otin C, Cal S: The ADAMTS12 metalloprotease gene is epigenetically silenced in tumor cells and transcriptionally activated in the stroma during progression of colon cancer. *Journal of cell science* 2009, 122:2906-13.
  43. Wei J, Richborough B, Jia T, Liu C: ADAMTS-12: a multifaced metalloproteinase in arthritis and inflammation. *Mediators of inflammation* 2014, 2014:649718.
  44. Luan Y, Kong L, Howell DR, Ilalov K, Fajardo M, Bai XH, Di Cesare PE, Goldring MB, Abramson SB, Liu CJ: Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16:1413-20.



VIP and CRF reduce ADAMTS expression and function in osteoarthritis synovial fibroblasts

Pérez-García S, Carrión M, Gutiérrez-Cañas I, González-Álvaro I, Gomariz RP, Juarranz Y

*J Cell Mol Med.* 2016 Apr;20(4):678-687



# VIP and CRF reduce ADAMTS expression and function in osteoarthritis synovial fibroblasts

Selene Pérez-García<sup>a</sup>, Mar Carrión<sup>a</sup>, Irene Gutiérrez-Cañas<sup>a</sup>, Isidoro González-Álvaro<sup>b</sup>, Rosa P. Gomariz<sup>a, #</sup>, Yasmina Juarranz<sup>a, \*, #</sup>

<sup>a</sup> Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

<sup>b</sup> Rheumatology Service, Medical Research Institute, La Princesa University Hospital, Madrid, Spain

Received: October 19, 2015; Accepted: December 4, 2015

## Abstract

ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family is known to play an important role in the pathogenesis of osteoarthritis (OA), working on aggrecan degradation or altering the integrity of extracellular matrix (ECM). Thus, the main purpose of our study was to define the role of vasoactive intestinal peptide (VIP) and corticotrophin-releasing factor (CRF), as immunoregulatory neuropeptides, on ADAMTS production in synovial fibroblasts (SF) from OA patients and healthy donors (HD). OA- and HD-SF were stimulated with pro-inflammatory mediators and treated with VIP or CRF. Both neuropeptides decreased ADAMTS-4, -5, -7 and -12 expressions, aggrecanase activity, glycosaminoglycans (GAG), and cartilage oligomeric matrix protein (COMP) degradation after stimulation with fibronectin fragments (Fn-fs) in OA-SF. After stimulation with interleukin-1 $\beta$ , VIP reduced ADAMTS-4 and -5, and both neuropeptides decreased ADAMTS-7 production and COMP degradation. Moreover, VIP and CRF reduced Runx2 and  $\beta$ -catenin activation in OA-SF. Our data suggest that the role of VIP and CRF on ADAMTS expression and cartilage degradation could be related to the OA pathology since scarce effects were produced in HD-SF. In addition, their effects might be greater when a degradation loop has been established, given that they were higher after stimulation with Fn-fs. Our results point to novel OA therapies based on the use of neuropeptides, since VIP and CRF are able to stop the first critical step, the loss of cartilage aggrecan and the ECM destabilization during joint degradation.

**Keywords:** VIP • CRF • ADAMTS • osteoarthritis • synovial fibroblast • COMP • glycosaminoglycans

## Introduction

Control of the structure and function of the extracellular matrix (ECM) is a main role of ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family. They can be classified in four subgroups on the basis of their known substrates, for instance aggrecans, other proteoglycans, cartilage oligomeric matrix protein (COMP) or procollagen. Consequently, they have essential roles in tissue development and maintenance, and their dysregulation is associated with a number of diseases such as arthritis, cancer, atherosclerosis and central nervous system injury and disorders [1].

Osteoarthritis (OA) is a debilitating degenerative disease of articular joints, mainly characterized by articular cartilage degradation, subchondral bone alterations and localized inflammation [2]. Osteoarthritis appears as a result of a progressive loss of aggrecan from cartilage, leading to exposure of the collagen matrix and its

breakdown by metalloproteases [2–4]. Within the subgroup of aggrecanases, ADAMTS-4 and -5 play important roles in OA, emerging as therapeutic targets in arthritis [5]. They are constitutively expressed in human chondrocytes and synovial fibroblasts (SF), and their expression is induced by pro-inflammatory cytokines and products of matrix degradation as fibronectin fragments (Fn-fs) [3, 6, 7]. Other important molecule in the maintenance of cartilage is COMP that stabilizes ECM *via* specific interactions with matrix components such as collagen, aggrecan and fibronectin. Its degradation may also play a key role in the pathogenesis of arthritis [3, 8]. ADAMTS-7 and -12 belongs to the COMP-cleaving enzymes subgroup. They are also produced by chondrocytes and SF and up-regulated by pro-inflammatory mediators [3, Pérez-García et al., unpublished data]. Moreover, their overexpression is related to cartilage degenerative diseases and to disease progression in a mouse model of arthritis [9, 10].

Neuropeptides present in the joints are important mediators able to control several processes as inflammation, immunomodulation and cartilage or bone maintenance. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and corticotropin-releasing factor (CRF) are two neuropeptides

<sup>#</sup>Rosa P. Gomariz and Yasmina Juarranz share senior authorship.

\*Correspondence to: Yasmina JUARRANZ.

E-mail: yashina@bio.ucm.es

present in the joint released from nerve ending, lymphocytes or SF, among other cells [11, 12]. Vasoactive intestinal peptide exerts anti-inflammatory and immunomodulatory actions in several autoimmune and inflammatory disorders [13, 14]. Treatment with VIP significantly reduced incidence and severity of arthritis in a mouse experimental model, completely abrogating joint swelling and destruction of cartilage and bone [15, 16]. In addition, VIP is able to reduce levels of some enzymes involved in ECM degradation in FLS from OA patients [17]. On the other hand, CRF can exert both pro- and anti-inflammatory functions depending on the type of receptors, tissues and disease phases [18, 19]. Furthermore, some members of CRF family have shown a protective role on cartilage and bone cellular maintenance [20, 21].

All in all, ADAMTS play a key role in the cartilage destruction in OA, and their modulation is essential for the maintenance of the joints. Thus, the main purpose of our study was to define the role of VIP and CRF on ADAMTS produced by SF, as important cells also implicated in the maintenance of the cartilage ECM, in OA patients and healthy donors (HD). To our knowledge, this is the first study demonstrating that VIP and CRF can target the ADAMTS family *in vitro*.

## Patients and methods

### Patients and SF cultures

Synovial tissue was obtained from 20 active OA patients (16 women and 4 men) aged between 48 and 87 years, at the time of knee prosthetic replacement surgery. Patients had advanced disease and were diagnosed of primary OA, excluding trauma, inflammatory disease, and other structural causes of secondary OA. Control samples from HD were obtained from four patients (2 women and 2 men) aged between 35 and 72 years, diagnosed with meniscopathy, excluding inflammatory and rheumatic diseases, at the time of a knee arthroscopic evaluation. The study was performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital La Princesa (Madrid, Spain). All biopsy samples were obtained after subjects gave their informed consent.

Synovial fibroblasts cultures were established by explant growth of synovial biopsies which were cultured in 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS)/DMEM (Lonza, Ibérica S.A.U., Barcelona, Spain) completed with 1% L-glutamine and 1% antibiotic-antimycotic (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. After three passages, residual contamination by macrophages was avoided and monocultures of SF were obtained and used for experiments until passage 8.

### Treatments of SF cultures

Healthy donors- and OA-SF were cultured in serum-free complete DMEM in the absence (untreated) or in the presence of the following agents: 10 ng/ml interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ; Immunotools GmbH, Friesoythe, Germany) or 10 nM Fn-fs 45 kDa for 24 hrs. Fn-fs were commercially pre-designed from human plasma fibronectin (Sigma-Aldrich, St Louis,

MO, USA). These treatments were applied alone or in combination with 10 nM VIP (Polypeptide) or 10 nM CRF (Phoenix Pharmaceuticals, Inc, Karlsruhe, Germany).

### RNA extraction and RT-qPCR for ADAMTS gene expression

Synovial fibroblasts were cultured in 100-mm petri dishes ( $3 \times 10^5$  cells/dish). Total RNA was obtained using Tri<sup>®</sup>Reagent (Sigma-Aldrich). 2  $\mu$ g RNA were reverse transcribed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Semi-quantitative real-time PCR analysis was performed with a TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Master Mix with manufactured-pre-designed primers and probes for  $\beta$ -actin (NM001101.3), ADAMTS-4 (NM005099.4), ADAMTS-5 (NM007038.3), ADAMTS-7 (NM014272.3) and ADAMTS-12 (NM030955.2) (Applied Biosystems). For relative quantification, we normalized the target gene expression to the housekeeping gene ( $\beta$ -actin). Results were presented as the relative expression with respect to the untreated condition using the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , as previously described [12].

### Quantification of ADAMTS in culture supernatant

Synovial fibroblasts were cultured in six-well plates ( $6 \times 10^4$  cells/well). The levels of ADAMTS were measured in the culture supernatants using a commercial ELISA kits for ADAMTS-4 and -5 (Cloud-Clone Corp, Houston, TX, USA), and ADAMTS-7 and -12 (MyBioSource, San Diego, CA, USA).

### Aggrecanase activity assay

Aggrecanase activity was measured in the SF culture supernatants from 100-mm petri dishes ( $3 \times 10^5$  cells/dish) using a Sensitive Aggrecanase Activity ELISA kit (MD Bioproducts, Zürich, Switzerland), according to the manufacturer's instructions. Briefly, this assay consists in two modules. In the Aggrecanase Module, a modified interglobular domain (aggrecan-IGD-s) is digested with aggrecanases, and its proteolytic cleavage releases an aggrecan peptide (ARGSVIL-peptide-s), which is then quantified with antibodies in the ELISA Module.

### Glycosaminoglycans and COMP assays in cartilage-SF co-cultures

Release of glycosaminoglycans (GAGs) and COMP degradation products from cartilage tissue was measured in culture medium from wells containing SF cultured over cartilage explants. Osteoarthritis human cartilages were obtained from three patients undergoing total hip arthroplasty in Hospital del Mar (Barcelona, Spain). Fixed diameter (6 mm) and height (2 mm) sections were collected from cartilage areas without macroscopically signs of OA. The samples were frozen at  $-80^\circ\text{C}$  and stored until testing. One explant per well was attached to a 24 well plate. Healthy donors- or OA-SF were added drop-wise on top of the cartilage surface ( $2 \times 10^4$  SF/explant). After 3 hrs of

incubation at 37°C, wells were filled with 1 ml DMEM 10% FBS, with the treatments described, and cultures were continued for 14 days. Culture supernatants were collected to detect the release of GAGs and COMP degradation products, using a Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay (Biocolor Ltd, County Antrim, Ireland, UK), and a Quantikine® Human COMP Immunoassay (R&D Systems, Abingdon, OX, UK), respectively. Cartilage explants were placed in OCT and frozen in liquid nitrogen. Sections were prepared using a cryostat, placed on slides and stained with Alcian blue and Callejas's tricromic.

## Runx2 Transcription factor activity assay

Synovial fibroblasts were cultured in 150-mm petri dishes ( $8 \times 10^5$  cells/dish). A Nuclear Extract Kit (Active Motif, Rixensart, Belgium) was used for nuclear extract preparation, and the protein content was measured with a QuantiPro™ BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich). The nuclear protein extracts (12 µg/well) were added to a 96-well plate and Runx2 activity was measured using a TransAM™ AML-3/Runx2 kit (Active Motif). We studied the time course of Runx2 activation after incubation with IL-1β or Fn-fs. Next, we performed the experiments at 60 min. or 30 min. respectively.

## β-catenin assay

To detect β-catenin levels, a β-catenin (Total) and a (Phospho) InstantOne™ ELISA kits were used (eBioscience, San Diego, CA, USA) with SF cellular lysates. Briefly, SF cultured in 100-mm petri dishes ( $3 \times 10^5$  cells/dish) were scraped into PBS, centrifuged and resuspended in the Cell Lysis Buffer Mix. Protein content was measured using a QuantiPro™ BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich). The levels of β-catenin in the cellular lysates were measured after 60 min. of treatment, when the highest production of β-catenin was observed.

## Statistical analysis

Samples were tested for normality by a Normality Test. Differences between means of different groups (one-to-one comparisons) were assessed using a Student's two-tailed *t*-test with  $P < 0.05$  considered significant. Results are presented as the mean with a 95% confidence interval (CI) (lower limit, upper limit). Data were analysed with GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## Results

### VIP and CRF decrease ADAMTS-4, -5, -7 and -12 expression and function after stimulation with Fn-fs in SF from OA patients

Fibronectin fragments are ECM degradation products that act as inflammatory mediators and contribute to joint destruction in OA [22]. The presence of Fn-fs in OA-SF increased the expression of ADAMTS [Pérez-García et al., unpublished data]. Our results showed

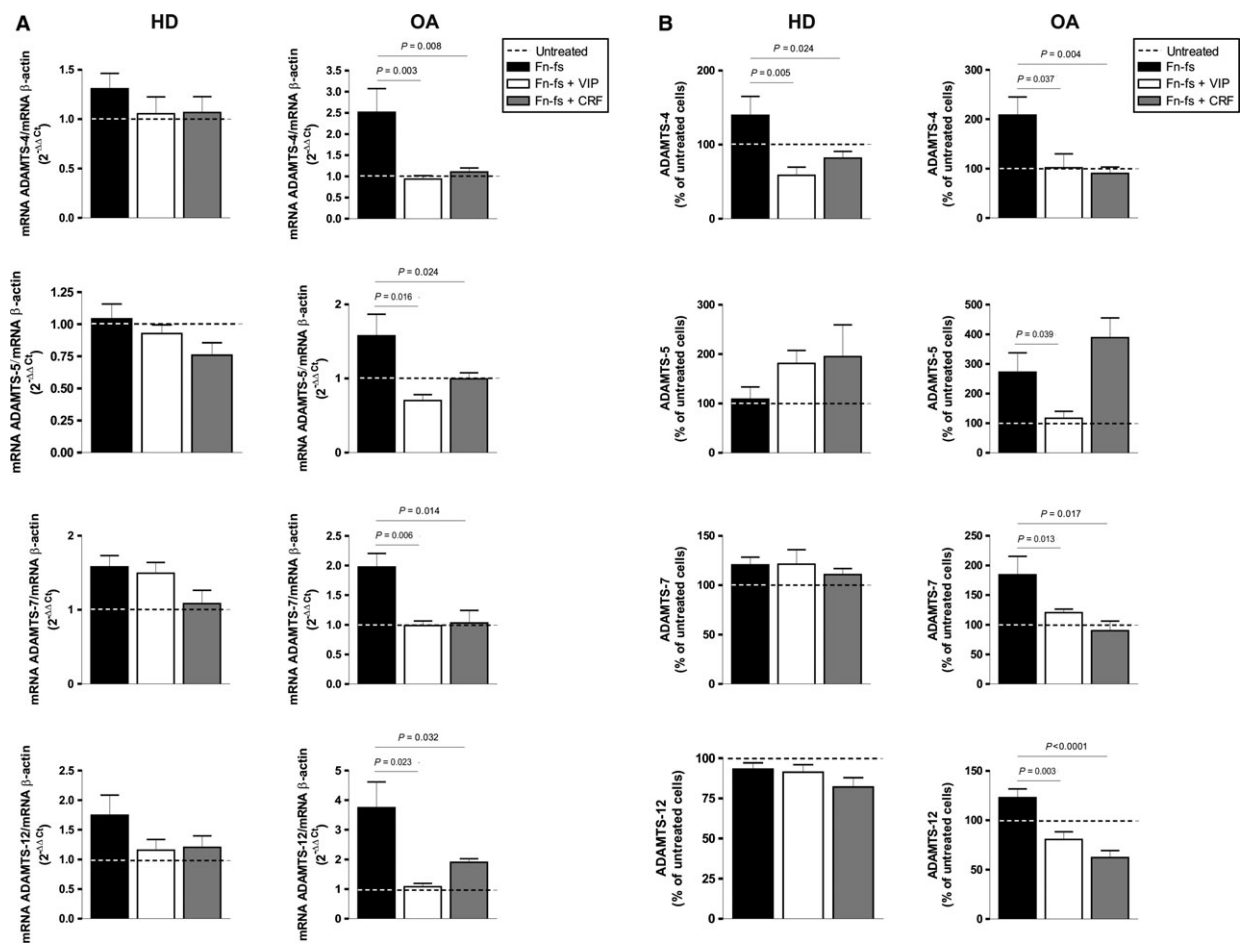
that treatment with VIP and CRF reduced mRNA expression and protein secretion of ADAMTS-4, -7 and -12 induced by Fn-fs in OA-SF. The mRNA expression and protein secretion of ADAMTS-5 were also decreased by VIP, whereas CRF only decreased the mRNA expression of these aggrecanases (Fig. 1A and B, *right*). By contrast, treatment of HD-SF with these neuropeptides after stimulation with Fn-fs only reduced the ADAMTS-4 protein production (Fig. 1A and B, *left*).

To further dissect the role of VIP and CRF on ADAMTS family, we performed functional determinations of this metalloproteinases. Degradation of aggrecan is catalysed by ADAMTS-4 and -5 [2–4]. Measurement of aggrecanase activity in culture supernatants showed a significant reduction in Fn-fs-induced OA-SF after VIP and CRF treatments (Fig. 2A, *right*). The aggrecanase activity acts on aggrecan in the cartilage ECM releasing GAGs. We next studied the capacity of SF to degrade the cartilage by measuring GAG release in the supernatants of cartilage-SF co-cultures. When OA-SF were treated with Fn-fs, VIP and CRF significantly decreased the release of GAGs to the medium (Fig. 2B, *right*). None of the neuropeptides induced changes in the aggrecanase activity and in the GAGs release in HD-SF. On the other hand, ADAMTS-7 and -12 are associated with COMP, a non-collagenous component of the cartilage ECM [3, 8]. Cartilage oligomeric matrix protein degradation products from cartilage tissue were measured in supernatants from cartilage-SF co-cultures. Also, the presence of VIP and CRF in OA-SF after induction with Fn-fs significantly decreased the release of COMP fragments (Fig. 2C, *right*). No changes were observed in the case of HD-SF (Fig. 2A–C, *left*).

### VIP and CRF differently modulate ADAMTS-4, -5, -7 and -12 expression and function after stimulation with IL-1β in SF from OA patients

To determine whether the effects of VIP or CRF on Fn-fs-induced ADAMTS could be extended to other pro-inflammatory mediators present in the OA joints, we used the catabolic cytokine IL-1β to induce ADAMTS expression in cultured SF. Previous studies have demonstrated that IL-1β induces the expression of ADAMTS-4, -5, -7 and -12 in OA-SF [Pérez-García et al., unpublished data, 23]. Here, we showed that VIP decreased the synthesis of ADAMTS-4, -5 and -7. However, treatment with CRF showed a different pattern. Although CRF reduced both, mRNA expression and protein secretion of ADAMTS-7, it did not show any effect on ADAMTS-4 and -5 (Fig. 3A and B *right*). No changes were observed in ADAMTS-12 after VIP or CRF treatments. The only effect observed in HD-SF induced by IL-1β was a reduction in the ADAMTS-4 and -5 protein production after VIP treatment (Fig. 3A and B *left*).

Furthermore, the effect of VIP and CRF on ADAMTS-4 and -5 expression after stimulation with IL-1β was not confirmed at functional level. Aggrecanase activity and GAG release in the supernatants of OA cartilage-SF co-cultures showed similar values in the presence and absence of these neuropeptides (Fig. 4A and B, *right*). Conversely, the presence of VIP and CRF in IL-1β-induced OA-SF significantly decreased the release of COMP fragments, related to



**Fig. 1** mRNA and protein expression of ADAMTS in Fn-fs-induced OA-SF in the presence of VIP or CRF. **(A)** ADAMTS-4, -5, -7 and -12 mRNA expression was measured after 24 hrs of treatment by RT-qPCR, normalized to  $\beta$ -actin and presented as the relative quantification with respect to the untreated cells using the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (see Patients and methods). Values are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of HD ( $n = 4$ ) (left) and OA ( $n = 7$ ) (right), performed in triplicate. **(B)** The presence of ADAMTS-4, -5, -7 and -12 in the supernatants was determined by ELISA after 24 hrs of treatment. Values are presented as the percentage of untreated cells (mean  $\pm$  S.E.M.) of HD ( $n = 4$ ) (left) and OA ( $n = 7$ ) (right), performed in duplicate. Dashed lines represent the untreated condition. Significant differences between treatments are indicated by a bar with the  $P$ -value above.

ADAMTS-7 and -12 actions (Fig. 4C, right). At functional level, no changes were observed in IL-1 $\beta$ -induced HD-SF after VIP or CRF treatment (Fig. 4 A–C, left).

(Fig. 5B, right). In this case, we measured the total  $\beta$ -catenin that mainly represented the active form since the levels of phosphorylated  $\beta$ -catenin were undetectable. No changes were observed in HD-SF (Fig. 5A and B, left).

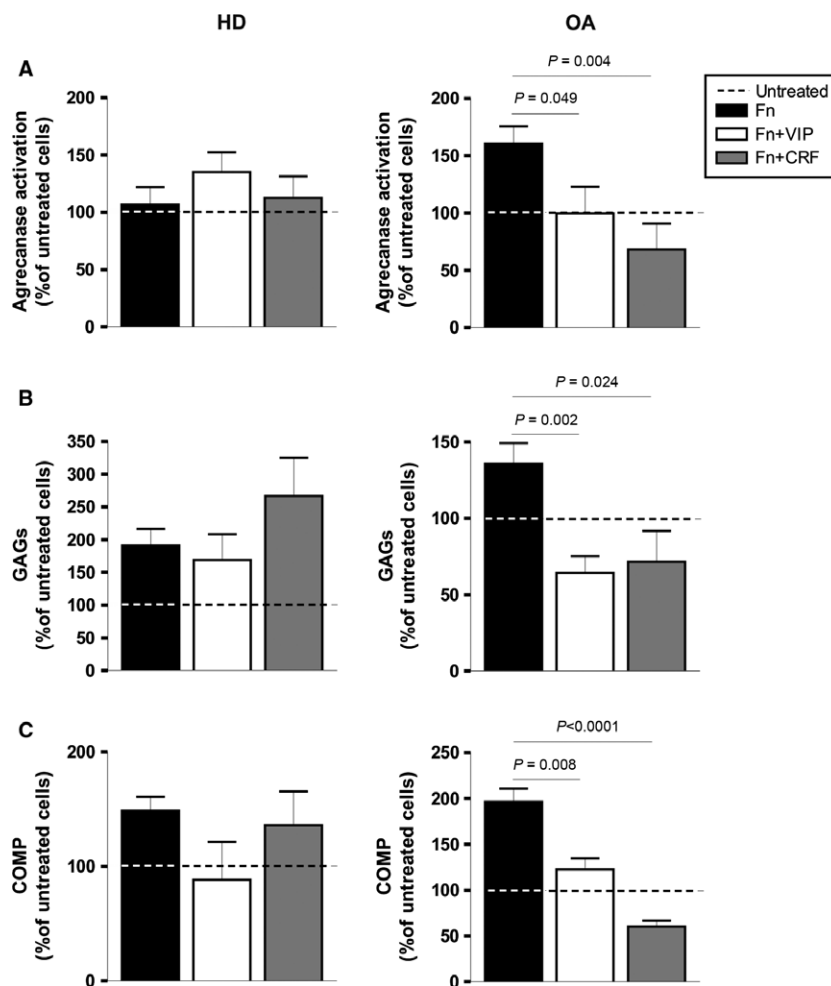
## VIP and CRF reduce activation of Runx2 and $\beta$ -catenin transcription factors in SF from OA patients

To elucidate the mechanism involved in the modulation of the ADAMTS family by VIP and CRF, we tested two transcription factors that regulate gene expression of some ADAMTS, Runx2 and  $\beta$ -catenin [24, 25]. Vasoactive intestinal peptide and CRF decreased the Runx2 activation induced by Fn-fs and IL-1 $\beta$  in OA-SF (Fig. 5A, right). The other transcription factor studied,  $\beta$ -catenin, showed the same profile

## Discussion

At present, this is the first study demonstrating the role of two endogenous neuropeptides present in the joint microenvironment, VIP and CRF, on ADAMTS family *in vitro*. Destruction of the ECM from the articular cartilage and subchondral bone in OA joints, is thought to be mediated by excessive proteolytic activity as a result of several events that take place in sequence [26]. The ADAMTS family is known to play an important role in the pathogenesis of OA, working on aggrecan degradation or altering the integrity of the ECM [8, 27–

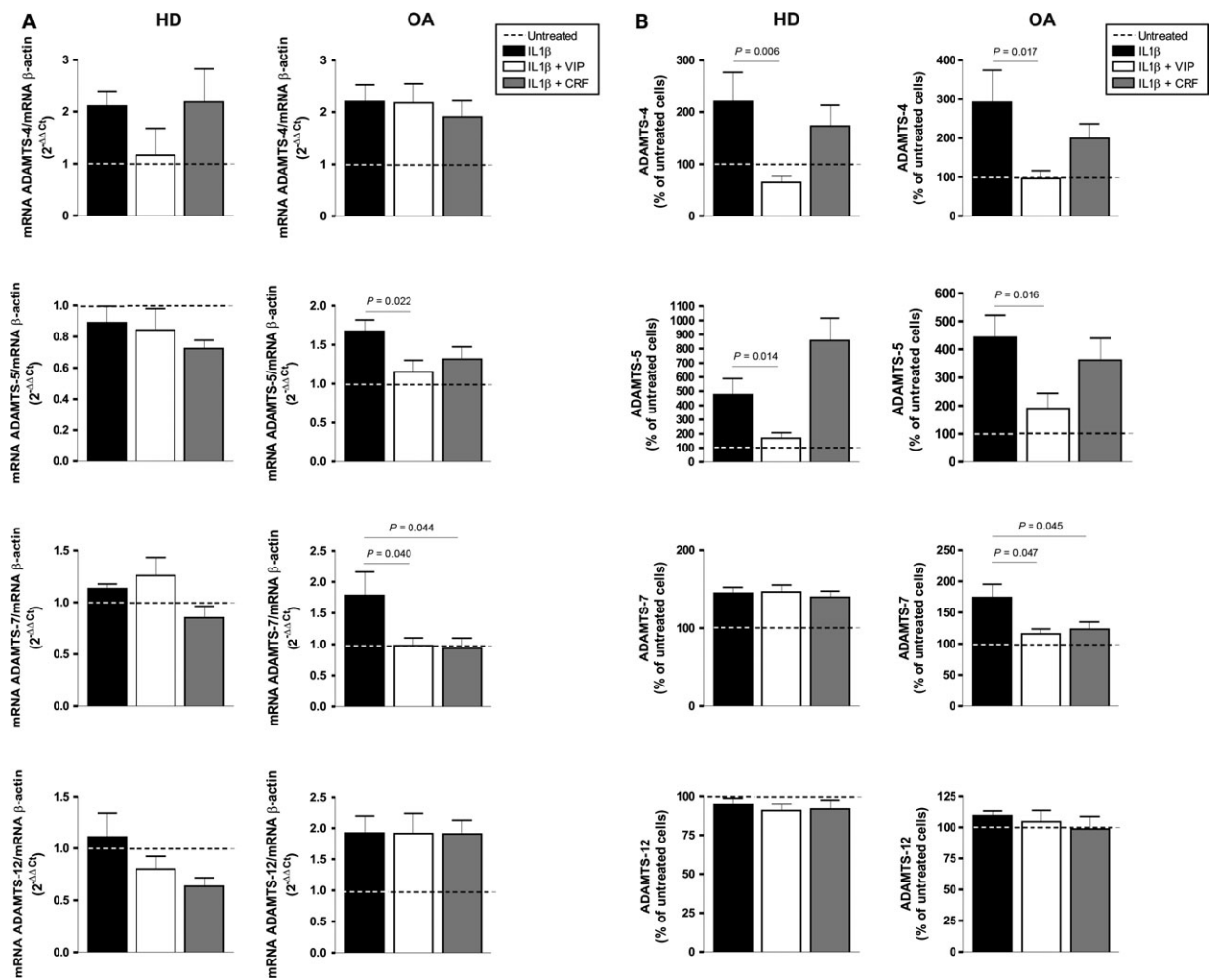
**Fig. 2** Aggrecanase activity and detection of GAGs and COMP degradation products in Fn-fs-induced OA-SF in the presence of VIP or CRF. **(A)** Aggrecanase activity was measured in culture supernatants by an Aggrecanase Activity ELISA kit after 24 hrs of treatment. A mean of duplicate determinations was obtained for each HD ( $n = 4$ ) (left) and OA ( $n = 5$ ) (right). **(B)** GAGs in the supernatants from cartilage-SF co-cultures were detected after 14 days of treatment using a Blyscan™ Sulfated Glycosaminoglycan Assay. A mean of duplicate determinations was obtained for each HD ( $n = 3$ ) (left) and OA ( $n = 3$ ) (right). **(C)** COMP degradation products in the supernatants from cartilage-SF co-cultures were detected after 14 days of treatment using a Quantikine® Human COMP Immunoassay. A mean of triplicate determinations was obtained for each HD ( $n = 3$ ) (left) and OA ( $n = 3$ ) (right). Dashed lines represent the untreated condition. Values are presented as the percentage of untreated cells (mean  $\pm$  S.E.M.). Significant differences between treatments are indicated by a bar with the  $P$ -value above.



29]. The inhibition of these degradation enzymes can slow down or block disease progression. Thus, the characterization of mediators as neuropeptides, which can modulate these enzymes, is of great importance for both physiopathological and therapeutic perspectives.

Vasoactive intestinal peptide is a mediator shared by the neuroendocrine-immune network, which is considered as a potential candidate for treatment in inflammatory and autoimmune diseases [13]. Recently, VIP has been considered as a clinical biomarker in rheumatoid arthritis (RA) and OA, where low serum VIP levels were associated with worse prognosis [30, 31]. In this way, VIP decreases pro-inflammatory mediators and degradative proteases [11, 13, 17, 32]. Moreover, protective effects of VIP upon bone and cartilage destruction have been described in experimentally induced arthritis [15, 16]. Present results showed that VIP differentially affects ADAMTS-4, -5, -7 and -12 in OA-SF depending on the inflammatory mediator that induced their expression. When IL-1 $\beta$  was present, the effect of VIP on ADAMTS-4 and -5 protein production was not confirmed at functional level. The aggrecanase activity in SF and the GAG release in cartilage-SF co-cultures showed similar values in the presence or absence of VIP, probably because of the fact that IL-1 $\beta$

did not induce the aggrecanase activity in SF [Pérez-García et al., unpublished data, 33, 34]. However, VIP decreased expression and function of ADAMTS-4 and -5 when they were induced by Fn-fs, that was reflected in the reduction in the aggrecanase activity as well as in the decrease in GAGs liberated from the cartilage explants. In the case of ADAMTS associated with COMP degradation, VIP diminished ADAMTS-7 mRNA expression and protein production in OA-SF in the presence of both inflammatory mediators. Interestingly, the expression of ADAMTS-7 is relatively late in OA development [8]. However, ADAMTS-12 transcript and protein were only decreased after Fn-fs stimulation. Since VIP significantly decreased COMP degradation after both Fn-fs and IL-1 $\beta$  stimulation, altogether these data may suggest that the effects observed are mainly mediated by ADAMTS-7. Fibronectin fragments result from progressive cartilage degeneration in injured joints and act as a continuous loop degrading cartilage through up-regulation of cartilage degrading enzymes [Pérez-García et al., unpublished data, 35]. Our data suggest that the role of VIP blocking ECM degradation through the modulation of ADAMTS expression could be related to the OA pathology since scarce effects were produced by VIP in HD-SF. In addition, its actions might be



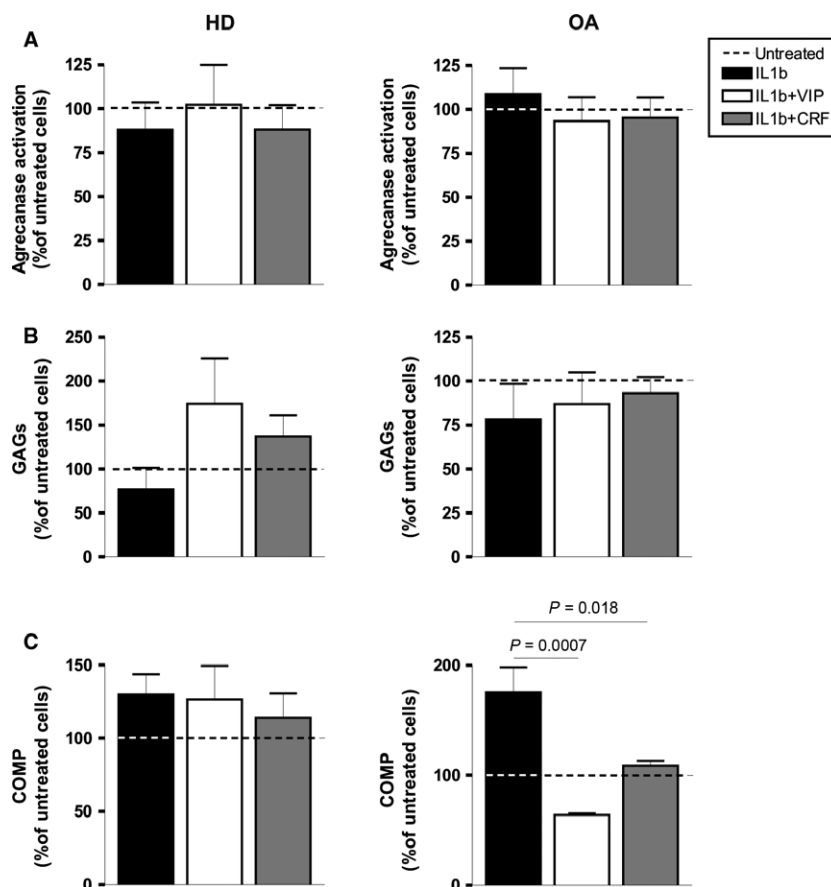
**Fig. 3** mRNA and protein expression of ADAMTS in IL-1 $\beta$ -induced OA-SF in the presence of VIP or CRF. **(A)** ADAMTS-4, -5, -7 and -12 mRNA expression after 24 hrs of treatment was measured by RT-qPCR, normalized to  $\beta$ -actin mRNA expression and presented as the relative quantification with respect to the untreated cells using the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (see Patients and methods). Values are presented as the mean  $\pm$  S.E.M. of HD ( $n = 4$ ) (left) and OA ( $n = 7$ ) (right), performed in triplicate. **(B)** The presence of ADAMTS-4, -5, -7 and -12 in the supernatants was determined by ELISA after 24 hrs of treatment. Values are presented as the percentage of untreated cells (mean  $\pm$  S.E.M.) of HD ( $n = 4$ ) (left) and OA ( $n = 7$ ) (right), performed in duplicate. Dashed lines represent the untreated condition. Significant differences between treatments are indicated by a bar with the  $P$ -value above.

higher when a degradation loop has been established given that the greater effects were observed after induction by Fn-fs, present only in the late stages of OA.

Corticotrophin-releasing factor has also an important role in the homeostasis, both systemically and locally. An increasing body of data point to an anti-inflammatory action of CRF *in vitro* [18, 36, 37]. Besides, low CRF levels are clearly associated with disease severity in a human autoimmune disease [38]. Another member of its family, urocortin, is implicated in osteoclast differentiation and is also related to the maintenance of the cartilage and bone in OA [20, 21]. We observed that CRF had similar effects to VIP on ADAMTS-7 and -12 expression and production after treatment with IL-1 $\beta$  and Fn-fs, and on ADAMTS-4 and -5

expressions only after Fn-fs stimulation, with no effect after induction with IL-1 $\beta$ . At functional level, the effects observed with both neuropeptides were similar, decreasing the action of ADAMTS-7 and -12 after both stimuli, and ADAMTS-4 and -5 functions only after Fn-fs stimulation. These results may point out that CRF could block ECM degradation in OA modulating ADAMTS expression, in a similar way to VIP in late stages of the disease when a degradation loop has already been established. Moreover, a crosstalk between VIP and CRF in RA and OA has also been described [12]. In addition, it is also important to consider that some pathophysiological conditions that take place during the disease can affect the release of this neuropeptides, modifying their levels [30, 31].

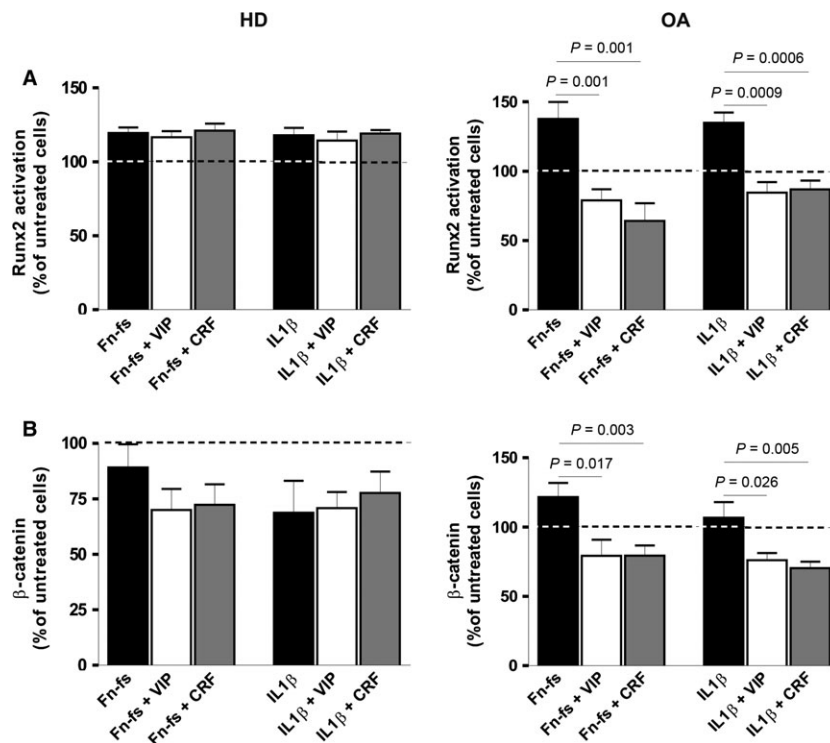
**Fig. 4** Aggrecanase activity and detection of GAGs and COMP degradation products in OA-SF after stimulation with IL-1 $\beta$  in the presence of VIP or CRF. **(A)** Aggrecanase activity was measured in culture supernatants by Aggrecanase Activity ELISA kit after 24 hrs of treatment. A mean of duplicate determinations was obtained for each HD ( $n = 4$ ) (left) and OA ( $n = 5$ ) (right). **(B)** GAGs in the supernatants from cartilage-SF co-cultures were detected after 14 days of treatment using a Blyscan<sup>TM</sup> Sulfated Glycosaminoglycan Assay. A mean of duplicate determinations was obtained for each HD ( $n = 3$ ) (left) and OA ( $n = 3$ ) (right). **(C)** COMP degradation products in the supernatants from cartilage-SF co-cultures were detected after 14 days of treatment using a Quantikine<sup>®</sup> Human COMP Immunoassay. A mean of triplicate determinations was obtained for each HD ( $n = 3$ ) (left) and OA ( $n = 3$ ) (right). Dashed lines represent the untreated condition. Values are presented as the percentage of untreated cells (mean  $\pm$  S.E.M.). Significant differences between treatments are indicated by a bar with the  $P$ -value above.



Runx 2 is an important transcription factor involved in both histogenesis and maintenance of the skeletal tissue, as well as in chondrocytes maturation and hypertrophy in OA [39, 40]. On the other hand,  $\beta$ -catenin is implicated in chondrocytes differentiation and skeletal maintenance, related to osteoblast differentiation and the blockade of osteoclastogenesis, which plays an important role in the pathology of OA [41–43]. Several studies have demonstrated that Runx2 and  $\beta$ -catenin are associated to ADAMTS-4 and -5 [24, 25, 44], nevertheless, there are no studies related to the transcription factors involved in ADAMTS-7 and -12 gene expressions. Here, we showed that VIP and CRF reduced activation of Runx2 and  $\beta$ -catenin transcription factors in OA-SF after induction by IL-1 $\beta$  and Fn-fs in OA-SF. As part of the anti-inflammatory action of both neuropeptides [13, 14, 18, 19], the effects of VIP and CRF on ADAMTS could be mediated by the blockade of both transcription factors. Vasoactive intestinal peptide and CRF have demonstrated a protective role in cartilage and bone maintenance [15, 16, 20, 21, 45]. This effect will depend on the cell type, the signalling pathways involved, and the interaction between the different cells present in the joint. Previous data reported the same effect of VIP on  $\beta$ -catenin in renal cancer cells [46]. In relation to CRF, it has only been described that Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway is increased by CRF in a mouse pituitary corticotroph cancer cells [47]. Discrepancy with our results could be because of the different samples under study. Moreover, this is the first report demonstrating

the modulation of Runx2 by VIP and CRF *in vitro*. Different studies have described that VIP activates PKA phosphorylating CREB inhibiting c-Jun an AP-1 in RA and OA-SF [15, 48, 49]. PKA/CREB signalling is also activated by CRF [50]. As Runx2 is activated by c-Jun [51], this signalling pathway could be implicated in the decrease in Runx2 observed after treatment with VIP and CRF. Moreover, it could impact in the effect observed on  $\beta$ -catenin, as both signalling pathways are connected [52]. On the other hand, it has been shown that the transcription factor NF $\kappa$ B plays an important role regulating different proinflammatory and destructive mediators in OA, including several matrix metalloproteases and ADAMTS [53, 54]. In this sense, it has been reported that VIP decreases NF $\kappa$ B in synovial cells from CIA-treated mice [15, 48]. Then, the blockade of this signalling pathway could also be implicated in the decrease in the ADAMTS expression observed after treatment with VIP.

Regarding the effect of other neuropeptides on ADAMTS and consequently on ECM maintenance, data are scarce, even more in OA pathology. Only one study described that calcitonin decreases ADAMTS-4 expression in a mouse model of OA [55], having a chondroprotective effect in a rabbit model of early OA [56]. We have demonstrated that VIP and CRF are able to decrease ADAMTS expression and function in OA-SF. Indeed, VIP reduces uPA (urokinase-type plasminogen activator) in OA-SF, a proteolytic enzyme upstream of the ADAMTS [17]. The uPA-ADAMTS axis is the main



**Fig. 5** Runx2 and  $\beta$ -catenin activation in OA-SF after Fnf-fs or IL-1 $\beta$  in the presence of VIP or CRF. **(A)** Runx2 activation was measured after treatment with IL-1 $\beta$  for 60 min. or Fnf-fs for 30 min. in the presence or absence of VIP or CRF, in OA-SF nuclear extracts by TransAM<sup>TM</sup>. A mean of duplicate determinations was obtained for each HD ( $n = 4$ ) (left) and OA ( $n = 4$ ) (right). **(B)**  $\beta$ -catenin levels were detected after treatment with IL-1 $\beta$  or Fnf-fs for 60 min. in the presence or absence of VIP or CRF, in OA-SF cellular lysates by ELISA. A mean of duplicate determinations was obtained for each HD ( $n = 4$ ) (left) and OA ( $n = 5$ ) (right). Dashed lines represent the untreated condition. Values are presented as the percentage of untreated cells (mean  $\pm$  S.E.M.). Significant differences between treatments are indicated by a bar with the  $P$ -value above.

responsible for aggrecan cleavage and cartilage loss in OA. Matrix metalloproteinases (MMPs) participate downstream in this process and continue with the degradation of collagen [26]. In this sense, VIP decreases MMP-9 and -13 in OA-SF after IL-1 $\beta$  and Fnf-fs stimulation [17].

Although more studies are needed to elucidate the mechanism of action of VIP and CRF, our results point to novel targets to relieve the destruction of cartilage ECM in OA joints. Considering that VIP and CRF are able to modulate the first critical step, the loss of aggrecan in the destabilization of cartilage ECM, we corroborate the role of neuropeptides as potential therapeutic targets. Emerging therapies that directly or indirectly inhibit ADAMTS often lead to favourable outcome in OA patients.

## Acknowledgements

We are grateful to all patients and the collaborating clinicians for their participation in this study. This study was supported by a grant from Red de Investigación en Inflamación y Enfermedades Reumáticas (RIER) (RD12/0009/0002 to MC), a grant from Instituto de Salud Carlos III,

Spain, co-financed by FEDER, European Union (PI12/00758 to SPG), and a grant from Comunidad de Madrid/FEDER (RAPHYME program, S2010/BMD2350).

## Conflicts of interest

A patent application (P201230827) for the use of VIP as a prognostic marker in autoimmune diseases has been deposited by the Biomedical Research Foundation of La Princesa University Hospital and Complutense University of Madrid at the Oficina Española de Patentes y Marcas. The full name of the patent application is: VIP use as a prognostic marker of autoimmune diseases.

## Author contribution

SPG performed the research; RPG and YJ designed the research study; SPG and MC analysed the data; IGA collected the samples; RPG, YJ, SPG and IGC wrote the paper.

## References

1. Kelwick R, Desanlis I, Wheeler GN, *et al*. The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* 2015; 16: 113.
2. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, *et al*. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012; 64: 1697–707.
3. Lin EA, Liu CJ. The role of ADAMTS in arthritis. *Protein Cell.* 2010; 1: 33–47.
4. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in

- osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1824: 133–45.
5. **Dancevic CM, McCulloch DR.** Current and emerging therapeutic strategies for preventing inflammation and aggrecanase-mediated cartilage destruction in arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2014; 16: 429.
  6. **Ismail HM, Yamamoto K, Vincent TL, et al.** Interleukin-1 acts via the JNK-2 signaling pathway to induce aggrecan degradation by human chondrocytes. *Arthritis Rheumatol*. 2015; 67: 1826–36.
  7. **Stanton H, Ung L, Fosang AJ.** The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. *Biochem J*. 2002; 364: 181–90.
  8. **Lai Y, Bai X, Zhao Y, et al.** ADAMTS-7 forms a positive feedback loop with TNF-alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014; 73: 1575–84.
  9. **Zhang Y, Wei F, Liu CJ.** Overexpression of ADAMTS-7 leads to accelerated initiation and progression of collagen-induced arthritis in mice. *Mol Cell Biochem*. 2015; 404: 171–9.
  10. **Zhang Q, Huang M, Wang X, et al.** Negative effects of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 on endplate cartilage differentiation. *J Orthop Res*. 2012; 30: 1238–43.
  11. **Juarranz Y, Gutierrez-Canas I, Santiago B, et al.** Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 2008; 58: 1086–95.
  12. **Perez-Garcia S, Juarranz Y, Carrion M, et al.** Mapping the CRF-urocortins system in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts: effect of vasoactive intestinal peptide. *J Cell Physiol*. 2011; 226: 3261–9.
  13. **Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, et al.** VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1070: 51–74.
  14. **Gomariz RP, Gutierrez-Canas I, Arranz A, et al.** Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics. *Curr Pharm Des*. 2010; 16: 1063–80.
  15. **Juarranz Y, Abad C, Martinez C, et al.** Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7: R1034–45.
  16. **Delgado M, Abad C, Martinez C, et al.** Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med*. 2001; 7: 563–8.
  17. **Perez-Garcia S, Carrion M, Jimeno R, et al.** Urokinase plasminogen activator system in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients: modulation by inflammatory mediators and neuropeptides. *J Mol Neurosci*. 2014; 52: 18–27.
  18. **Tsatsanis C, Androulidaki A, Dermitzaki E, et al.** Corticotropin releasing factor receptor 1 (CRF1) and CRF2 agonists exert an anti-inflammatory effect during the early phase of inflammation suppressing LPS-induced TNF-alpha release from macrophages via induction of COX-2 and PGE2. *J Cell Physiol*. 2007; 210: 774–83.
  19. **Tsatsanis C, Dermitzaki E, Venihaki M, et al.** The corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides as local modulators of adrenal function. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64: 1638–55.
  20. **Combs CE, Fuller K, Kumar H, et al.** Urocortin is a novel regulator of osteoclast differentiation and function through inhibition of a canonical transient receptor potential 1-like cation channel. *J Endocrinol*. 2012; 212: 187–97.
  21. **Intekhab-Alam NY, White OB, Getting SJ, et al.** Urocortin protects chondrocytes from NO-induced apoptosis: a future therapy for osteoarthritis? *Cell Death Dis*. 2013; 4: e717.
  22. **Yasuda T.** Activation of Akt leading to NF-kappaB up-regulation in chondrocytes stimulated with fibronectin fragment. *Biomed Res*. 2011; 32: 209–15.
  23. **Imada K, Oka H, Kawasaki D, et al.** Anti-arthritis action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Biol Pharm Bull*. 2010; 33: 410–4.
  24. **Thirunavukkarasu K, Pei Y, Moore TL, et al.** Regulation of the human ADAMTS-4 promoter by transcription factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 345: 197–204.
  25. **Thirunavukkarasu K, Pei Y, Wei T.** Characterization of the human ADAMTS-5 (aggrecanase-2) gene promoter. *Mol Biol Rep*. 2007; 34: 225–31.
  26. **Rengel Y, Ospelt C, Gay S.** Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9: 221.
  27. **Huang K, Wu LD.** Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review. *J Int Med Res*. 2008; 36: 1149–60.
  28. **Durigova M, Troeberg L, Nagase H, et al.** Involvement of ADAMTSS and hyaluronidase in aggrecan degradation and release from OSM-stimulated cartilage. *Eur Cell Mater*. 2011; 21: 31–45.
  29. **Zhang E, Yan X, Zhang M, et al.** Aggrecanases in the human synovial fluid at different stages of osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 2013; 32: 797–803.
  30. **Jiang W, Gao SG, Chen XG, et al.** Expression of synovial fluid and articular cartilage VIP in human osteoarthritic knee: a new indicator of disease severity? *Clin Biochem*. 2012; 45: 1607–12.
  31. **Martinez C, Ortiz AM, Juarranz Y, et al.** Serum levels of vasoactive intestinal Peptide as a prognostic marker in early arthritis. *PLoS ONE*. 2014; 9: e85248.
  32. **Carrion M, Juarranz Y, Seoane IV, et al.** VIP modulates IL-22R1 expression and prevents the contribution of rheumatoid synovial fibroblasts to IL-22-mediated joint destruction. *J Mol Neurosci*. 2014; 52: 10–7.
  33. **Vankemmelbeke MN, Holen I, Wilson AG, et al.** Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium. *Eur J Biochem*. 2001; 268: 1259–68.
  34. **Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, et al.** Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. *J Immunol*. 2002; 168: 1405–12.
  35. **Ding L, Guo D, Homandberg GA, et al.** A single blunt impact on cartilage promotes fibronectin fragmentation and upregulates cartilage degrading stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 in a bovine *ex vivo* model. *J Orthop Res*. 2014; 32: 811–8.
  36. **Dermitzaki E, Liapakis G, Androulidaki A, et al.** Corticotrophin-Releasing Factor (CRF) and the urocortins are potent regulators of the inflammatory phenotype of human and mouse white adipocytes and the differentiation of mouse 3T3L1 pre-adipocytes. *PLoS ONE*. 2014; 9: e97060.
  37. **Ullewar MP, Umathe SN.** A possible role of endogenous central corticotrophin releasing factor in lipopolysaccharide induced thymic involution and cell apoptosis: effect of peripheral injection of corticotrophin releasing factor. *J Neuroimmunol*. 2015; 280: 58–65.
  38. **Melief J, de Wit SJ, van Eden CG, et al.** HPA axis activity in multiple sclerosis correlates with disease severity, lesion type and gene expression in normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol*. 2013; 126: 237–49.
  39. **Long F, Ornitz DM.** Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5: a008334.
  40. **van der Kraan PM, van den Berg WB.** Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage

- degeneration? *Osteoarthritis Cartilage*. 2012; 20: 223–32.
41. **Luyten FP, Tylzanowski P, Lories RJ.** Wnt signaling and osteoarthritis. *Bone*. 2009; 44: 522–7.
  42. **Corr M.** Wnt-beta-catenin signaling in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008; 4: 550–6.
  43. **Niedzwiedzki T, Filipowska J.** Bone remodeling in the context of cellular and systemic regulation: the role of osteocytes and the nervous system. *J Mol Endocrinol*. 2015; 55: R23–36.
  44. **Yuasa T, Otani T, Koike T, et al.** Wnt/ $\beta$ -catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Lab Invest*. 2008; 88: 264–74.
  45. **Juhász T, Helgadottir SL, Tamás A, et al.** PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides*. 2015; 66: 51–7.
  46. **Vacas E, Arenas MI, Munoz-Moreno L, et al.** Antitumoral effects of vasoactive intestinal peptide in human renal cell carcinoma xenografts in athymic nude mice. *Cancer Lett*. 2013; 336: 196–203.
  47. **Khattak MN, Buchfelder M, Kleindienst A, et al.** CRH and SRIF have opposite effects on the Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway through PKA/GSK-3 $\beta$  in corticotroph pituitary cells. *Cancer Invest*. 2010; 28: 797–805.
  48. **Delgado M, Munoz-Elias EJ, Kan Y, et al.** Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor alpha transcriptional activation by regulating nuclear factor- $\kappa$ B and cAMP response element-binding protein/c-Jun. *J Biol Chem*. 1998; 273: 31427–36.
  49. **Carrion M, Juarranz Y, Perez-Garcia S, et al.** RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum*. 2011; 63: 1626–36.
  50. **Hauger RL, Risbrough V, Oakley RH, et al.** Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1179: 120–43.
  51. **Vimalraj S, Arumugam B, Miranda PJ, et al.** Runx2: structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol*. 2015; 78: 202–8.
  52. **Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, et al.** Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem*. 2005; 280: 33132–40.
  53. **Bondeson J, Wainwright S, Hughes C, et al.** The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. *Clin Exp Rheumatol*. 2008; 26: 139–45.
  54. **Wang Z, Hutton WC, Yoon ST.** Bone morphogenetic protein-7 antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced activation of nuclear factor kappaB and up-regulation of the ADAMTS, leading to decreased degradation of disc matrix macromolecules aggrecan and collagen II. *Spine J*. 2014; 14: 505–12.
  55. **Cheng T, Zhang L, Fu X, et al.** The potential protective effects of calcitonin involved in coordinating chondrocyte response, extracellular matrix, and subchondral trabecular bone in experimental osteoarthritis. *Connect Tissue Res*. 2013; 54: 139–46.
  56. **Mero A, Campisi M, Favero M, et al.** A hyaluronic acid-salmon calcitonin conjugate for the local treatment of osteoarthritis: chondro-protective effect in a rabbit model of early OA. *J Control Release*. 2014; 187: 30–8.

## Discusión





## 1. Implicación del sinoviocito fibroblástico en la patogénesis de la artrosis mediante la producción de proteinasas

---

El **SF**, como una de las principales células residentes en la membrana sinovial de la articulación diartrodial, juega un papel central en la patogenia de las enfermedades reumáticas tales como la OA y la AR, estando implicado en dos de los procesos clave: la **sinovitis** y la **degradación** de la MEC. Aunque el papel del SF en la AR es bien conocido, su implicación en la OA está aún por explorar, si bien es cierto que la asunción de la existencia de un proceso inflamatorio también en esta enfermedad, empieza a arrojar un mayor interés sobre este tipo celular.

Diferentes estudios han demostrado que los SF de OA contribuyen a la progresión de la enfermedad favoreciendo el proceso inflamatorio mediante la liberación de citocinas y otros mediadores proinflamatorios (Benito *et al.*, 2005; Nair *et al.*, 2012; Shibakawa *et al.*, 2003; Sieghart *et al.*, 2015). Por otro lado, el papel de las proteinasas también es importante en la degradación de la MEC que tiene lugar en la OA. Dicho papel se ha estudiado más ampliamente en condrocitos (Troeberg y Nagase, 2012). Así, nos propusimos estudiar la contribución del SF al proceso degradativo de la OA, mediante la producción de **proteinasas** que contribuyen al inicio y la progresión de la enfermedad.

Los SF producen **uPA**, una serín proteinasa importante para la activación de la cascada de proteinasas que participan en la destrucción articular. **Nuestros resultados demuestran que los SF de OA producen uPA y PAI-1, y expresan uPAR de manera constitutiva, confirmando estudios previos en SF de AR y OA** (Cericic *et al.*, 1998). En los SF de OA y AR se han observado niveles elevados de uPA y uPAR, que influyen en la capacidad invasiva de los SF y estimulan la liberación de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-8 y TNF $\alpha$  (Del Rosso *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2003; Martel-Pelletier *et al.*, 2001; Serrati *et al.*, 2011), además de estar asociados con los niveles de MMP-13 (Kim *et al.*, 2012). Asimismo, en modelos murinos, se ha comprobado que la actividad serín proteasa de uPA es capaz de inducir el proceso inflamatorio de la artritis, promoviendo también la angiogénesis (Apparailly *et al.*, 2002; Jin *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005). Por otro lado, los

niveles del inhibidor de uPA, PAI-1, se han descrito disminuidos en el suero de pacientes de OA de mano y rodilla en fases iniciales, pudiendo servir como un potencial biomarcador para la detección temprana de la enfermedad (Ling *et al.*, 2009). Aunque otros investigadores han observado que tanto los niveles de PAI-1 como los de uPA y uPAR, estaban incrementados en el líquido sinovial de pacientes de OA mandibular respecto a los controles sanos (Tang *et al.*, 2010). Estas discrepancias podrían deberse al diferente tipo de muestra con la que se han realizado los experimentos, así como a la distinta localización de la OA y fase de la enfermedad. Asimismo, en modelos animales de OA, uPA induce proliferación de células sinoviales y sinovitis, además de incrementar la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e iNOS. En estos modelos, uPA es también capaz de inducir hiperalgesia asociada a la sintomatología de la enfermedad (Shuang *et al.*, 2015).

uPA es capaz de activar diferentes enzimas de degradación entre las que se encuentran las **MMPs**. La contribución de las MMPs a la patogenia de la OA se ha estudiado principalmente en condrocitos. Entre las MMPs cabe destacar la implicación de las **colagenasas**, cuyos niveles se encuentran elevados en la OA, además de estar asociados con los niveles de plasmina. Por otro lado, la expresión de MMP-1 y -13, se relaciona también con la capacidad invasiva de los SF de AR (Tolboom *et al.*, 2002). Los tres tipos de colagenasas tienen una distribución y una implicación diferentes en la evolución de la enfermedad. Mientras que las MMP-1 y -8 se encuentran preferentemente en la zona superficial del cartílago, la MMP-13 se suele localizar en la zona profunda y en la zona transitoria próxima a ella (Martel-Pelletier *et al.*, 2001). Asimismo, la MMP-1 presenta una mayor implicación en la destrucción articular durante el proceso inflamatorio, incrementando sus niveles a medida que progresa la enfermedad, mientras que la MMP-13 se relaciona más con las fase de remodelación, estabilizando sus niveles en estadios moderados de la OA (Fernandes *et al.*, 1998). La **MMP-13**, una de las MMPs activadas por uPA (Carmeliet *et al.*, 1997), es la principal colagenasa en la OA, cuyos niveles se encuentran elevados en el cartílago y tejido sinovial de estos pacientes (Bau *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2006; Martel-Pelletier *et al.*, 2001; Piecha *et al.*, 2010). Esta MMP está implicada en la degradación del **colágeno tipo II**, uno de los principales componentes de la MEC, junto con el agregano.

Diferentes estudios en animales han demostrado que la MMP-13 es crítica en la degradación del cartílago y la progresión de la OA (Little *et al.*, 2009; Piecha *et al.*, 2010; Settle *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013), aumentando su expresión en estadios avanzados de la enfermedad (Bau *et al.*, 2002). **Nuestros resultados demuestran que el SF de OA también produce MMP-13 constitutivamente, contribuyendo a la progresión de la patología.**

Las **gelatinasas** también juegan un papel importante en las patologías artríticas. Así, los niveles de gelatinasas también se han descrito elevados en pacientes de OA y AR (Martel-Pelletier *et al.*, 2001; Rengel *et al.*, 2007). Entre las gelatinasas, uPA es capaz de activar a la **MMP-9** (Carmeliet *et al.*, 1997), que a su vez se asocia con una acción más proinflamatoria que la MMP-2. Estudios previos han descrito que los SF de AR producen mayor cantidad de MMP-9 que los de OA (Xue *et al.*, 2007), donde contribuyen a la degradación de la MEC del *lining* (Poduval *et al.*, 2007). Asimismo, los niveles de MMP-9 están más elevados en el suero y las articulaciones de los pacientes de AR que en los de OA, correlacionándose con la progresión de la enfermedad (Ahrens *et al.*, 1996). **Nuestros resultados corroboran que los SF de OA también producen MMP-9 constitutivamente.** Los niveles de MMP-9 en el líquido sinovial de pacientes de OA y AR también se asocian con los de uPA, estando ambas implicadas en la activación de MMP-13 (Chu *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2012).

Las **ADAMTS** son otras de las metaloproteinasas esenciales en la patogenia de la OA. **Nuestros datos demuestran que los SF de HD y OA producen ADAMTS-4, -5, -7 y -12 constitutivamente, siendo ADAMTS-5 la más expresada y ADAMTS-12 la de menor expresión.**

Las **agrecanasas ADAMTS-4 y -5** degradan el **agrecano** de la MEC del cartílago (Malfait *et al.*, 2002), facilitando a su vez el paso de la MMP-13 para la degradación del colágeno II. ADAMTS-5 es la principal agrecanasa en el cartílago de ratón. En humanos, diferentes estudios apuntan hacia esta ADAMTS como la más expresada, aunque aún no está claro cuál de las dos agrecanasas es la principal (Fosang y Rogerson, 2010). Nuestros resultados también demuestran una mayor expresión de ADAMTS-5 en SF, tanto de OA como de HD. La implicación de ADAMTS-5 en la degradación del agrecano

en AR y OA, ha sido previamente estudiada en el tejido sinovial, observándose una mayor distribución en el *lining* (Vankemmelbeke *et al.*, 2001), lo que se correspondería con una mayor presencia de SF. Otros investigadores también han descrito la expresión de ADAMTS-4 y -5 en SF de AR, OA y controles no artríticos, observándose una mayor expresión de ADAMTS-4 en AR que en OA, no existiendo diferencias entre los pacientes de OA y los controles sanos, ni en la expresión de ADAMTS-5 en ninguno de los casos (Yamanishi *et al.*, 2002). De acuerdo con estos autores, no hemos detectado una expresión diferencial de ADAMTS-5. Sin embargo, sí **hemos observado una mayor expresión en el caso de ADAMTS-4 entre los pacientes de OA y los HD**, pudiendo ser ésta la principal agreganasa implicada en la enfermedad, como también apuntan otros estudios el líquido sinovial (Zhang *et al.*, 2013). **Nuestros resultados también demuestran que existe una mayor actividad agreganasa en los SF de OA, lo que se refleja además en la mayor liberación de GAGs desde los explantes de cartílago en cocultivo con estos SF.** Por el contrario, existe algún estudio que indica que los SF promueven una actividad anabólica en condrocitos, disminuyendo la expresión de agreganasas en cocultivos de SF con cartílago dañado (Lee *et al.*, 2013), además de observar una disminución de su expresión en cartílago y tejido sinovial de OA temprana (Davidson *et al.*, 2006). Esto podría deberse a la diferente etapa del desarrollo de la patología, existiendo un aumento en los niveles de agreganasas en fases de OA avanzada, como es el caso de nuestros pacientes. Además, las discrepancias de nuestros datos respecto al primer estudio también pueden explicarse porque en nuestros cocultivos utilizamos explantes de cartílago de zonas no afectados por la OA. Aunque otros autores han descrito también mayores niveles de ADAMTS-4 en el suero y líquido sinovial de pacientes de OA en estadios tempranos, pudiendo servir como marcador de diagnóstico de la enfermedad, mientras que los niveles de ADAMTS-5 en suero se observan más elevados en estadios más avanzados (Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013).

Aunque la participación de las agreganasas en la patogénesis de la OA está claramente establecida, aún no se ha profundizado en el papel de las **ADAMTS-7 y -12**. La importancia de estas ADAMTS radica en su capacidad para la degradación de **COMP**, otro de los componentes no colágenos encargado del mantenimiento de la estabilidad

de la MEC (Liu *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006b; Luan *et al.*, 2008). Estudios previos indican que existe un aumento de ADAMTS-7 y -12, en comparación con controles sanos, en el cartílago de OA pero no en el tejido sinovial (Davidson *et al.*, 2006). Mientras que otros investigadores muestran una mayor expresión de estas ADAMTS en pacientes de OA y AR en comparación con los controles, tanto en el cartílago como en el tejido sinovial (Liu *et al.*, 2006a). **Nosotros describimos por primera vez la expresión y producción de las ADAMTS-7 y -12 en SF. Nuestros resultados demuestran que existe una mayor expresión de ADAMTS-7 en los SF de OA que en los de HD**, mientras que los niveles de ADAMTS-12 son reducidos en ambas, no existiendo diferencias entre los SF de OA y de HD. Las discrepancias con los estudios anteriores podrían deberse a la diferencia de células y tejidos utilizados, puesto que en nuestro caso se trata de SF y no de tejido sinovial completo, así como a la diferente fase de la enfermedad, tratándose en nuestro caso de pacientes de OA avanzada. **Asimismo, observamos una mayor actividad de estas agregasas también en la OA, ya que la liberación de COMP se observa aumentada en cocultivos de cartílago con SF de OA comparando con los de HD.** Puesto que los niveles de ADAMTS-7 son también mayores en los SF de OA y, a su vez, la expresión de ADAMTS-7 es considerablemente mayor que la de ADAMTS-12, los datos apuntan hacia esta ADAMTS como la principal responsable de la degradación de COMP en la OA.

En cuanto a las rutas de señalización implicadas en la expresión de las ADAMTS, la vía **Wnt/ $\beta$ -catenina** y el factor de transcripción **Runx2** son dos rutas novedosas cuya contribución a la patogenia de la OA está adquiriendo más importancia en los últimos años (Alcaraz *et al.*, 2010; Ji *et al.*, 2016). Su papel en el metabolismo óseo y del cartílago es ampliamente conocido, pero, hasta la fecha, los datos en el SF son muy escasos. En el presente estudio hemos analizado la contribución de estas vías de señalización a la producción de ADAMTS en SF de OA. Además de la implicación de estas vías en la expresión de MMPs, como la MMP-13 (Su *et al.*, 2009; Yuasa *et al.*, 2008), el factor de transcripción Runx2 media la expresión de ADAMTS-4 y -5 (Thirunavukkarasu *et al.*, 2006; Thirunavukkarasu *et al.*, 2007). Más recientemente también se ha descrito su implicación en la expresión de las ADAMTS-7 y -12 en condrocitos (Ji *et al.*, 2016), así como la contribución de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B y

de la vía de las MAPK a la activación de Runx2 (Ji *et al.*, 2016; Tetsunaga *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha descrito la participación de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en la expresión de las ADAMTS-4 y -5 (Yuasa *et al.*, 2008). **En el presente trabajo hemos descrito como, a nivel basal, existe la misma activación de Runx2 en los SF de OA y de HD. Respecto a la  $\beta$ -catenina, se observa mayor activación en los SF de OA que en los de HD**, contribuyendo a la degradación articular al mediar una mayor producción de agregcanasas en estos pacientes.

Con estos resultados podemos concluir que el SF contribuye a la patogenia de la OA mediante la liberación de proteinasas implicadas en la degradación de la MEC, siendo unas potenciales dianas terapéuticas para el diseño de fármacos.

## **2. La IL-1 $\beta$ y los Fn-fs como mediadores de inflamación y destrucción en la artrosis**

---

Entre las citocinas que intervienen en el proceso inflamatorio de la OA, el papel de la **IL-1 $\beta$**  ha sido ampliamente estudiado. La IL-1 $\beta$  promueve la liberación de otros mediadores de inflamación y destrucción mediante la modulación de distintas vías de señalización entre las que se incluye la vía de la MAPK, lo que conlleva la activación de distintos factores de transcripción que promueven la expresión de dichos mediadores (Goldring *et al.*, 2011; Stylianou y Saklatvala, 1998). Por otro lado, estudios recientes ponen en entredicho el papel central de esta citocina en la enfermedad. Su papel no parece ser tan determinante como se sugirió en los primeros estudios, tratándose de una citocina más, implicada en el inicio y desarrollo de la patología. Sin embargo, aunque se trate de un mediador más generalista, involucrado en muchas patologías inflamatorias, su estudio también contribuye al avance del conocimiento de los mecanismos implicados en el mantenimiento de la OA. Sí parece más importante la presencia de otros mediadores solubles, en el inicio de la patología, y de productos derivados de la degradación de la MEC del cartílago, en etapas avanzadas (Sandy *et al.*, 2015), entre los que podemos considerar los **Fn-fs**. Durante el proceso de destrucción articular que tiene lugar en la OA se liberan componentes de la MEC con propiedades

potencialmente inflamatorios. Entre ellos se encuentran la fibronectina y sus fragmentos de degradación. En la OA se han detectado niveles elevados de estos fragmentos en el cartílago y líquido sinovial (Homandberg *et al.*, 1998; Zack *et al.*, 2006). Diferentes estudios han descrito el papel proinflamatorio de estos Fn-fs que, mediante su unión a integrinas y TLRs, principalmente, activan distintas rutas de señalización entre las que también se incluye la vía de las MAPK, promoviendo la activación de distintos factores de transcripción que inducen la expresión de mediadores de inflamación y destrucción (Ding *et al.*, 2008; Yasuda, 2006).

**Nuestros resultados demuestran que la IL-1 $\beta$  y los Fn-fs de 45KDa, son capaces de aumentar los niveles de uPA y su receptor, uPAR, en SF de pacientes de OA, aumentando también su actividad en el caso de los Fn-fs. Por otro lado, la IL-1 $\beta$  también incrementa la producción del inhibidor PAI-1,** lo que podría interpretarse como un mecanismo compensatorio para la modulación del sistema uPA. La inducción de uPAR y PAI-1 mediada por **IL-1 $\beta$**  se ha descrito previamente en condrocitos humanos y de rata (Schwab *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2009). Otros estudios también han descrito la inducción de la expresión de uPA mediada por otros estímulos inflamatorios como TGF $\beta$  en SF de controles sanos (Hamilton *et al.*, 1991). También se ha señalado la inducción de uPA por otras citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , en células epiteliales de cáncer de mama, donde además está implicada la señalización mediada por  $\beta$ -catenina y la producción de ROS (Kim *et al.*, 2010). Estudios previos han demostrado la implicación de los **Fn-fs** en la liberación de proteinasas desde el cartílago, incluyendo la uPA (Xie *et al.*, 1994). Sin embargo, este es el primer estudio en el que se describe la relación directa de la estimulación con Fn-fs en el sistema uPA en SF, corroborando la importancia de este tipo celular en la patogenia de la OA, así como el potencial de los Fn-fs como mediadores de destrucción en la OA.

**IL-1 $\beta$  y Fn-fs también aumentan la producción de MMP-9 y -13 desde SF de OA,** lo que se corresponde con el efecto descrito de estos estímulos sobre el sistema uPA, implicado a su vez en la activación de estas MMPs. Diferentes autores han señalado la inducción de MMP-9 y MMP-13 mediada por **IL-1 $\beta$**  en la articulación sinovial de OA y AR (Martel-Pelletier *et al.*, 2001; Rengel *et al.*, 2007; Troeberg y

Nagase, 2012). IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  inducen la producción de MMP-9 y MMP-13 en SF de AR (Frank *et al.*, 2013; Poduval *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2007) y en células sinoviales de OA (Bondeson *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2007). En SF de OA también se ha observado la inducción de MMP-13 medida por la administración conjunta de ambas citocinas (Fuchs *et al.*, 2004). Asimismo, IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  estimulan la expresión de MMP-13, así como la degradación del colágeno tipo II en cartílago de OA (Goldring *et al.*, 2011; Kobayashi *et al.*, 2005). Además, se ha comprobado que exosomas liberados desde SF estimulados con IL-1 $\beta$  promueven la producción de MMP-13 desde condrocitos de individuos sanos (Kato *et al.*, 2014). Estudios previos también han descrito la producción de MMP-13 inducida por IL-1 $\beta$  en condrocitos de controles sanos y de pacientes de OA, así como en fibroblastos murinos, donde se ha visto la implicación de la MAPK ERK y JNK y del factor de transcripción AP-1 (Ahmad *et al.*, 2007; Otero *et al.*, 2012; Westermarck *et al.*, 2000). La implicación de la MAPK p38 y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B, también se ha observado en la producción de MMP-9 en SF de AR y OA (Xue *et al.*, 2007). Respecto a la **fibronectina**, estudios previos han descrito la inducción de MMP13, mediada tanto por la propia fibronectina como por sus fragmento de degradación, incluyendo los Fn-fs de 45KDa, en cartílago, condrocitos y SF reumatoides (Ding *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2013; Stanton *et al.*, 2002; Yasuda *et al.*, 2003b), donde se ha observado la implicación de las MAPK (Forsyth *et al.*, 2002; Yasuda *et al.*, 2003b). También se ha señalado la estimulación de la producción de gelatinasas, incluyendo MMP9, mediada por la fibronectina y los Fn-fs en cartílago y otros tipos celulares (Hartney *et al.*, 2011; Moroz *et al.*, 2013; Yasuda *et al.*, 2003a).

Respecto a las agrecanasas, describimos como la **IL-1 $\beta$  induce la producción de ADAMTS-4 y -5 en los SF, tanto de OA como de HD, pero estos efectos no se ven reflejados en su funcionalidad**, debido a que no afecta a la actividad agrecanasa ni a la liberación de GAGs desde el cartílago. El papel de la **IL-1 $\beta$**  en la OA es controvertido (Sandy *et al.*, 2015). Se han descrito estudios que indican que, aunque ambas agrecanasas se expresen a bajos niveles de manera constitutiva, ADAMTS-4 es inducible por citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  o TNF $\alpha$ , mientras que ADAMTS-5 es constitutiva en SF, SM y condrocitos (Bau *et al.*, 2002; Bondeson *et al.*, 2006; Sandell

*et al.*, 2008; Yamanishi *et al.*, 2002). Además, la IL-1 no parece inducir la actividad agrecanasa en el tejido sinovial (Vankemmelbeke *et al.*, 2001), mientras que otros autores afirman que la IL-1 $\beta$  induce, tanto la expresión de ADAMTS-5, como la degradación de proteoglicanos desde explantes de cartílago (Kato *et al.*, 2014; Kobayashi *et al.*, 2005; Pattoli *et al.*, 2005), mientras que no tiene efectos sobre la producción de ADAMTS-4 (Pattoli *et al.*, 2005). Estos datos contradictorios, junto con nuestros resultados, podrían indicar que, aunque la IL-1 $\beta$  sea capaz de inducir en cierta medida la producción de agrecanasas en los SF, esta estimulación no es lo suficientemente grande como para verse reflejada en un aumento de su actividad. En cuanto a los **Fn-fs**, se ha descrito su implicación en la degradación de los proteoglicanos de la MEC del cartílago (Homandberg *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 1994), donde las integrinas  $\alpha 5$  participan en la señalización mediada por los Fn-fs de 45KDa (Homandberg *et al.*, 2002a). Diferentes autores han descrito la inducción de agrecanasas mediada por los Fn-fs en cartílago (Guo *et al.*, 2009; Stanton *et al.*, 2002; Zack *et al.*, 2006). De acuerdo con ellos, **nuestros resultados demuestran que los Fn-fs de 45KDa son capaces de inducir la producción y la actividad de las agrecanasas, así como la liberación de GAGs del cartílago, en SF de OA. En los SF de HD, induce específicamente la producción de ADAMTS-4 y la liberación de GAGs.** La similitud entre el patrón de producción de ADAMTS-4 y la liberación de GAGs, con la estimulación de los Fn-fs, de nuevo parece apuntar hacia esta agrecanasa como la principal implicada en la degradación del agrecano de la MEC del cartílago.

Referente a las **ADAMTS-7 y -12**, otros estudios han descrito la inducción de ambas, así como la degradación de COMP, mediada por IL-1 $\beta$  y por TNF $\alpha$  en cartílago (Lai *et al.*, 2014; Luan *et al.*, 2008; Wei *et al.*, 2014), con la implicación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Wei *et al.*, 2014). Sin embargo, otros autores no observan dicha inducción en el caso de ADAMTS-12 en fibroblastos fetales humanos (Cal *et al.*, 2001). Nosotros estudiamos por primera vez los efectos de IL-1 $\beta$  y los Fn-fs en la producción de ADAMTS-7 y -12 en SF. **Nuestros resultados demuestran que tanto la IL-1 $\beta$  como los Fn-fs de 45KDa promueven la producción de ADAMTS-7 y la liberación de COMP desde los explantes de cartílago, tanto en SF de OA como de HD, aunque este efecto es mayor en los SF de OA. Sin embargo, en el caso de ADAMTS-12 sólo se observa**

**inducción en los SF de OA.** Estos resultados vuelven a apuntar hacia ADAMTS-7 como la principal implicada en la degradación de COMP en la MEC del cartílago. Por otro lado, la inducción de ADAMTS-12 exclusivamente en OA, indica una regulación diferencial de esta ADAMTS, pudiendo estar también involucrada en la patogenia de la enfermedad. Asimismo, también se ha demostrado la participación de la ADAMTS-12 en la respuesta inflamatoria y en diferentes patologías, incluyendo la OA y la AR (Moncada-Pazos *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2014).

La activación de **Runx2** mediada por IL-1 $\beta$  ha sido descrita previamente en condrocitos de OA, con la implicación de la MAPK p38 (Rasheed *et al.*, 2010). Sin embargo, no existen estudios sobre la activación de este factor de transcripción por la fibronectina ni por sus fragmentos de degradación. **Nuestros resultados demuestran que tanto la IL-1 $\beta$  como los Fn-fs de 45KDa inducen la activación de Runx2 en SF de OA y HD.** Estos resultados coinciden con la producción de las ADAMTS-4, -5 y -7, corroborando la implicación de este factor de transcripción en su expresión. El hecho de que en el caso de las ADAMTS-12 no se observe inducción en su expresión en los SF de HD, podría indicar que este factor de transcripción no está directamente relacionado con su expresión en condiciones normales o deberse a mecanismos de regulación génica. **IL-1 $\beta$**  también induce la vía de **Wnt/ $\beta$ -catenina** en condrocitos de OA y AR. A diferencia de lo que ocurre en modelos animales, en humanos esta vía establece un bucle de retroalimentación negativa con la IL-1 $\beta$ , inhibiendo la producción de MMPs (Ma *et al.*, 2012). En células endoteliales de córnea humanas también se ha descrito la implicación de NF- $\kappa$ B en la activación de esta vía, mediada por IL-1 $\beta$  (Lee y Heur, 2014). El hecho de que no observemos inducción en la actividad de las agreganasas con la IL-1 $\beta$ , también podría explicarse por el bucle de retroalimentación negativa que se establece entre la vía Wnt/ $\beta$ -catenina y esta citocina, al igual que ocurre en el caso de las MMPs, y que otras vías de señalización como la de Runx2, no son capaces de contrarrestar. Por otro lado, la vía Wnt/ $\beta$ -catenina induce la expresión de **fibronectina** en distintos tipos celulares, incluyendo los SF de AR (De Langhe *et al.*, 2005; Miao *et al.*, 2013; Sen *et al.*, 2002). A diferencia de la IL-1 $\beta$ , la fibronectina sí establece un bucle de retroalimentación positiva con esta vía, induciendo su activación mediada por integrinas (Bielefeld *et al.*, 2011), donde

también ha sido descrita la implicación de la MAPK ERK, en células de cáncer de colon (Ou *et al.*, 2013). **En nuestro caso, sólo observamos inducción de la activación de  $\beta$ -catenina en los SF de OA, mediada tanto por IL-1 $\beta$  como por los Fn-fs de 45KDa.** Aunque ya se había demostrado para la fibronectina, éste es el primer estudio en el que se muestra la inducción de esta vía por sus fragmentos de degradación, en concreto los Fn-fs de 45KDa, donde podría estar implicada la señalización mediada por integrinas  $\alpha 5\beta 1$  y por TLRs, además de la vía de las MAPK y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Ding *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Homandberg *et al.*, 2002a; Homandberg *et al.*, 2002b; Su *et al.*, 2005; Yasuda, 2006). A la vista de estos resultados podemos deducir que, aunque la vía Wnt/ $\beta$ -catenina también tenga efectos anabólicos y sea necesaria una activación basal para el mantenimiento de la homeostasis en el cartílago (Ma *et al.*, 2012), la activación diferencial de esta vía en los SF de OA frente a los de HD, apunta hacia una implicación en la patogenia de la enfermedad. Asimismo, el hecho de que el patrón de activación coincida con el de la ADAMTS-12, podría indicar una mayor implicación de esta vía en su expresión. Aun así, este mecanismo es más complejo pues ambas vías se encuentran relacionadas entre sí y con otras rutas de señalización y factores de transcripción que también están implicados en la expresión de estas ADAMTS.

Nuestros resultados indican que la IL-1 $\beta$ , como mediador proinflamatorio, y los Fn-fs de 45KDa, como productos de degradación del cartílago, están implicados en la patogenia de la OA, mediante la inducción de la producción de proteinasas desde el SF, siendo mayor el efecto observado en el caso de los Fn-fs.

### 3. Expresión de las familias de neuropéptidos VIP y CRF en el sinoviocito fibroblástico de artrosis y artritis reumatoide

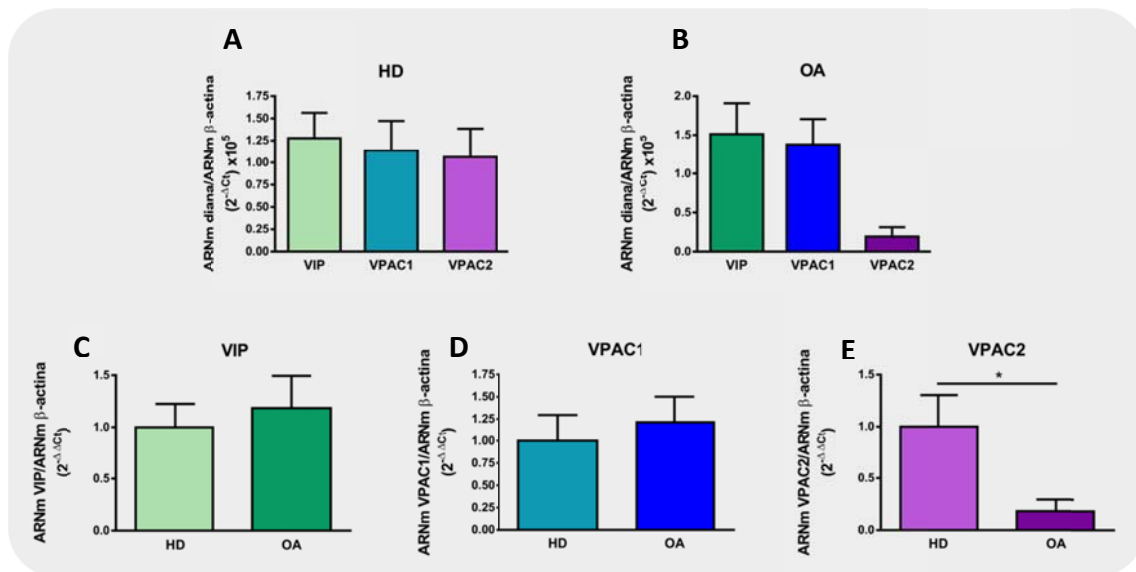
---

Actualmente, se asume el hecho de que los sistemas neuroendocrino e inmune se encuentran íntimamente relacionados. En este contexto, el SF también juega un papel importante en las enfermedades reumáticas inflamatorias mediante la producción de neuropéptidos.

Estudios previos han descrito la expresión diferencial de **VIP y sus receptores** en **SF de AR y OA**, observándose mayor expresión de VIP y VPAC1 en los SF de OA, y de VPAC2 en los de AR. Los mediadores inflamatorios que se liberan en el transcurso de estas enfermedades, tales como TNF $\alpha$ , reducen la expresión de VIP y modulan el ratio VPAC1/VPAC2, de tal forma que, en los SF de OA, disminuyen la expresión de VPAC1 y aumenta la de VPAC2, asemejando su perfil al de la AR (Juarranz *et al.*, 2008). Asimismo, una baja expresión de VPAC1 en sangre se relaciona con una mayor inflamación y severidad de la enfermedad en pacientes de artritis de reciente comienzo (Seoane *et al.*, 2016). Estos datos sugieren un papel diferencial de los receptores de VIP, donde VPAC1 se perfila como más antiinflamatorio y VPAC2 más proinflamatorio. Del mismo modo, VIP también se postula como biomarcador pronóstico, ya que bajos niveles de VIP en el suero de pacientes de espondiloartritis y artritis de reciente comienzo, así como en el líquido sinovial y cartílago de OA, se asocian con un peor pronóstico de estas patologías (Jiang *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2014; Seoane *et al.*, 2015).

Dado que en ninguno de los estudios publicados que componen este trabajo se ha aportado el patrón de expresión de VIP y sus receptores en individuos sanos y, de cara a contribuir a aclarar los resultados, hemos valorado dicho patrón que pasamos a exponer a continuación. Por tanto, hemos estudiado también el perfil de VIP y sus receptores en **SF de HD** (Figura 31), además de compararlos con la expresión en los SF de OA. A diferencia de lo que ocurre en AR y OA, **en los SF de HD no se observan una expresión diferencial de VPAC1 y VPAC2**. Cuando comparamos con la OA, tampoco se observan diferencias significativas en los niveles de VIP ni en los de VPAC1. Por el

contrario, **VPAC2**, sí se observa una mayor expresión en los SF de HD, lo que podría deberse al hecho de que en los pacientes de OA estos niveles ya son reducidos, a diferencia de lo que ocurre con la AR. Por otro lado, la expresión diferencial de VPAC2 en HD y OA podría explicarse también como un mecanismo de compensación de tal manera que, aunque en condiciones normales existen unos niveles basales de VPAC2, en la OA estos niveles disminuyen, lo que explicaría también estos pacientes tengan un perfil de inflamación menor que los de AR.



**Figura 31.** Expresión de RNAm de VIP y sus receptores en **A.** donantes sanos (HD) y **B.** pacientes artrósicos (OA). La expresión de RNAm se midió mediante RT-qPCR y se normalizó frente a la β-actina usando las fórmulas  $2^{-\Delta Ct}$  (A y B) o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , cuantificación relativa respecto a HD (C, D y E). Los valores se presentan como la media  $\pm$  SEM de *n* pacientes por triplicado (HD, *n*=7; OA, *n*=5). \**p*<0.05.

Respecto a la familia de CRF, hemos corroborado la producción de CRF y UCN1 en los SF de OA y AR, descrita previamente (Crofford *et al.*, 1993; Kohno *et al.*, 2001; Uzuki *et al.*, 2001), además de caracterizar por primera vez la expresión de UCN2, UCN3 y CRFR2 en dichas células, no detectándose expresión de CRFR1 en ninguno de los casos. Además, hemos observado que existe una mayor producción de CRF y UCN1 en los SF de AR que en los de OA, mientras que los niveles de UCN2 y UCN3 son más elevados en los SF de OA, siendo la expresión de CRFR2 muy reducida y similar en ambos.

Como datos complementarios a la publicación, también hemos analizado el perfil de expresión de la familia de CRF en los **SF de HD** en este caso (Figura 32).

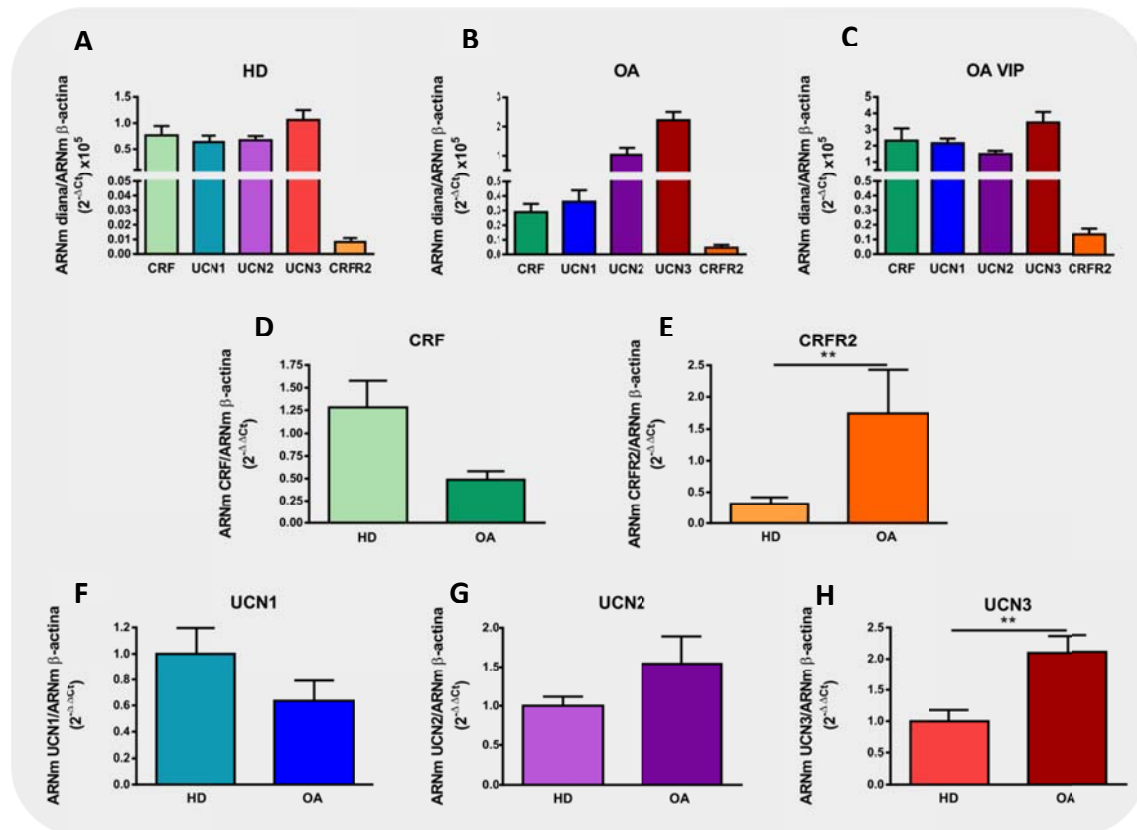


Figura 32. Expresión de RNAm de los péptidos de la familia de CRF en A. donantes sanos (HD), B. pacientes artrósicos (OA) y C. pacientes artrósicos tras el tratamiento con VIP. La expresión de ARNm se midió mediante RT-qPCR y se normalizó frente a la  $\beta$ -actina usando las fórmulas  $2^{-\Delta Ct}$  (A, B y C) o  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , cuantificación relativa respecto a HD (D, E, F, G y H). Los valores se presentan como la media  $\pm$  SEM de  $n$  pacientes por triplicado (HD,  $n=7$ ; OA,  $n=5$ ). \*\* $p<0.01$ .

Al comparar con el perfil de expresión de los SF de OA, observamos que **los niveles de CRF y UCN1 siguen siendo menores en los SF de OA que en los de HD**, aunque no de manera significativa, mientras que **las UCN2 y UCN3 presentan mayor expresión en la OA**, siendo significativa la diferencia en el caso de la UCN3. Po lo tanto, el perfil comparativo sigue siendo el mismo que en el caso de la AR, lo que podría deberse a que los niveles de CRF y UCN1 en los SF de OA son bajos, mientras que los de UCN2 y UCN3 son altos a nivel basal, independiente de con qué los comparemos. Por otro lado, **aunque la expresión de CRFR2 es baja en todos los casos, en los SF de HD es aún menor**, lo que podría deberse al incremento de la expresión del receptor en condiciones de inflamación. **En los SF de HD tampoco se detectó expresión de CRFR1**. Al igual que ocurría al comparar los SF de OA y HD, aquí también observamos que el

CRF y la UCN1 tienen la misma tendencia, mientras que las UCN2 y UCN3, muestran la contraria, lo que corrobora la similitud funcional entre CRF y UCN1 por un lado y UCN2 y UCN3 por otro.

Por otro lado, hemos querido comprobar si existe alguna **interrelación** entre los dos neuropéptidos estudiados, **VIP y CRF**. De nuevo nuestros resultados demuestran que **VIP posee un efecto diferencial en los SF de AR y OA**. Mientras que, de manera general, **VIP induce la expresión de los péptidos de la familia de CRF en los SF de OA, en los SF de AR disminuye la expresión de CRF y UCN1, aumentado la UCN3 y el CRFR2**. Nuestros resultados además demuestran que los niveles basales de AMPc intracelular son mayores en los SF de AR que en los de OA. VIP incrementa estos niveles tanto en SF de OA como en los de AR, siendo este aumento mayor en el caso de la OA. Al igual que ocurre con los niveles de AMPc, en condiciones basales la activación de CREB se observa aumentada en los SF de RA frente a los de OA, lo que se observa en la mayor ratio de p-CREB/CREB. Mientras que en los SF de AR VIP disminuye la activación de CREB, en los SF de OA tiende a aumentarla, aunque no significativamente, lo que además se correlaciona con el mayor incremento de AMPc. Puesto que la expresión de CRF y UCN1 está mediada en parte por CREB (Tsatsanis *et al.*, 2007b), el efecto diferencial observado en la expresión de estos péptidos entre los SF de OA y AR, podría deberse a la diferente activación de la vía **AMPc/PKA/CREB** mediada por VIP. Por otro lado, en los SF de AR, se ha descrito la inducción de CRF mediada por citocinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  o TNF $\alpha$  (Kageyama y Suda, 2009). Puesto que VIP es capaz de inhibir la producción de dichas citocinas, la disminución en la expresión de CRF y UCN1 en los SF de AR, también podría deberse en parte a este hecho. Por otro lado, es remarcable el hecho de que **los SF de OA tratados con VIP presentan unos niveles de neuropéptidos de la familia de CRF mayores, pero con un perfil similar al de los SF de HD en condiciones basales**. Estos datos apoyan el efecto beneficioso de VIP, ya que produce un cambio en los niveles de neuropéptidos, aproximándolos al patrón presente en los individuos sanos (Figura 32C).

#### 4. Los neuropéptidos como herramienta terapéutica en el tratamiento de la artrosis

---

Las terapias basadas en el bloqueo de receptores GPCRs representan un alto porcentaje en los tratamientos actuales en distintas patologías. Existen distintos neuropéptidos que, actuando como ligandos de GPCRs, han demostrado tener un potencial terapéutico para el tratamiento de patologías inflamatorias y/o autoinmunes, como la OA o la RA. Entre ellos, VIP y CRF son dos péptidos muy prometedores para el diseño de fármacos dirigidos al tratamiento de dichas enfermedades.

Diversos estudios apoyan el **papel antiinflamatorio de VIP** en inflamación y autoinmunidad (Abad *et al.*, 2012; Abad *et al.*, 2006; Abad *et al.*, 2003; Gomariz *et al.*, 2006; Prasse *et al.*, 2010; Rosignoli *et al.*, 2006). Dicho efecto beneficioso también se ha descrito en la AR y la OA, *in vitro* e *in vivo*. Entre los efectos que VIP ejerce en estas patologías, se incluyen la reducción de la expresión de citocinas y otros mediadores inflamatorios (Carrion *et al.*, 2014; Carrion *et al.*, 2013; Delgado *et al.*, 2002; Gutierrez-Canas *et al.*, 2006; Juarranz *et al.*, 2004; Juarranz *et al.*, 2005) así como de proteinasas (Carrion *et al.*, 2011; Carrion *et al.*, 2014; Delgado *et al.*, 2002), además de la inducción de citocinas antiinflamatorias. Dichos efectos se producen mediante la modulación de diferentes rutas de señalización, que incluyen la vía del AMPc y el factor de transcripción CREB, así como la inhibición de NF- $\kappa$ B (Delgado *et al.*, 1998; Juarranz *et al.*, 2005) y de la señalización mediada por TLRs (Carrion *et al.*, 2011; Gomariz *et al.*, 2010; Gutierrez-Canas *et al.*, 2006). Por otro lado, CREB está también implicado en la producción de los mediadores inflamatorios COX-2 y PGE2 (McEvoy *et al.*, 2004). Estudios en modelos animales de CIA indican que VIP es capaz de inhibir la expresión de COX-2 (Juarranz *et al.*, 2005). **Nuestros resultados demuestran que VIP disminuye la expresión de COX-2 y la producción de PGE2 en SF de AR**, mientras que no se observan efectos sobre la producción de dichos mediadores en los SF de OA. Dicho efecto podría estar mediado por la acción inhibitoria de VIP sobre **CREB**, observada en los SF de AR. Estos datos corroboran el efecto diferencial de VIP en los SF de AR y OA, que estaría mediado por la vía del AMPc (Juarranz *et al.*, 2008), donde CREB ejerce un

papel dual. Mientras que en los SF de **AR**, VIP tiene un papel antiinflamatorio mediado, en parte, por la **inhibición de CREB** y la consecuente **disminución** en la expresión de **COX-2** y producción de **PGE2**, en los SF de OA no se demuestran efectos en la producción de estos mediadores proinflamatorios. Por el contrario, en los SF de **OA**, sí se aprecia una mayor **inducción de AMPc** y una tendencia al aumento de la **activación de CREB** mediada por VIP. Esto podría significar que, al contrario que lo que ocurre en la AR, en los SF de OA VIP estaría ejerciendo un efecto antiinflamatorio mediante la inducción de CREB, implicado en la inhibición de la transcripción por parte de NF-Kb, de la MAPK JNK y del factor de transcripción c-Jun, reduciendo la expresión de otros mediadores inflamatorios que participan en la patología e induciendo la producción de citocinas antiinflamatorias (Delgado *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 1998; Kambayashi *et al.*, 1995; Strassmann *et al.*, 1994). Además, CREB promueve la expresión de VIP, al poseer un elemento CRE de respuesta a AMPc en su promotor en su promotor (Ohsawa *et al.*, 1985; Tsukada *et al.*, 1987).

Respecto a la familia de **CRF**, se han descrito tanto efectos proinflamatorios como antiinflamatorios en distintas patologías, incluyendo la OA y la AR. Mientras que **CRFR1** parece ejercer principalmente una acción **proinflamatoria** (Fukudo, 2007; McEvoy *et al.*, 2001; Ralph *et al.*, 2007), en el **CRFR2** prima su efecto **antiinflamatorio** (Bale *et al.*, 2002; Dermitzaki *et al.*, 2014; Dermitzaki *et al.*, 2007; Fukudo, 2007; Tsatsanis *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2016), aunque ambos receptores pueden tener un papel dual (Tsatsanis *et al.*, 2007a). Esto explicaría también el hecho de que en los SF de AR, cuyo componente inflamatorio es mayor, se encuentren más elevados los únicos péptidos capaces de unirse a CRFR1, el CRF y la UCN1, disminuyendo sus niveles tras el tratamiento con VIP. Mientras que los niveles de UCN2 y UCN3, que exclusivamente se unen a CRFR2, son menores en los SF de AR que en los de OA, aumentando tras el tratamiento con VIP, apoyando de nuevo su potencial antiinflamatorio. Sin embargo, en el tejido sinovial de AR se ha descrito el efecto proinflamatorio de CRF mediado por la producción de COX2 y PGE2, que a su vez también inducen la activación de CREB (McEvoy *et al.*, 2004) y la producción de CRF (McEvoy *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 2001). Estos datos se correlacionan con los niveles de AMPc y la activación de CREB en condiciones basales, así como con la expresión

basal de COX2, que son mayores en los SF de AR que en los de OA. Estos resultados parecen apuntar hacia un **efecto diferencial del CRF y de la UCN1, en los SF de AR y OA**, cuyos niveles son superiores en la AR. Estos péptidos podrían ejercer un efecto preferentemente **proinflamatorio** en el caso de la **AR**, que podría estar mediado, en parte, por la activación de **CREB** y la producción de **COX2 y PGE2**.

La siguiente cuestión que nos propusimos abordar fue el estudio del papel de los neuropéptidos en el proceso degradativo de la MEC, para lo cual estudiamos el efecto sobre la producción de **proteinasas** en SF de **OA**.

En este trabajo **analizamos por primera vez los efectos de VIP y CRF en la modulación del sistema uPA**. Los resultados obtenidos indican que **VIP es capaz de modular este sistema de manera constitutiva, induciendo la expresión de PAI-1 e inhibiendo la expresión de uPA**. Asimismo, **VIP contrarresta el efecto inductor mediado por IL-1 $\beta$  y los Fn-fs reduciendo la expresión y la actividad de uPA, así como la producción de su receptor**. Por otro lado, **CRF no parece tener ningún efecto modulador sobre este sistema**, pues el único efecto observado fue la disminución de la producción de uPAR estimulada por IL-1 $\beta$ .

En consonancia con los efectos observados sobre el sistema uPA, **VIP reduce también la expresión constitutiva de MMP-13, así como la producción de MMP-9 y -13 inducida por IL-1 $\beta$  o Fn-fs**, contrarrestando de nuevo sus efectos. Estudios en células de cáncer renal también indican que VIP disminuye la expresión de las colagenasas MMP-2 y MMP-9, además de reducir la capacidad migratoria y la expresión de VEGF (Vacas *et al.*, 2013). Por otra parte, en células de cáncer de próstata se ha descrito el efecto contrario (Fernandez-Martinez *et al.*, 2010), lo que podría explicarse por la diferencia en el tipo celular y el comportamiento variado de las células cancerígenas.

En el presente trabajo también estudiamos por primera vez los efectos de estos neuropéptidos sobre la expresión de las **ADAMTS**. Hemos demostrado que tanto **VIP como CRF modulan la producción de las ADAMTS en SF de OA, de manera diferencial a lo que ocurre en los HD**, donde apenas se observan efectos, y dependiendo del

estímulo implicado en la inducción de su expresión. Por un lado, **VIP y CRF disminuyen tanto la producción como la actividad de las ADAMTS-4, -5, -7, -12 tras la estimulación con los Fn-fs de 45KDa, lo que se refleja en la disminución de la actividad agreganasa en los SF de OA, así como en la reducción de la liberación de GAGs y COMP en los cocultivos con los explantes de cartílago con estos SF.** Por otro lado, **tras la estimulación con IL-1 $\beta$ , en el caso de las agreganasas, aunque VIP es capaz de disminuir la producción de ADAMTS-5, no se observan efectos de estos péptidos a nivel funcional, ya que no hay variaciones significativas de la actividad agreganasas ni de la liberación de GAGs.** Este hecho también podría ser explicado porque la IL-1 $\beta$  tampoco es capaz de inducir lo suficiente la expresión de estas ADMATS como para ver efectos a nivel funcional. Sin embargo, **en el caso de ADAMTS-7, sí observamos una disminución, mediada por ambos neuropéptidos, tanto de su producción como de su función, reflejada nuevamente mediante la reducción de la liberación de COMP desde los explantes de cartílago en cocultivo con los SF de OA.** Respecto a la ADAMTS-12, no se observan efectos con ninguno de los neuropéptidos tras la estimulación con IL-1 $\beta$ , lo que parece apuntar nuevamente hacia la ADAMTS-7 como la principal implicada en la degradación de COMP del cartílago. Estos datos también podrían indicar que los efectos de VIP y CRF sobre las ADAMTS ocurren en etapas avanzadas de la enfermedad, cuando ya se han liberado fragmentos de componentes de la MEC del cartílago, que ejercen efectos proinflamatorios y degradativos en la OA.

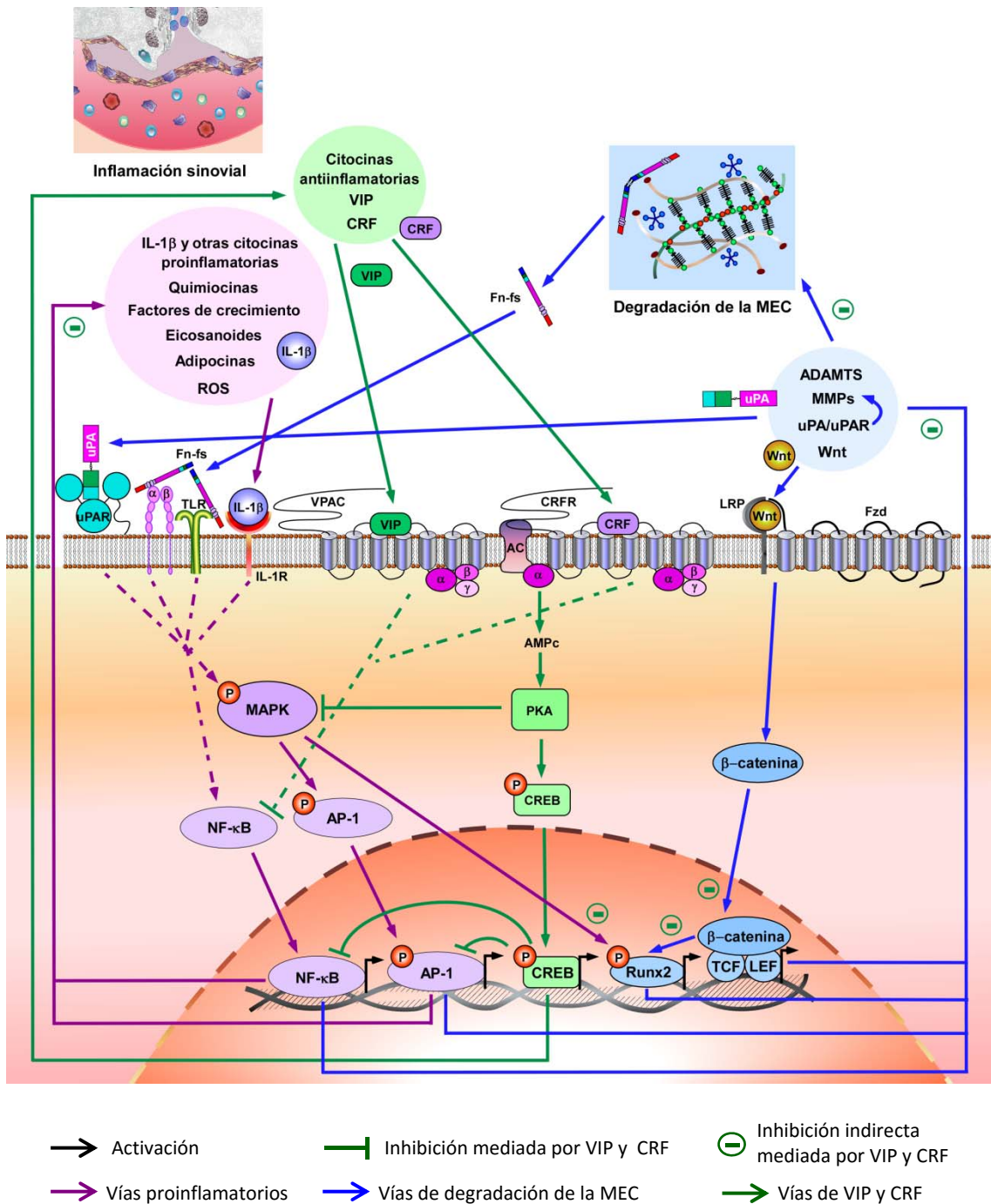
Respecto a los factores de transcripción relacionados con la expresión de las ADAMTS, es también novedoso el estudio de la modulación mediada por **VIP y CRF** en los SF de OA. Estudios previos han descrito que PACAP y PAC1, son capaces de activar Runx2 y la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en osteogénesis y condrogénesis (Juhász *et al.*, 2015; Juhasz *et al.*, 2014). Sin embargo, VIP disminuye la activación de  $\beta$ -catenina y NF- $\kappa$ B en cáncer de células renales (Vacas *et al.*, 2013). Respecto al CRF, solo se ha descrito la inducción de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en células de cáncer en ratón (Khattak *et al.*, 2010). **Nuestros resultados demuestran que ambos neuropéptidos reducen la activación, tanto de Runx2 como de  $\beta$ -catenina, exclusivamente en los SF de OA y no en los de HD, con el consiguiente valor terapéutico que ello conlleva. Estos resultados se**

**observan tanto tras la estimulación con IL-1 $\beta$  como con los Fn-fs.** Las discrepancias con otros estudios podrían deberse al diferente tipo de muestra analizada. Puesto que, tanto las MAPK como los factores de transcripción AP-1 y NF $\kappa$ B, están implicados en activación de Runx2 y de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, donde NF $\kappa$ B además media la expresión de Wnt (Bengoa-Vergniory y Kypta, 2015; Ji *et al.*, 2016; Lee y Heur, 2014; Marcu *et al.*, 2010; Shahnazari *et al.*, 2008; Vimalraj *et al.*, 2015; Zenz *et al.*, 2008), el efecto inhibitor de VIP y CRF podría deberse a su acción sobre la señalización de las MAPK y los factores de transcripción AP-1 y NF $\kappa$ B, como demuestran estudios previos con VIP (Delgado *et al.*, 1998; Juarranz *et al.*, 2005). Además, la inhibición de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina influiría también en la inhibición de Runx2, pues ambas vías se encuentran interrelacionadas (Gaur *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2007; Shahnazari *et al.*, 2008). De esta forma observamos un efecto modulador de los neuropéptidos sobre las vías de señalización que, de nuevo en el caso de la Fn-fs, se refleja en la producción y función de las ADAMTS, a diferencia de lo que ocurre tras la estimulación con la IL-1 $\beta$ . La misma explicación descrita anteriormente sobre el efecto diferencial de estos estímulos podría aplicarse a los resultados observados con los neuropéptidos. Aunque VIP y CRF tienen un efecto modulador, contrarrestando el aumento de la activación de Runx2 y de  $\beta$ -catenina mediada por la IL-1 $\beta$  y por los Fn-fs, en el caso de la estimulación por IL-1 $\beta$  puede ser que no se observe dicho efecto en la expresión y función de las ADAMTS debido a la inhibición que la vía Wnt/ $\beta$ -catenina ejerce sobre la producción de metaloproteinasas inducida por la IL-1 $\beta$  (Ma *et al.*, 2012).

Al igual que en el caso de Runx2 y de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, la acción inhibitor de VIP y CRF sobre los efectos proinflamatorios y la producción de proteinasas, mediados por la IL-1 $\beta$  y los Fn-fs, podrían estar mediados por la activación de la vía AMPc/PKA/CREB y la inhibición de la vía de las MAPK y el factor de transcripción AP-1. Vías independientes del AMPc también parecen estar implicadas en la inhibición de NF $\kappa$ B mediada por mediada por ambos neuropéptidos (Auphan *et al.*, 1995; Delgado *et al.*, 1998; Hauger *et al.*, 2009; Juarranz *et al.*, 2005; Singh y Leu, 1993). Además, puesto que los Fn-fs son también capaces de señalizar mediante TLRs, estos efectos también podrían deberse a la inhibición de la señalización de los TLRs mediada por los neuropéptidos, como demuestran estudios previos (Arranz *et al.*, 2008; Carrion *et al.*,

2011; Dermitzaki *et al.*, 2014; Gomariz *et al.*, 2010; Gutierrez-Canas *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2016).

A la vista de los resultados, podemos concluir que los neuropéptidos VIP y CRF poseen un efector protector en la patogenia de la OA, disminuyendo la producción y actividad de proteinasas producidas por el SF, entre las que se incluyen uPA, MMPs y ADAMTS, que actúan en el proceso degradativo de la articulación sinovial. Siendo, además, capaces de contrarrestar la inducción producida por estímulos proinflamatorios y mediadores de degradación, como la IL-1 $\beta$  y los Fn-fs, respectivamente (Figura 33). Dichos efectos se producen, mediante la modulación de diferentes vías de señalización que incluyen al factor de transcripción Runx2 y a la vía Wnt/ $\beta$ -catenia. En este contexto, VIP tiene un efecto terapéutico mayor que CRF al ser capaz de actuar sobre un mayor número de proteinasas. Estos resultados suponen una contribución importante para el desarrollo de terapias basadas en el uso de estos neuropéptidos como herramientas para el diseño de fármacos dirigidos al tratamiento de enfermedades reumáticas inflamatorias y degenerativas como la OA.



**Figura 33. Hipótesis de la interrelación entre las principales vías implicadas en la estimulación mediada por la IL-1β y los Fn-fs, y los efectos protectores de VIP y CRF, sobre la liberación de mediadores de inflamación y destrucción en el SF de OA.** La IL-1β, mediante su unión a IL-1RI, y los Fn-fs, a integrinas y TLRs, activan una serie de vías de señalización entre las que se encuentran implicadas las MAPK y los factores de transcripción AP-1 y NF-κB, que confluyen en la expresión de mediadores proinflamatorios y proteinasas. En este proceso también participa uPA, mediante su unión a uPAR. Estas vías además activan a Runx2 e inducen la expresión de Wnt, activando a la β-catenina y promoviendo la liberación de ADAMTS y MMPs, que a su vez son activadas por uPA. Por su parte, VIP y CRF, mediante la unión a GPCRs, activan la vía AMPc/AC/PKA, induciendo la transcripción de mediadores antiinflamatorios, entre los que se incluyen los propios neuropéptidos, por parte de CREB. Asimismo, modulan la activación de TLRs y MAPK e inhiben la expresión de mediadores de inflamación y destrucción, mediante el bloqueo de la transcripción por parte de AP-1 y NF-κB, con la consecuente inhibición de la vía Wnt/β-catenina y de Runx2.

## Conclusiones





1. El sinoviocito fibroblástico contribuye a la patogenia de la artrosis mediante la liberación de proteinasas implicadas en la degradación de componentes esenciales de la matriz extracelular, incluyendo la serín proteinasa uPA, su receptor, uPAR y su inhibidor, PAI-1, las metaloproteinasas MMP-9 y MMP-13, y las ADAMTS-4, -5, -7 y -12.
2. La IL-1 $\beta$  y los fragmentos de fibronectina de 45KDa, incrementan la producción de la serín proteinasa uPA y su receptor uPAR, las metaloproteinasas MMP-9 y MMP-13, y las ADAMTS-4, -5, -7 y -12, en el sinoviocito fibroblástico de pacientes con artrosis.
3. La IL-1 $\beta$  y los fragmentos de fibronectina de 45KDa, incrementan la expresión de agregcanasas a través de la activación del factor de transcripción Runx2 y de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.
4. Los sinoviocitos fibroblásticos de donantes sanos y pacientes con artrosis y artritis reumatoide, expresan CRF, UCN1, UCN2, UCN3 y CRFR2 de manera constitutiva, no detectándose expresión de CRFR1 en ninguno de los casos.
5. Los sinoviocitos fibroblásticos de pacientes con artrosis tratados con VIP, presentan un perfil de expresión de los neuropéptidos de la familia de CRF similar al encontrado en donantes sanos.
6. VIP ejerce un efecto diferencial en los sinoviocitos fibroblásticos de artrosis y artritis reumatoide sobre la expresión de los miembros de la familia CRF y de los mediadores proinflamatorios COX-2 y PGE2.
7. Tras la inducción con IL-1 $\beta$  o con fragmentos de fibronectina de 45KDa, los neuropéptidos VIP y CRF disminuyen la producción de proteinasas en el sinoviocito fibroblástico de artrosis. Entre estas proteinasas se incluye la serín proteinasa uPA y las metaloproteinasas MMP-9 y MMP-13, en el caso de VIP, y las ADAMTS-4, -5, -7 y -12, con ambos neuropéptidos.
8. El efecto de VIP y CRF sobre la producción de agregcanasas, en el sinoviocito fibroblástico de artrosis, se produce mediante el bloqueo de diferentes vías de

señalización, que incluyen al factor de transcripción Runx2 y a la vía Wnt/ $\beta$ -catenina.

9. VIP y CRF, a través de sus efectos sobre el sinoviocito fibroblástico, actúan como protectores de la destrucción del cartílago en pacientes con artrosis.

## Conclusions





1. The synovial fibroblast contributes to the osteoarthritis pathogenesis by releasing proteinases implicated in the degradation of main components of the extracellular matrix, including the uPA serin proteinase, its receptor uPAR and its inhibitor PAI-1, the matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-13, and the ADAMTS-4, -5, -7 and -12.
2. IL-1 $\beta$  and 45KDa fibronectin fragments increase the release of the serine proteinase uPA and its receptor uPAR, the metalloproteinases MMP-9 and MMP-13, as well as ADAMTS-4, -5, -7 and -12, in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients.
3. IL-1 $\beta$  and 45KDa fibronectin fragments increase aggrecanases expression by the activation of Runx2 transcription factor and the Wnt/ $\beta$ -catenina pathway.
4. Synovial fibroblasts from healthy donors, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients express CRF, UCN1, UCN2, UCN3 and CRFR2 constitutively. In no case CRFR1 expression was detected.
5. Synovial fibroblasts from osteoarthritis patients treated with VIP show a CRF family expression profile similar to that found in healthy donors.
6. VIP exerts a distinguishing effect in osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts on CRF family members and on the pro-inflammatory mediators COX-2 and PGE2 expression.
7. After IL-1 $\beta$  or 45KDa fibronectin fragments induction, VIP and CRF neuropeptides decrease proteinases production in osteoarthritis synovial fibroblasts. Among them are included the serin proteinase uPA, and the metalloproteinases MMP-9 and MMP-13, in the case of VIP, and the ADAMTS-4, -5, -7 y -12, for both neuropeptides.
8. The effect of VIP and CRF on the aggrecanases production in osteoarthritis synovial fibroblasts is produced by the inhibition of different signaling pathways that include the Runx2 transcription factor and the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.

9. VIP and CRF, by their effects on the synovial fibroblast, act as protectors of cartilage degradation in osteoarthritic patients.

# Resumen





## EL SINOVIOCITO FIBROBLÁSTICO EN LA ARTROSIS. EFECTO PROTECTOR DE VIP Y CRF

### Introducción

La artrosis (**OA**) es una enfermedad reumática crónica degenerativa y multifactorial. Es la artropatía más frecuente y la principal causa de daño y disfunción entre la población de mediana edad y anciana, caracterizada por una pérdida progresiva de la función de las articulaciones sinoviales (Bondeson *et al.*, 2010; Loeser *et al.*, 2012). Aunque la artritis reumatoide (AR) es la enfermedad reumática autoinmune inflamatoria por excelencia, más del 50% de los pacientes artrósicos también poseen signos de inflamación (Monfort, 2010; Pelletier *et al.*, 2001; Scanzello y Goldring, 2012). Durante la **sinovitis**, el sinoviocito fibroblástico (**SF**) juega un papel esencial mediante la liberación de mediadores inflamatorios (Benito *et al.*, 2005; Bottini y Firestein, 2013), entre los que se incluyen citocinas como la **IL-1 $\beta$**  (Goldring *et al.*, 2011; Stylianou y Saklatvala, 1998). Por otro lado, durante el proceso de destrucción articular se liberan componentes de la matriz extracelular (**MEC**) con propiedades potencialmente inflamatorias, incluyendo a la fibronectina y sus fragmentos de degradación (**Fn-fs**) (Homandberg *et al.*, 1998; Zack *et al.*, 2006). Estos mediadores contribuyen a la **destrucción del cartílago articular**, rompiendo el balance entre degradación y síntesis de la MEC, como consecuencia de una expresión alterada de las proteinasas (Attur *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2014; Pelletier *et al.*, 2001; Troeberg y Nagase, 2012). El activador del plasminógeno tipo uroquinasa (**uPA**) participa en la activación de otras proteinasas como las metaloproteinasa de matriz (**MMPs**) incluyendo la **MMP-9** y la **MMP-13** (Smith y Marshall, 2010). Otras metaloproteinasa implicadas en la degradación de la MEC son las desintegrinas y metaloproteinasa con motivos trombospondina (**ADAMTS**) (Kelwick *et al.*, 2015; Porter *et al.*, 2005; Takeda, 2009). Las agreganasas **ADAMTS-4** y **-5** son las principales implicadas en la proteólisis del agregano, liberando glicosaminoglicanos (**GAGs**), uno de los eventos clave en el desarrollo de la OA (Bondeson *et al.*, 2008; Fosang *et al.*, 2008; Huang y Wu, 2008; Kelwick *et al.*, 2015). Por otro lado, las **ADAMTS-7** y **-12** degradan a la proteína

oligomérica de la matriz del cartílago (**COMP**), que contribuye al mantenimiento de la estabilidad del cartílago (Lin y Liu, 2009; Liu *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006b).

En la articulación sinovial se establecen además complejas interacciones entre los sistemas endocrino, nervioso e inmune (Cutolo *et al.*, 2007). En este contexto, diferentes estudios han demostrado la presencia de neuropéptidos de las familias de péptido intestinal vasoactivo (**VIP**) y del factor liberador de corticotropina (**CRF**) en la articulación sinovial de pacientes con OA y AR (Crofford *et al.*, 1993; Juarranz *et al.*, 2008; Kohno *et al.*, 2001; Uzuki *et al.*, 2001). Diversos autores apoyan el papel antiinflamatorio de VIP en inflamación y autoinmunidad (Abad *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2002; Gomariz *et al.*, 2006). Sin embargo, respecto a la familia de CRF, se han descrito tanto efectos proinflamatorios como antiinflamatorios en distintas patologías (Dermitzaki *et al.*, 2014; McEvoy *et al.*, 2001; Tsatsanis *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2016). Hasta la fecha, las terapias disponibles para el tratamiento de la OA se han centrado en aliviar la sintomatología más que en frenar la progresión de la enfermedad. Por tanto, la búsqueda de nuevas dianas y herramientas terapéuticas es de gran importancia para el desarrollo de nuevos tratamientos para dicha patología. En este sentido, VIP y CRF son dos péptidos muy prometedores para el diseño de fármacos dirigidos al tratamiento de la OA (Couvineau y Laburthe, 2011; Sutton *et al.*, 2009).

## Objetivos

A la vista de los antecedentes expuestos nos proponemos:

- Caracterizar la familia de CRF en sinoviocitos fibroblásticos de pacientes con artrosis y artritis reumatoide. Además nos proponemos analizar el efecto de VIP sobre dicha familia de neuropéptidos.
- Estudiar el sistema uPA y las ADAMTS-4, -5, -7 y -12, tras la estimulación con IL-1 $\beta$  o con Fn-fs de 45KDa, en sinoviocitos fibroblásticos de artrosis.
- Determinar del efecto de los neuropéptidos VIP y CRF sobre la producción de dichas proteinasas en sinoviocitos fibroblásticos de artrosis.

## Resultados y discusión

Nuestros resultados confirman que los SF de OA expresan uPA, su inhibidor (PAI-1), y su receptor (uPAR) de manera constitutiva. Además, producen MMP-9 y MMP-13 constitutivamente. Asimismo, corroboramos que los SF de donantes sanos (HD) y de pacientes de OA producen ADAMTS-4 y -5, además de describir, por primera vez, la expresión y producción de las ADAMTS-7 y -12 en este tipo celular. Nuestros datos también indican que existe una mayor expresión de las ADAMTS-4 y -7 en pacientes de OA, pudiendo estar más implicadas en el desarrollo de la enfermedad. También demostramos que existe una mayor actividad agreganasa en los SF de OA, con una mayor liberación de GAGs, así como de COMP de los explantes de cartílago en cocultivo con estos SF. En cuanto a las rutas de señalización implicadas en la expresión de las ADAMTS, nuestros resultados demuestran que, a nivel basal, existe la misma activación de Runx2 en los SF de OA y de HD, mientras que se observa una mayor activación de  $\beta$ -catenina en los SF de OA que en los de HD.

La IL-1 $\beta$  y los Fn-fs de 45KDa, son capaces de elevar los niveles de uPA y uPAR, en SF de pacientes de OA, aumentando también su actividad en el caso de los Fn-fs, y la de PAI-1, con IL-1 $\beta$ . Este es el primer estudio en el que se describe la estimulación del sistema uPA con Fn-fs en SF, corroborando la importancia de este tipo celular en la patogenia de la OA, así como el potencial de los Fn-fs como mediadores de destrucción en la OA. La IL-1 $\beta$  y los Fn-fs también aumentan la producción de MMP-9 y -13 en los SF de OA. Respecto a las agreganasas, describimos como la IL-1 $\beta$  induce la producción de ADAMTS-4 y -5 en los SF, tanto de OA como de HD, pero estos efectos no se ven reflejados en su funcionalidad, debido a que no afecta a la actividad agreganasa ni a la liberación de GAGs del cartílago. Además estudiamos, por primera vez, los efectos de IL-1 $\beta$  y los Fn-fs sobre las ADAMTS-7 y -12, demostrando que ambos mediadores promueven la producción de ADAMTS-7 en SF y la liberación de COMP en los cocultivos de cartílago con SF de HD y OA, mientras que, en el caso de ADAMTS-12, sólo se observa inducción en la OA. Estos resultados vuelven a apuntar hacia ADAMTS-7 como la principal implicada en la degradación de COMP en la MEC del cartílago. Además, la inducción de ADAMTS-12 exclusivamente en OA, indica una regulación

diferencial de esta ADAMTS en dicha patología. Nuestros resultados demuestran que tanto la IL-1 $\beta$  como los Fn-fs de 45KDa inducen la activación de Runx2 en SF de OA y HD, coincidiendo con la producción de las ADAMTS-4, -5 y -7, lo que apunta hacia la implicación de este factor de transcripción en su expresión. La activación de la  $\beta$ -catenina por ambos mediadores sólo se produce en los SF de OA, coincidiendo con el patrón de activación de ADAMTS-12. La activación diferencial de esta vía en la OA, indica también su participación en la patogenia de la enfermedad.

Respecto a los neuropéptidos, hemos corroborado la producción de CRF y UCN1 en los SF de OA y AR, además de caracterizar por primera vez la expresión de UCN2, UCN3 y CRFR2 en dichas células, no detectándose expresión de CRFR1 en ninguno de los casos. Asimismo, hemos estudiado el perfil de las familias de neuropéptidos VIP y CRF en HD. VIP ejerce un efecto diferencial en los SF de OA y AR sobre la expresión de los miembros de la familia CRF y de los mediadores proinflamatorios COX-2 y PGE2. Además, los SF de OA tratados con VIP, presentan un perfil de expresión de los neuropéptidos de la familia de CRF similar al encontrado en HD. En cuanto a la acción de los neuropéptidos sobre las proteinasas, nuestros resultados demuestran que VIP modula el sistema uPA, además de disminuir la producción de MMP-9 y -13 en SF de OA. Tanto VIP como CRF son además capaces de reducir la producción de ADAMTS-4, -5, -7 y -12, así como la activación de Runx 2 y de  $\beta$ -catenina en los SF de OA, apoyando el valor terapéutico de dichos neuropéptidos en el mantenimiento de la MEC del cartílago.

## Conclusiones

A la vista de los resultados podemos concluir que el sinoviocito fibroblástico contribuye a la patogenia de la artrosis mediante la liberación de proteinasas, implicadas en la degradación de componentes esenciales de la matriz extracelular. Tanto la IL-1 $\beta$  como los Fn-fs de 45KDa incrementan la producción de estas proteinasas, observándose mayores efectos en el caso de los Fn-fs. Además de VIP y sus receptores, los sinoviocitos fibroblásticos de donantes sanos y de pacientes de artrosis y artritis reumatoide expresan péptidos de la familia de CRF. VIP y CRF poseen

un efector protector en la patogenia de la artrosis, disminuyendo la expresión y actividad de proteinasas producidas por el sinoviocito fibroblástico, que actúan en la degradación de la articulación sinovial. En este contexto, VIP tiene un efecto terapéutico mayor que CRF, inhibiendo un mayor número de proteinasas. Estos resultados suponen una contribución importante para el desarrollo de terapias basadas en el uso de estos neuropéptidos como herramientas para el diseño de fármacos dirigidos al tratamiento de enfermedades reumáticas inflamatorias y degenerativas como la artrosis.



## Summary





---

## THE SYNOVIAL FIBROBLAST IN OSTEOARTHRITIS. PROTECTIVE EFFECT OF VIP AND CRF

### Introduction

Osteoarthritis (**OA**) is a chronic, degenerative and multifactorial disease. OA is the most frequent arthropathy being the main cause of pain and dysfunction among middle age and elder people, characterized by a progressive loss of the synovial joints function (Bondeson *et al.*, 2010; Loeser *et al.*, 2012). Despite that rheumatoid arthritis (**RA**) is considered the key inflammatory and autoimmune rheumatic disease, more than 50% of the OA patients, also present signs of inflammation (Monfort, 2010; Pelletier *et al.*, 2001; Scanzello y Goldring, 2012). During **synovitis**, the synovial fibroblast (**SF**) plays a key role releasing inflammatory mediators (Benito *et al.*, 2005; Bottini y Firestein, 2013), including cytokines as **IL-1 $\beta$**  (Goldring *et al.*, 2011; Stylianou y Saklatvala, 1998). On the other hand, during joint destruction, components with inflammatory properties are released from the extracellular matrix (**ECM**), including fibronectin and its degradation fragments (**Fn-fs**). These mediators contribute to the articular cartilage ECM destruction, breaking the balance between synthesis and degradation, as a consequence of the altered expression of proteinases (Attur *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2014; Pelletier *et al.*, 2001; Troeberg y Nagase, 2012). The urokinase plasminogen activator (**uPA**) contributes to the activation of other proteinases such as matrix metalloproteinases (**MMPs**), including MMP-13 and MMP-9 (Smith y Marshall, 2010). A disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs (**ADAMTS**) are also involved in the ECM degradation (Kelwick *et al.*, 2015; Porter *et al.*, 2005; Takeda, 2009). Aggrecanases ADAMTS-4 and -5 are the main implicated in aggrecan proteolysis, with the subsequent release of glycosaminoglycans (**GAGs**), one of the major events in OA development (Bondeson *et al.*, 2008; Fosang *et al.*, 2008; Huang y Wu, 2008; Kelwick *et al.*, 2015). In addition, ADAMTS-7 and -12 degrade cartilage oligomeric matrix protein (**COMP**) that contributes to cartilage maintenance (Lin y Liu, 2009; Liu *et al.*, 2006a; Liu *et al.*, 2006b).

The synovial joint is also a target wherein complex interactions between endocrine, nervous, and immune systems arise (Cutolo *et al.*, 2007). In this sense, different studies have shown the presence of neuropeptides from the families of the vasoactive intestinal peptide (**VIP**) and the corticotrophin-releasing factor (**CRF**) in the synovial joint from OA and RA patients (Crofford *et al.*, 1993; Juarranz *et al.*, 2008; Kohno *et al.*, 2001; Uzuki *et al.*, 2001). Several authors have described the anti-inflammatory role of VIP in inflammation and autoimmunity (Abad *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2002; Gomariz *et al.*, 2006). However, both pro- and anti-inflammatory effects have been described with CRF in different pathologies (Dermitzaki *et al.*, 2014; McEvoy *et al.*, 2001; Tsatsanis *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2016). To date, available therapies for the treatment of OA are more focused on alleviating the symptoms than stopping disease progression. Therefore, the search for new targets and therapeutic tools is of great importance to develop new treatments for this pathology. In this sense, VIP and CRF are two promising neuropeptides for designing of new drugs to the treatment of OA (Couvineau y Laburthe, 2011; Sutton *et al.*, 2009).

## Objectives

In view of these antecedents we propose the next objectives:

- To characterize the CRF family of neuropeptides in synovial fibroblasts from osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients, and to analyze the effect of VIP on this family of neuropeptides.
- To study the uPA system and the ADAMTS-4, -5, -7 and -12 after IL-1 $\beta$  or 45KDa Fn-fs stimulation, in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients.
- To establish the VIP and CRF effect on the production of these proteinases in synovial fibroblasts from osteoarthritis patients.

## Results and discussion

Our results confirm that OA-SF constitutively express uPA, its inhibitor (PAI-1), and its receptor (uPAR). Moreover, OA-SF constitutively release MMP-9 and MMP-13. In addition, we confirm that SF from healthy donors (HD) and OA patients produce ADAMTS-4 and -5, and we describe for the first time the expression of ADAMTS-7 and -12 in these cells. Our data also indicate that there is a greater expression of ADAMTS-4 and -7 in OA patients, which could be involved in the disease progression. We also show that there is a greater aggrecanase activity in the OA-SF, with a greater release of GAGs and COMP from the explants in co-culture with these cells. Regarding the signaling pathways implicated in ADAMTS expression, our results show that under basal conditions there is the same activation of Runx2 in OA- and HD-SF, by contrast there is more activation of  $\beta$ -catenina in OA-SF.

IL-1 $\beta$  and 45KDa Fn-fs are able to increase uPA and uPAR levels in SF from OA patients, also increasing its activity in the case of the Fn-fs, and the production of PAI-1 with IL-1 $\beta$ . This is the first study that describes the stimulation of the uPA system by Fn-fs in SF, corroborating the role these cells in the OA pathogenesis, as well as the potential of Fn-fs as mediators of destruction in OA. IL-1 $\beta$  and Fn-fs also increase MMP-9 and -13 production in OA-SF. Regarding the aggrecanases, we describe that IL-1 $\beta$  induces ADAMTS-4 and -5 in HD- and OA-SF, but these effects are not reflected in their functionality since IL-1 $\beta$  does not affect the aggrecanase activity, neither the GAGs release. Moreover, we study for the first time the effects of IL-1 $\beta$  and Fn-fs on ADAMTS-7 and -12 expression, showing that both mediators induce ADAMTS-7 production in SF, and COMP release in cartilage-SF co-cultures in HD and OA, while the induction of ADAMTS-12 is only observed in OA. Once more, these data point to ADAMTS-7 as the main ADMATS implicated in COMP degradation in the cartilage ECM. In addition, the exclusive induction of ADAMTS-12 in OA indicates a specific regulation of this ADAMTS in the pathology.

Concerning the neuropeptides we have confirmed the CRF and UCN1 production in OA- and RA-SF, and characterized for the first time the UCN2, UCN3 and CRFR2 expression in these cells. In no case CRFR1 expression was detected. Moreover,

we have studied the expression profile of VIP and CRF families in HD-SF. VIP exerts a distinguishing effect in OA- and RA-SF on CRF family members and on the pro-inflammatory mediators COX-2 and PGE2 expression. In addition, OA-SF treated with VIP show an expression profile of the CRF family peptides similar to that found in HD. Regarding the action of these neuropeptides on the proteinases, our results show that VIP modulates uPA system and decrease the production of MMP-9 and -13 in OA-SF. VIP and CRF are also able to decrease ADAMTS-4, -5, -7 and -12 production, as well as Runx2 and  $\beta$ -catenina activation, supporting the therapeutic value of these neuropeptides in the maintenance of the cartilage ECM in OA.

## Conclusions

In view of the presented results we can conclude that the synovial fibroblast contributes to the OA pathogenesis by releasing proteinases implicated in the degradation of main components of the extracellular matrix. IL-1 $\beta$  and 45KDa Fn-fs increase the production of these proteinases, where the Fn-fs show a greater effect. In addition to VIP and its receptors, synovial fibroblasts from healthy donors, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis patients, express peptides of the CRF family. VIP and CRF possess a protective effect in the osteoarthritis pathology, decreasing proteinases expression and activity produced by synovial fibroblasts, which are implicated in the synovial joint degradation. In this sense, VIP has a therapeutic effect greater than that of CRF, inhibiting a higher number of proteinases. These results represent an important contribution to the development of therapies based on the use of these neuropeptides as therapeutic tools to design new drugs for inflammatory and degenerative rheumatic diseases as osteoarthritis.

## Bibliografía





- Abad, C., C. Martinez, J. Leceta, R.P. Gomariz, and M. Delgado (2001). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits collagen-induced arthritis: an experimental immunomodulatory therapy. *J Immunol.* 167:3182-3189.
- Abad, C., C. Martinez, M.G. Juarranz, A. Arranz, J. Leceta, M. Delgado, and R.P. Gomariz (2003). Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid mice model of Crohn's disease. *Gastroenterology.* 124:961-971.
- Abad, C., R.P. Gomariz, and J.A. Waschek (2006). Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem.* 6:151-163.
- Abad, C., Y.V. Tan, R. Lopez, H. Nobuta, H. Dong, P. Phan, J.M. Feng, A.T. Campagnoni, and J.A. Waschek (2010). Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:19555-19560.
- Abad, C., R. Gomariz, J. Waschek, J. Leceta, C. Martinez, Y. Juarranz, and A. Arranz (2012a). VIP in inflammatory bowel disease: state of the art. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 12:316-322.
- Abad, C., Y.V. Tan, G. Cheung-Lau, H. Nobuta, and J.A. Waschek (2012b). VIP deficient mice exhibit resistance to lipopolysaccharide induced endotoxemia with an intrinsic defect in proinflammatory cellular responses. *PLoS One.* 7:e36922.
- Abramson, S.B., and M. Attur (2009). Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 11:227.
- Adachi, M., S. Okamoto, S. Chujyo, T. Arakawa, M. Yokoyama, K. Yamada, A. Hayashi, K. Akita, M. Takeno, S. Itoh, T. Takii, Y. Waguri-Nagaya, T. Otsuka, K. Hayakawa, K. Miyazawa, and K. Onozaki (2013). Cigarette smoke condensate extracts induce IL-1-beta production from rheumatoid arthritis patient-derived synoviocytes, but not osteoarthritis patient-derived synoviocytes, through aryl hydrocarbon receptor-dependent NF-kappa-B activation and novel NF-kappa-B sites. *J Interferon Cytokine Res.* 33:297-307.
- Adcock, I.M., C.R. Brown, H. Shirasaki, and P.J. Barnes (1994). Effects of dexamethasone on cytokine and phorbol ester stimulated c-Fos and c-Jun DNA binding and gene expression in human lung. *Eur Respir J.* 7:2117-2123.
- Agelaki, S., C. Tsatsanis, A. Gravanis, and A.N. Margioris (2002). Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect Immun.* 70:6068-6074.
- Aguirre Ghiso, J.A. (2002). Inhibition of FAK signaling activated by urokinase receptor induces dormancy in human carcinoma cells in vivo. *Oncogene.* 21:2513-2524.
- Ahmad, R., H.Y. Qureshi, M. El Mabrouk, J. Sylvester, M. Ahmad, and M. Zafarullah (2007). Inhibition of interleukin 1-induced matrix metalloproteinase 13 expression in human chondrocytes by interferon gamma. *Ann Rheum Dis.* 66:782-789.
- Ahrens, D., A.E. Koch, R.M. Pope, M. Stein-Picarella, and M.J. Niedbala (1996). Expression of matrix metalloproteinase 9 (96-kd gelatinase B) in human rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 39:1576-1587.
- Aigner, T., J. Haag, J. Martin, and J. Buckwalter (2007). Osteoarthritis: aging of matrix and cells-going for a remedy. *Curr Drug Targets.* 8:325-331.

- Aikawa, Y., K. Morimoto, T. Yamamoto, H. Chaki, A. Hashiramoto, H. Narita, S. Hirono, and S. Shiozawa (2008). Treatment of arthritis with a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1. *Nat Biotechnol.* 26:817-823.
- Alaaeddine, N., J.A. DiBattista, J.P. Pelletier, J.M. Cloutier, K. Kiansa, M. Dupuis, and J. Martel-Pelletier (1997). Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. *J Rheumatol.* 24:1985-1994.
- Alaaeddine, N., J.A. Di Battista, J.P. Pelletier, K. Kiansa, J.M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier (1999). Differential effects of IL-8, LIF (pro-inflammatory) and IL-11 (anti-inflammatory) on TNF-alpha-induced PGE(2) release and on signalling pathways in human OA synovial fibroblasts. *Cytokine.* 11:1020-1030.
- Alcaraz, M.J., J. Megias, I. Garcia-Arnandis, V. Clerigues, and M.I. Guillen (2010). New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.* 80:13-21.
- Apparailly, F., C. Bouquet, V. Millet, D. Noel, C. Jacquet, P. Opolon, M. Perricaudet, J. Sany, P. Yeh, and C. Jorgensen (2002). Adenovirus-mediated gene transfer of urokinase plasminogen inhibitor inhibits angiogenesis in experimental arthritis. *Gene Ther.* 9:192-200.
- Apte, S.S. (2004). A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motifs: the ADAMTS family. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:981-985.
- Apte, S.S. (2009). A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem.* 284:31493-31497.
- Arner, E.C., M.A. Pratta, J.M. Trzaskos, C.P. Decicco, and M.D. Tortorella (1999). Generation and characterization of aggrecanase. A soluble, cartilage-derived aggrecan-degrading activity. *J Biol Chem.* 274:6594-6601.
- Arranz, A., C. Abad, Y. Juarranz, M. Torroba, F. Rosignoli, J. Leceta, R.P. Gomariz, and C. Martinez (2006). Effect of VIP on TLR2 and TLR4 expression in lymph node immune cells during TNBS-induced colitis. *Ann N Y Acad Sci.* 1070:129-134.
- Arranz, A., I. Gutierrez-Canas, M. Carrion, Y. Juarranz, J.L. Pablos, C. Martinez, and R.P. Gomariz (2008a). VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mol Immunol.* 45:3065-3073.
- Arranz, A., Y. Juarranz, J. Leceta, R.P. Gomariz, and C. Martinez (2008b). VIP balances innate and adaptive immune responses induced by specific stimulation of TLR2 and TLR4. *Peptides.* 29:948-956.
- Asahara, H., K. Fujisawa, T. Kobata, T. Hasunuma, T. Maeda, M. Asanuma, N. Ogawa, H. Inoue, T. Sumida, and K. Nishioka (1997). Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum.* 40:912-918.
- Attur, M., J. Samuels, S. Krasnokutsky, and S.B. Abramson (2010). Targeting the synovial tissue for treating osteoarthritis (OA): where is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 24:71-79.
- Attur, M.G., M. Dave, M. Akamatsu, M. Katoh, and A.R. Amin (2002). Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine. *Osteoarthritis Cartilage.* 10:1-4.

- Auphan, N., J.A. DiDonato, C. Rosette, A. Helmborg, and M. Karin (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*. 270:286-290.
- Bai, X.H., D.W. Wang, L. Kong, Y. Zhang, Y. Luan, T. Kobayashi, H.M. Kronenberg, X.P. Yu, and C.J. Liu (2009a). ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. *Mol Cell Biol*. 29:4201-4219.
- Bai, X.H., D.W. Wang, Y. Luan, X.P. Yu, and C.J. Liu (2009b). Regulation of chondrocyte differentiation by ADAMTS-12 metalloproteinase depends on its enzymatic activity. *Cell Mol Life Sci*. 66:667-680.
- Baigent, S.M. (2001). Peripheral corticotropin-releasing hormone and urocortin in the control of the immune response. *Peptides*. 22:809-820.
- Bale, T.L., F.J. Giordano, R.P. Hickey, Y. Huang, A.K. Nath, K.L. Peterson, W.W. Vale, and K.F. Lee (2002). Corticotropin-releasing factor receptor 2 is a tonic suppressor of vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:7734-7739.
- Bartok, B., and G.S. Firestein (2010). Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 233:233-255.
- Batlle-Gualda, E., P. Benito-Ruiz, F.J. Blanco, and E. Martín (2002). Manual SER de la Artrosis. IM&C, Madrid, España.
- Bau, B., P.M. Gebhard, J. Haag, T. Knorr, E. Bartnik, and T. Aigner (2002). Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum*. 46:2648-2657.
- Beier, F., and R.F. Loeser (2010). Biology and pathology of Rho GTPase, PI-3 kinase-Akt, and MAP kinase signaling pathways in chondrocytes. *J Cell Biochem*. 110:573-580.
- Bengoa-Vergniory, N., and R.M. Kypta (2015). Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cell Mol Life Sci*. 72:4157-4172.
- Benito, M.J., D.J. Veale, O. FitzGerald, W.B. van den Berg, and B. Bresnihan (2005). Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 64:1263-1267.
- Beyer, C., and G. Schett (2010). Pharmacotherapy: concepts of pathogenesis and emerging treatments. Novel targets in bone and cartilage. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 24:489-496.
- Bielefeld, K.A., S. Amini-Nik, H. Whetstone, R. Poon, A. Youn, J. Wang, and B.A. Alman (2011). Fibronectin and beta-catenin act in a regulatory loop in dermal fibroblasts to modulate cutaneous healing. *J Biol Chem*. 286:27687-27697.
- Bileviciute, I., M. Ahmed, J. Bergstrom, A. Ericsson-Dahlstrand, A. Kreicbergs, and T. Lundeberg (1997). Expression of corticotropin-releasing factor in the peripheral nervous system of the rat. *Neuroreport*. 8:3127-3130.
- Blanco, F.J., J.D. Cañete, and J.L. Pablos (2007). Monografías SER. Técnicas de Investigación Básica en Reumatología. Médica Panamericana, Madrid, España.
- Blasi, F., and N. Sidenius (2010). The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. *FEBS Lett*. 584:1923-1930.
- Blom, A.B., S.M. Brockbank, P.L. van Lent, H.M. van Beuningen, J. Geurts, N. Takahashi, P.M. van der Kraan, F.A. van de Loo, B.W. Schreurs, K. Clements, P. Newham, and W.B. van den Berg (2009). Involvement of the Wnt signaling pathway in experimental and

- human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1. *Arthritis Rheum.* 60:501-512.
- Blom, A.B., P.L. van Lent, P.M. van der Kraan, and W.B. van den Berg (2010). To seek shelter from the WNT in osteoarthritis? WNT-signaling as a target for osteoarthritis therapy. *Curr Drug Targets.* 11:620-629.
- Blouse, G.E., K.A. Botkjaer, E. Deryugina, A.A. Byszuk, J.M. Jensen, K.K. Mortensen, J.P. Quigley, and P.A. Andreasen (2009). A novel mode of intervention with serine protease activity: targeting zymogen activation. *J Biol Chem.* 284:4647-4657.
- Bobinac, D., J. Spanjol, S. Zoricic, and I. Maric (2003). Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans. *Bone.* 32:284-290.
- Bodner, M., M. Fridkin, and I. Gozes (1985). Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:3548-3551.
- Boileau, C., J.P. Pelletier, G. Tardif, H. Fahmi, S. Laufer, M. Lavigne, and J. Martel-Pelletier (2005). The regulation of human MMP-13 by licofelone, an inhibitor of cyclooxygenases and 5-lipoxygenase, in human osteoarthritic chondrocytes is mediated by the inhibition of the p38 MAP kinase signalling pathway. *Ann Rheum Dis.* 64:891-898.
- Bondeson, J., S.D. Wainwright, S. Lauder, N. Amos, and C.E. Hughes (2006). The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 8:R187.
- Bondeson, J., S. Lauder, S. Wainwright, N. Amos, A. Evans, C. Hughes, M. Feldmann, and B. Caterson (2007). Adenoviral gene transfer of the endogenous inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$  into human osteoarthritis synovial fibroblasts demonstrates that several matrix metalloproteinases and aggrecanases are nuclear factor- $\kappa$ B-dependent. *J Rheumatol.* 34:523-533.
- Bondeson, J., S. Wainwright, C. Hughes, and B. Caterson (2008). The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review. *Clin Exp Rheumatol.* 26:139-145.
- Bondeson, J., A.B. Blom, S. Wainwright, C. Hughes, B. Caterson, and W.B. van den Berg (2010). The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 62:647-657.
- Bonnet, C.S., and D.A. Walsh (2005). Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford).* 44:7-16.
- Bottini, N., and G.S. Firestein (2013). Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol.* 9:24-33.
- Brabet, P., S. Diriong, L. Journot, J. Bockaert, and S. Taviaux (1996). Localization of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor (PACAP1-R) gene to 7p15-p14 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 38:100-102.
- Brubaker, P.L. (2007). Incretin-based therapies: mimetics versus protease inhibitors. *Trends in Endocrinology and Metabolism.* 18:240-245.
- Bruderer, M., R.G. Richards, M. Alini, and M.J. Stoddart (2014). Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater.* 28:269-286.

- Bui, C., M.J. Barter, J.L. Scott, Y. Xu, M. Galler, L.N. Reynard, A.D. Rowan, and D.A. Young (2012). cAMP response element-binding (CREB) recruitment following a specific CpG demethylation leads to the elevated expression of the matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes and osteoarthritis. *FASEB J.* 26:3000-3011.
- Buisson-Legendre, N., S. Smith, L. March, and C. Jackson (2004). Elevation of activated protein C in synovial joints in rheumatoid arthritis and its correlation with matrix metalloproteinase 2. *Arthritis Rheum.* 50:2151-2156.
- Cal, S., J.M. Arguelles, P.L. Fernandez, and C. Lopez-Otin (2001). Identification, characterization, and intracellular processing of ADAM-TS12, a novel human disintegrin with a complex structural organization involving multiple thrombospondin-1 repeats. *J Biol Chem.* 276:17932-17940.
- Campbell, R.M., J. Bongers, and A.M. Felix (1995). Rational design, synthesis, and biological evaluation of novel growth hormone releasing factor analogues. *Biopolymers.* 37:67-88.
- Cañete, J.D., J.J. Gómez-Reino, M.A. González-Gay, G. Herrero-Beaumont, L. Morillas, J.L. Pablos, and R. Sanmartí (2008). Manual SER de las enfermedades reumáticas. Médica Panamericana, Madrid, España.
- Cao, J., N. Papadopoulou, D. Kempuraj, W.S. Boucher, K. Sugimoto, C.L. Cetrulo, and T.C. Theoharides (2005). Human mast cells express corticotropin-releasing hormone (CRH) receptors and CRH leads to selective secretion of vascular endothelial growth factor. *J Immunol.* 174:7665-7675.
- Carmeliet, P., L. Moons, R. Lijnen, M. Baes, V. Lemaître, P. Tipping, A. Drew, Y. Eeckhout, S. Shapiro, F. Lupu, and D. Collen (1997). Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet.* 17:439-444.
- Carrion, M., Y. Juarranz, S. Perez-Garcia, R. Jimeno, J.L. Pablos, R.P. Gomariz, and I. Gutierrez-Canas (2011). RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide. *Arthritis Rheum.* 63:1626-1636.
- Carrion, M., S. Perez-Garcia, R. Jimeno, Y. Juarranz, I. Gonzalez-Alvaro, J.L. Pablos, I. Gutierrez-Canas, and R.P. Gomariz (2013). Inflammatory mediators alter interleukin-17 receptor, interleukin-12 and -23 expression in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immunomodulation by vasoactive intestinal Peptide. *Neuroimmunomodulation.* 20:274-284.
- Carrion, M., Y. Juarranz, I.V. Seoane, C. Martinez, I. Gonzalez-Alvaro, J.L. Pablos, I. Gutierrez-Canas, and R.P. Gomariz (2014). VIP modulates IL-22R1 expression and prevents the contribution of rheumatoid synovial fibroblasts to IL-22-mediated joint destruction. *J Mol Neurosci.* 52:10-17.
- Cerinic, M.M., S. Generini, G. Partsch, A. Pignone, G. Dini, Y.T. Konttinen, and M. Del Rosso (1998). Synoviocytes from osteoarthritis and rheumatoid arthritis produce plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 and display u-PA receptors on their surface. *Life Sci.* 63:441-453.
- Clark, A.G., J.M. Jordan, V. Vilim, J.B. Renner, A.D. Dragomir, G. Luta, and V.B. Kraus (1999). Serum cartilage oligomeric matrix protein reflects osteoarthritis presence and severity: the Johnston County Osteoarthritis Project. *Arthritis Rheum.* 42:2356-2364.
- Clutterbuck, A.L., K.E. Asplin, P. Harris, D. Allaway, and A. Mobasheri (2009). Targeting matrix metalloproteinases in inflammatory conditions. *Curr Drug Targets.* 10:1245-1254.

- Colotta, F., S.K. Dower, J.E. Sims, and A. Mantovani (1994). The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today*. 15:562-566.
- Collen, D. (1999). The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thromb Haemost*. 82:259-270.
- Combs, C.E., K. Fuller, H. Kumar, A.P. Albert, G. Pirianov, J. McCormick, I.C. Locke, T.J. Chambers, and K.M. Lawrence (2012). Urocortin is a novel regulator of osteoclast differentiation and function through inhibition of a canonical transient receptor potential 1-like cation channel. *J Endocrinol*. 212:187-197.
- Comoglio, P.M., L. Tamagnone, and C. Boccaccio (1999). Plasminogen-related growth factor and semaphorin receptors: a gene superfamily controlling invasive growth. *Exp Cell Res*. 253:88-99.
- Corr, M. (2008). Wnt-beta-catenin signaling in the pathogenesis of osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 4:550-556.
- Couvineau, A., and M. Laburthe (2011). VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol*. 166:42-50.
- Couvineau, A., and M. Laburthe (2012). The family B1 GPCR: structural aspects and interaction with accessory proteins. *Curr Drug Targets*. 13:103-115.
- Cravero, J.D., C.S. Carlson, H.J. Im, R.R. Yammani, D. Long, and R.F. Loeser (2009). Increased expression of the Akt/PKB inhibitor TRB3 in osteoarthritic chondrocytes inhibits insulin-like growth factor 1-mediated cell survival and proteoglycan synthesis. *Arthritis Rheum*. 60:492-500.
- Crofford, L.J., H. Sano, K. Karalis, T.C. Friedman, H.R. Epps, E.F. Remmers, P. Mathern, G.P. Chrousos, and R.L. Wilder (1993). Corticotropin-releasing hormone in synovial fluids and tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Immunol*. 151:1587-1596.
- Cuellar, V.G., J.M. Cuellar, T. Kirsch, and E.J. Strauss (2015). Correlation of Synovial Fluid Biomarkers With Cartilage Pathology and Associated Outcomes in Knee Arthroscopy. *Arthroscopy*.
- Cutolo, M., R.H. Straub, and J.W. Bijlsma (2007). Neuroendocrine-immune interactions in synovitis. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 3:627-634.
- Chalmers, D.T., T.W. Lovenberg, D.E. Grigoriadis, D.P. Behan, and E.B. De Souza (1996). Corticotrophin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. *Trends Pharmacol Sci*. 17:166-172.
- Chandras, C., Y. Koutmani, E. Kokkotou, C. Pothoulakis, and K.P. Karalis (2009). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B by corticotropin-releasing factor in human monocytes. *Endocrinology*. 150:4606-4614.
- Chang, L., and M. Karin (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410:37-40.
- Chang, Z., L. Huo, P. Li, Y. Wu, and P. Zhang (2015). Ascorbic acid provides protection for human chondrocytes against oxidative stress. *Mol Med Rep*. 12:7086-7092.
- Chen, C.G., D. Thuillier, E.N. Chin, and T. Alliston (2012). Chondrocyte-intrinsic Smad3 represses Runx2-inducible matrix metalloproteinase 13 expression to maintain articular cartilage and prevent osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 64:3278-3289.
- Chen, L., D.Q. Li, J. Zhong, X.L. Wu, Q. Chen, H. Peng, and S.Q. Liu (2011). IL-17RA aptamer-mediated repression of IL-6 inhibits synovium inflammation in a murine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 19:711-718.

- Christopoulos, A., G. Christopoulos, M. Morfis, M. Udawela, M. Laburthe, A. Couvineau, K. Kuwasako, N. Tilakaratne, and P.M. Sexton (2003). Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins. *J Biol Chem.* 278:3293-3297.
- Chu, S.C., S.F. Yang, K.H. Lue, Y.S. Hsieh, T.Y. Hsiao, and K.H. Lu (2006). Urokinase-type plasminogen activator, receptor, and inhibitor correlating with gelatinase-B (MMP-9) contribute to inflammation in gouty arthritis of the knee. *J Rheumatol.* 33:311-317.
- D'Andrea, P., A. Calabrese, and M. Grandolfo (1998). Intercellular calcium signalling between chondrocytes and synovial cells in co-culture. *Biochem J.* 329 ( Pt 3):681-687.
- Davidson, R.K., J.G. Waters, L. Kevorkian, C. Darrah, A. Cooper, S.T. Donell, and I.M. Clark (2006). Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage. *Arthritis Res Ther.* 8:R124.
- Davies, S.P., H. Reddy, M. Caivano, and P. Cohen (2000). Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* 351:95-105.
- De Langhe, S.P., F.G. Sala, P.M. Del Moral, T.J. Fairbanks, K.M. Yamada, D. Warburton, R.C. Burns, and S. Bellusci (2005). Dickkopf-1 (DKK1) reveals that fibronectin is a major target of Wnt signaling in branching morphogenesis of the mouse embryonic lung. *Dev Biol.* 277:316-331.
- Del Rey, M.J., A. Usategui, E. Izquierdo, J.D. Canete, F.J. Blanco, G. Criado, and J.L. Pablos (2011). Transcriptome analysis reveals specific changes in osteoarthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 71:275-280.
- Del Rey, M.J., R. Fare, E. Izquierdo, A. Usategui, J.L. Rodriguez-Fernandez, A. Suarez-Fueyo, J.D. Canete, and J.L. Pablos (2014). Clinicopathological correlations of podoplanin (gp38) expression in rheumatoid synovium and its potential contribution to fibroblast platelet crosstalk. *PLoS One.* 9:e99607.
- Del Rosso, A., M. Cinelli, S. Guiducci, A. Pignone, G. Fibbi, F. Margheri, A. Gabrielli, R. Giacomelli, A. Coppini, M. Del Rosso, and M. Matucci Cerinic (2005). Deflazacort modulates the fibrinolytic pattern and reduces uPA-dependent chemoinvasion and proliferation in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Rheumatology (Oxford).* 44:1255-1262.
- Del Rosso, M., G. Fibbi, M. Pucci, F. Margheri, and S. Serrati (2008). The plasminogen activation system in inflammation. *Front Biosci.* 13:4667-4686.
- Delgado, M., E.J. Munoz-Elias, Y. Kan, I. Gozes, M. Fridkin, D.E. Brenneman, R.P. Gomariz, and D. Ganea (1998). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor alpha transcriptional activation by regulating nuclear factor-kB and cAMP response element-binding protein/c-Jun. *J Biol Chem.* 273:31427-31436.
- Delgado, M., J. Leceta, R.P. Gomariz, and D. Ganea (1999a). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulate the induction of Th2 responses by up-regulating B7.2 expression. *J Immunol.* 163:3629-3635.
- Delgado, M., E.J. Munoz-Elias, R.P. Gomariz, and D. Ganea (1999b). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *J Immunol.* 162:1707-1716.

- Delgado, M., C. Abad, C. Martinez, J. Leceta, and R.P. Gomariz (2001). Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med.* 7:563-568.
- Delgado, M., C. Abad, C. Martinez, M.G. Juarranz, A. Arranz, R.P. Gomariz, and J. Leceta (2002). Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med (Berl).* 80:16-24.
- Delgado, M., G. Robledo, B. Rueda, N. Varela, F. O'Valle, P. Hernandez-Cortes, M. Caro, G. Orozco, E. Gonzalez-Rey, and J. Martin (2008). Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells. *Arthritis Rheum.* 58:1010-1019.
- Delgado, M., and D. Ganea (2011). Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions. *Amino Acids.* 45:25-39.
- Dell'accio, F., C. De Bari, N.M. Eltawil, P. Vanhummelen, and C. Pitzalis (2008). Identification of the molecular response of articular cartilage to injury, by microarray screening: Wnt-16 expression and signaling after injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 58:1410-1421.
- Deng, J., K. Muthu, R. Gamelli, R. Shankar, and S.B. Jones (2004). Adrenergic modulation of splenic macrophage cytokine release in polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 287:C730-736.
- Dermitzaki, E., C. Tsatsanis, I. Charalampopoulos, A. Androulidaki, V.I. Alexaki, E. Castanas, A. Gravanis, and A.N. Margioris (2005). Corticotropin-releasing hormone activates protein kinase C in an isoenzyme-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 327:828-836.
- Dermitzaki, E., C. Tsatsanis, V. Minas, E. Chatzaki, I. Charalampopoulos, M. Venihaki, A. Androulidaki, M. Lambropoulou, J. Spiess, E. Michalodimitrakis, A. Gravanis, and A.N. Margioris (2007). Corticotropin-releasing factor (CRF) and the urocortins differentially regulate catecholamine secretion in human and rat adrenals, in a CRF receptor type-specific manner. *Endocrinology.* 148:1524-1538.
- Dermitzaki, E., G. Liapakis, A. Androulidaki, M. Venihaki, J. Melissas, C. Tsatsanis, and A.N. Margioris (2014). Corticotrophin-Releasing Factor (CRF) and the urocortins are potent regulators of the inflammatory phenotype of human and mouse white adipocytes and the differentiation of mouse 3T3L1 pre-adipocytes. *PLoS One.* 9:e97060.
- Dhingra, V.K., A. Uusaro, C.L. Holmes, and K.R. Walley (2001). Attenuation of lung inflammation by adrenergic agonists in murine acute lung injury. *Anesthesiology.* 95:947-953.
- Di Cesare, P.E., F.S. Chen, M. Moergelin, C.S. Carlson, M.P. Leslie, R. Perris, and C. Fang (2002). Matrix-matrix interaction of cartilage oligomeric matrix protein and fibronectin. *Matrix Biol.* 21:461-470.
- Dickson, L., and K. Finlayson (2009). VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther.* 121:294-316.
- Ding, L., D. Guo, and G.A. Homandberg (2008). The cartilage chondrolytic mechanism of fibronectin fragments involves MAP kinases: comparison of three fragments and native fibronectin. *Osteoarthritis Cartilage.* 16:1253-1262.
- Ding, L., D. Guo, and G.A. Homandberg (2009). Fibronectin fragments mediate matrix metalloproteinase upregulation and cartilage damage through proline rich tyrosine

- kinase 2, c-src, NF-kappaB and protein kinase Cdelta. *Osteoarthritis Cartilage*. 17:1385-1392.
- Ding, L., D. Guo, G.A. Homandberg, J.A. Buckwalter, and J.A. Martin (2014). A single blunt impact on cartilage promotes fibronectin fragmentation and upregulates cartilage degrading stromelysin-1/matrix metalloproteinase-3 in a bovine ex vivo model. *J Orthop Res*. 32:811-818.
- Dinsmore, W.W., C. Gingell, G. Hackett, P. Kell, D. Savage, R. Oakes, and G.D. Frentz (1999). Treating men with predominantly nonpsychogenic erectile dysfunction with intracavernosal vasoactive intestinal polypeptide and phentolamine mesylate in a novel auto-injector system: a multicentre double-blind placebo-controlled study. *BJU Int*. 83:274-279.
- Dogrukol-Ak, D., F. Tore, and N. Tuncel (2004). Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects. *Curr Pharm Des*. 10:1325-1340.
- Domagala, F., G. Martin, P. Bogdanowicz, H. Ficheux, and J.P. Pujol (2006). Inhibition of interleukin-1beta-induced activation of MEK/ERK pathway and DNA binding of NF-kappaB and AP-1: potential mechanism for Diacerein effects in osteoarthritis. *Biorheology*. 43:577-587.
- Dou, Y., B. Tong, Z. Wei, Y. Li, Y. Xia, and Y. Dai (2013). Scopoletin suppresses IL-6 production from fibroblast-like synoviocytes of adjuvant arthritis rats induced by IL-1beta stimulation. *Int Immunopharmacol*. 17:1037-1043.
- Dudhia, J. (2005). Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci*. 62:2241-2256.
- Dutu, A., V. Vlaicu-Rus, H.D. Bolosiu, I. Parasca, and A. Cristea (1986). Fibronectin in plasma and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Med Interne*. 24:61-68.
- Elenkov, I.J., R.L. Wilder, G.P. Chrousos, and E.S. Vizi (2000). The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*. 52:595-638.
- Escobar-Gómez, F., E. JÓDAR, and F. HAWKINS (2009). Receptor Wnt: fisiología, fisiopatología y potenciales nuevas dianas terapéuticas. *REEMO*. 18:39-44.
- EULAR (2009). European League Against Rheumatism. 10 things you should know about rheumatic diseases. En: [http://www.eular.org/myUploadData/files/10\\_things\\_on\\_RD.pdf](http://www.eular.org/myUploadData/files/10_things_on_RD.pdf).
- EULAR (2015). European League Against Rheumatism Annual Congress. Rheumatic diseases factsheet. En: [http://www.congress.eular.org/myUploadData/files/EULAR\\_2015\\_Rheumatic\\_Diseases\\_Factsheet.pdf](http://www.congress.eular.org/myUploadData/files/EULAR_2015_Rheumatic_Diseases_Factsheet.pdf).
- Eymard, F., A. Pigenet, D. Citadelle, C.H. Flouzat-Lachaniette, A. Poignard, C. Benelli, F. Berenbaum, X. Chevalier, and X. Houard (2014). Induction of an inflammatory and prodegradative phenotype in autologous fibroblast-like synoviocytes by the infrapatellar fat pad from patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol*. 66:2165-2174.
- Fahy, N., E. Farrell, T. Ritter, A.E. Ryan, and J.M. Murphy (2015). Immune modulation to improve tissue engineering outcomes for cartilage repair in the osteoarthritic joint. *Tissue Eng Part B Rev*. 21:55-66.

- Fan, Z., H. Yang, B. Bau, S. Soder, and T. Aigner (2006). Role of mitogen-activated protein kinases and NFkappaB on IL-1beta-induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. *Rheumatol Int.* 26:900-903.
- Farahat, M.N., G. Yanni, R. Poston, and G.S. Panayi (1993). Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 52:870-875.
- Feghali, K., and D. Grenier (2012). Priming effect of fibronectin fragments on the macrophage inflammatory response: potential contribution to periodontitis. *Inflammation.* 35:1696-1705.
- Fekete, E.M., and E.P. Zorrilla (2007). Physiology, pharmacology, and therapeutic relevance of urocortins in mammals: ancient CRF paralogs. *Front Neuroendocrinol.* 28:1-27.
- Felson, D.T. (2006). Clinical practice. Osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med.* 354:841-848.
- Fernandes, J.C., J. Martel-Pelletier, V. Lascau-Coman, F. Moldovan, D. Jovanovic, J.P. Raynaud, and J.P. Pelletier (1998). Collagenase-1 and collagenase-3 synthesis in normal and early experimental osteoarthritic canine cartilage: an immunohistochemical study. *J Rheumatol.* 25:1585-1594.
- Fernandez-Martinez, A.B., A.M. Bajo, M. Isabel Arenas, M. Sanchez-Chapado, J.C. Prieto, and M.J. Carmena (2010). Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces malignant transformation of the human prostate epithelial cell line RWPE-1. *Cancer Lett.* 299:11-21.
- Fife, M.S., S.A. Fisher, S. John, J. Worthington, C.J. Shah, W.E. Ollier, G.S. Panayi, C.M. Lewis, and J.S. Lanchbury (2000). Multipoint linkage analysis of a candidate gene locus in rheumatoid arthritis demonstrates significant evidence of linkage and association with the corticotropin-releasing hormone genomic region. *Arthritis Rheum.* 43:1673-1678.
- Filizola, M., M. Carteni-Farina, and J.J. Perez (1997). Conformational study of vasoactive intestinal peptide by computational methods. *J Pept Res.* 50:55-64.
- Firestein, G.S. (2003). Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 423:356-361.
- Forsyth, C.B., J. Pulai, and R.F. Loeser (2002). Fibronectin fragments and blocking antibodies to alpha2beta1 and alpha5beta1 integrins stimulate mitogen-activated protein kinase signaling and increase collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) production by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 46:2368-2376.
- Fosang, A.J., and C.B. Little (2008). Drug insight: aggrecanases as therapeutic targets for osteoarthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 4:420-427.
- Fosang, A.J., F.M. Rogerson, C.J. East, and H. Stanton (2008). ADAMTS-5: the story so far. *Eur Cell Mater.* 15:11-26.
- Fosang, A.J., and F.M. Rogerson (2010). Identifying the human aggrecanase. *Osteoarthritis Cartilage.* 18:1109-1116.
- Frank, S., M.A. Peters, C. Wehmeyer, S. Strietholt, C. Koers-Wunrau, J. Bertrand, M. Heitzmann, A. Hillmann, J. Sherwood, C. Seyfert, S. Gay, and T. Pap (2013). Regulation of matrixmetalloproteinase-3 and matrixmetalloproteinase-13 by SUMO-2/3 through the transcription factor NF-kappaB. *Ann Rheum Dis.* 72:1874-1881.
- Fuchs, S., A. Skwara, M. Bloch, and B. Dankbar (2004). Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage.* 12:409-418.

- Fujita, T., Y. Azuma, R. Fukuyama, Y. Hattori, C. Yoshida, M. Koida, K. Ogita, and T. Komori (2004). Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with PI3K-Akt signaling. *J Cell Biol.* 166:85-95.
- Fukudo, S. (2007). Role of corticotropin-releasing hormone in irritable bowel syndrome and intestinal inflammation. *J Gastroenterol.* 42 Suppl 17:48-51.
- Funck-Brentano, T., and M. Cohen-Solal (2011). Crosstalk between cartilage and bone: when bone cytokines matter. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22:91-97.
- Furness, S.G., D. Wootten, A. Christopoulos, and P.M. Sexton (2012). Consequences of splice variation on Secretin family G protein-coupled receptor function. *Br J Pharmacol.* 166:98-109.
- Gaur, T., C.J. Lengner, H. Hovhannisyan, R.A. Bhat, P.V. Bodine, B.S. Komm, A. Javed, A.J. van Wijnen, J.L. Stein, G.S. Stein, and J.B. Lian (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem.* 280:33132-33140.
- Gendron, C., M. Kashiwagi, N.H. Lim, J.J. Enghild, I.B. Thogersen, C. Hughes, B. Caterson, and H. Nagase (2007). Proteolytic activities of human ADAMTS-5: comparative studies with ADAMTS-4. *J Biol Chem.* 282:18294-18306.
- Geyer, M., S. Grassel, R.H. Straub, G. Schett, R. Dinser, J. Grifka, S. Gay, E. Neumann, and U. Muller-Ladner (2009). Differential transcriptome analysis of intraarticular lesional vs intact cartilage reveals new candidate genes in osteoarthritis pathophysiology. *Osteoarthritis Cartilage.* 17:328-335.
- Ghosh, A.K., and D.E. Vaughan (2012). PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol.* 227:493-507.
- Gilligan, P.J., and Y.W. Li (2004). Corticotropin-releasing factor antagonists: recent advances and exciting prospects for the treatment of human diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 7:487-497.
- Gobeil, F., A. Fortier, T. Zhu, M. Bossolasco, M. Leduc, M. Grandbois, N. Heveker, G. Bkaily, S. Chemtob, and D. Barbaz (2006). G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm. *Can J Physiol Pharmacol.* 84:287-297.
- Gobezie, R., A. Kho, B. Krastins, D.A. Sarracino, T.S. Thornhill, M. Chase, P.J. Millett, and D.M. Lee (2007). High abundance synovial fluid proteome: distinct profiles in health and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 9:R36.
- Goldring, M.B. (1999). The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res.* 40:1-11.
- Goldring, M.B., and S.R. Goldring (2007). Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 213:626-634.
- Goldring, M.B., M. Otero, K. Tsuchimochi, K. Ijiri, and Y. Li (2008). Defining the roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism. *Ann Rheum Dis.* 67 Suppl 3:iii75-82.
- Goldring, M.B., and K.B. Marcu (2009). Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 11:224.
- Goldring, M.B., and M. Otero (2011). Inflammation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 23:471-478.
- Goldring, M.B., M. Otero, D.A. Plumb, C. Dragomir, M. Favero, K. El Hachem, K. Hashimoto, H.I. Roach, E. Olivotto, R.M. Borzi, and K.B. Marcu (2011). Roles of inflammatory and

- anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis. *Eur Cell Mater.* 21:202-220.
- Gomariz, R.P., M.J. Lorenzo, L. Cacicedo, A. Vicente, and A.G. Zapata (1990). Demonstration of immunoreactive vasoactive intestinal peptide (IR-VIP) and somatostatin (IR-SOM) in rat thymus. *Brain Behav Immun.* 4:151-161.
- Gomariz, R.P., C. Martinez, C. Abad, J. Leceta, and M. Delgado (2001). Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Des.* 7:89-111.
- Gomariz, R.P., Y. Juarranz, C. Abad, A. Arranz, J. Leceta, and C. Martinez (2006). VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1070:51-74.
- Gomariz, R.P., I. Gutierrez-Canas, A. Arranz, M. Carrion, Y. Juarranz, J. Leceta, and C. Martinez (2010). Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics. *Curr Pharm Des.* 16:1063-1080.
- Gomez, R., A. Villalvilla, R. Largo, O. Gualillo, and G. Herrero-Beaumont (2015). TLR4 signalling in osteoarthritis--finding targets for candidate DMOADs. *Nat Rev Rheumatol.* 11:159-170.
- Gonzalez-Alvaro, I., A.M. Ortiz, I.V. Seoane, R. Garcia-Vicuna, C. Martinez, and R.P. Gomariz (2015). Biomarkers predicting a need for intensive treatment in patients with early arthritis. *Curr Pharm Des.* 21:170-181.
- Gozes, I., M. Bodner, Y. Shani, and M. Fridkin (1986). Structure and expression of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene in a human tumor. *Peptides.* 7 Suppl 1:1-6.
- Gozes, I., A. Bardea, A. Reshef, R. Zamostiano, S. Zhukovsky, S. Rubinraut, M. Fridkin, and D.E. Brenneman (1996). Neuroprotective strategy for Alzheimer disease: intranasal administration of a fatty neuropeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:427-432.
- Gozes, I., I. Divinsky, I. Pilzer, M. Fridkin, D.E. Brenneman, and A.D. Spier (2003). From vasoactive intestinal peptide (VIP) through activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) to NAP: a view of neuroprotection and cell division. *J Mol Neurosci.* 20:315-322.
- Grammatopoulos, D.K., and G.P. Chrousos (2002). Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab.* 13:436-444.
- Guo, D., L. Ding, and G.A. Homandberg (2009). Telopeptides of type II collagen upregulate proteinases and damage cartilage but are less effective than highly active fibronectin fragments. *Inflamm Res.* 58:161-169.
- Guo, X., T.F. Day, X. Jiang, L. Garrett-Beal, L. Topol, and Y. Yang (2004). Wnt/beta-catenin signaling is sufficient and necessary for synovial joint formation. *Genes Dev.* 18:2404-2417.
- Gutierrez-Canas, I., M.G. Juarranz, B. Collado, N. Rodriguez-Henche, A. Chiloeches, J.C. Prieto, and M.J. Carmena (2005). Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. *Prostate.* 63:44-55.
- Gutierrez-Canas, I., Y. Juarranz, B. Santiago, A. Arranz, C. Martinez, M. Galindo, M. Paya, R.P. Gomariz, and J.L. Pablos (2006). VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford).* 45:527-532.

- Gyetko, M.R., S.B. Shollenberger, and R.G. Sitrin (1992). Urokinase expression in mononuclear phagocytes: cytokine-specific modulation by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Leukoc Biol.* 51:256-263.
- Gysling, K., M.I. Forray, P. Haeger, C. Daza, and R. Rojas (2004). Corticotropin-releasing hormone and urocortin: redundant or distinctive functions? *Brain Res Brain Res Rev.* 47:116-125.
- Hagen, B.M., O. Bayguinov, and K.M. Sanders (2006). VIP and PACAP regulate localized Ca<sup>2+</sup> transients via cAMP-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291:C375-385.
- Hahm, S.H., and L.E. Eiden (1996). Tissue-specific expression of the vasoactive intestinal peptide gene requires both an upstream tissue specifier element and the 5' proximal cyclic AMP-responsive element. *J Neurochem.* 67:1872-1881.
- Hahm, S.H., and L.E. Eiden (1998a). Cis-regulatory elements controlling basal and inducible VIP gene transcription. *Ann N Y Acad Sci.* 865:10-26.
- Hahm, S.H., and L.E. Eiden (1998b). Five discrete cis-active domains direct cell type-specific transcription of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene. *J Biol Chem.* 273:17086-17094.
- Hamilton, J.A., D.S. Piccoli, T. Leizer, D.M. Butler, M. Croatto, and A.K. Royston (1991). Transforming growth factor beta stimulates urokinase-type plasminogen activator and DNA synthesis, but not prostaglandin E2 production, in human synovial fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:7180-7184.
- Hamilton, J.A., I.K. Campbell, J. Wojta, and D. Cheung (1992). Plasminogen activators and their inhibitors in arthritic disease. *Ann N Y Acad Sci.* 667:87-100.
- Han, Z., D.L. Boyle, L. Chang, B. Bennett, M. Karin, L. Yang, A.M. Manning, and G.S. Firestein (2001). c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 108:73-81.
- Hartney, J.M., C.E. Gustafson, R.P. Bowler, R. Pelanda, and R.M. Torres (2011). Thromboxane receptor signaling is required for fibronectin-induced matrix metalloproteinase 9 production by human and murine macrophages and is attenuated by the Arhgef1 molecule. *J Biol Chem.* 286:44521-44531.
- Haseeb, A., and T.M. Haqqi (2013). Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Immunol.* 146:185-196.
- Hauger, R.L., V. Risbrough, R.H. Oakley, J.A. Olivares-Reyes, and F.M. Dautzenberg (2009). Role of CRF receptor signaling in stress vulnerability, anxiety, and depression. *Ann N Y Acad Sci.* 1179:120-143.
- Haywood, L., D.F. McWilliams, C.I. Pearson, S.E. Gill, A. Ganesan, D. Wilson, and D.A. Walsh (2003). Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 48:2173-2177.
- Hochberg, M.C. (2010). Structure-modifying effects of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: an updated meta-analysis of randomized placebo-controlled trials of 2-year duration. *Osteoarthritis Cartilage.* 18 Suppl 1:S28-31.
- Homandberg, G.A., R. Meyers, and D.L. Xie (1992). Fibronectin fragments cause chondrolysis of bovine articular cartilage slices in culture. *J Biol Chem.* 267:3597-3604.
- Homandberg, G.A., and F. Hui (1996). Association of proteoglycan degradation with catabolic cytokine and stromelysin release from cartilage cultured with fibronectin fragments. *Arch Biochem Biophys.* 334:325-331.

- Homandberg, G.A., F. Hui, and C. Wen (1996a). Fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis. I. Suppression by anti-oxidants. *Biochim Biophys Acta*. 1317:134-142.
- Homandberg, G.A., F. Hui, and C. Wen (1996b). Fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis. II. Reparative effects of anti-oxidants. *Biochim Biophys Acta*. 1317:143-148.
- Homandberg, G.A., and C. Wen (1998). Exposure of cartilage to a fibronectin fragment amplifies catabolic processes while also enhancing anabolic processes to limit damage. *J Orthop Res*. 16:237-246.
- Homandberg, G.A., C. Wen, and F. Hui (1998). Cartilage damaging activities of fibronectin fragments derived from cartilage and synovial fluid. *Osteoarthritis Cartilage*. 6:231-244.
- Homandberg, G.A., V. Costa, V. Ummadi, and R. Pichika (2002a). Antisense oligonucleotides to the integrin receptor subunit alpha(5) decrease fibronectin fragment mediated cartilage chondrolysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 10:381-393.
- Homandberg, G.A., V. Costa, and C. Wen (2002b). Fibronectin fragments active in chondrocytic chondrolysis can be chemically cross-linked to the alpha5 integrin receptor subunit. *Osteoarthritis and Cartilage*. 10:938-949.
- Honorati, M.C., M. Bovara, L. Cattini, A. Piacentini, and A. Facchini (2002). Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 10:799-807.
- Hopwood, B., A. Tsykin, D.M. Findlay, and N.L. Fazzalari (2007). Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling. *Arthritis Res Ther*. 9:R100.
- Hovhannisyan, H., Y. Zhang, M.Q. Hassan, H. Wu, C. Glackin, J.B. Lian, J.L. Stein, M. Montecino, G.S. Stein, and A.J. van Wijnen (2013). Genomic occupancy of HLH, AP1 and Runx2 motifs within a nuclease sensitive site of the Runx2 gene. *J Cell Physiol*. 228:313-321.
- Hsueh, M.F., P. Onnerfjord, and V.B. Kraus (2014). Biomarkers and proteomic analysis of osteoarthritis. *Matrix Biol*. 39:56-66.
- Huai, Q., A.P. Mazar, A. Kuo, G.C. Parry, D.E. Shaw, J. Callahan, Y. Li, C. Yuan, C. Bian, L. Chen, B. Furie, B.C. Furie, D.B. Cines, and M. Huang (2006). Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor. *Science*. 311:656-659.
- Huang, K., and L.D. Wu (2008). Aggrecanase and aggrecan degradation in osteoarthritis: a review. *J Int Med Res*. 36:1149-1160.
- Huang, Q.Q., R. Sobkoviak, A.R. Jockheck-Clark, B. Shi, A.M. Mandelin, 2nd, P.P. Tak, G.K. Haines, 3rd, C.V. Nicchitta, and R.M. Pope (2009). Heat shock protein 96 is elevated in rheumatoid arthritis and activates macrophages primarily via TLR2 signaling. *J Immunol*. 182:4965-4973.
- Huang, W., S. Yang, J. Shao, and Y.P. Li (2007). Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*. 12:3068-3092.
- Huang, Y.F., J.J. Lin, C.H. Lin, Y. Su, and S.C. Hung (2012). c-Jun N-terminal kinase 1 negatively regulates osteoblastic differentiation induced by BMP2 via phosphorylation of Runx2 at Ser104. *J Bone Miner Res*. 27:1093-1105.
- Hughes, C.E., B. Caterson, A.J. Fosang, P.J. Roughley, and J.S. Mort (1995). Monoclonal antibodies that specifically recognize neopeptide sequences generated by

- 'aggrecanase' and matrix metalloproteinase cleavage of aggrecan: application to catabolism in situ and in vitro. *Biochem J.* 305 ( Pt 3):799-804.
- Hunter, D.J., J.J. McDougall, and F.J. Keefe (2008). The symptoms of osteoarthritis and the genesis of pain. *Rheum Dis Clin North Am.* 34:623-643.
- Hwang, H.S., S.J. Park, E.J. Cheon, M.H. Lee, and H.A. Kim (2015). Fibronectin fragment-induced expression of matrix metalloproteinases is mediated by MyD88-dependent TLR-2 signaling pathway in human chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy.* 17.
- Hwang, S.Y., J.Y. Kim, K.W. Kim, M.K. Park, Y. Moon, W.U. Kim, and H.Y. Kim (2004). IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis Res Ther.* 6:R120-128.
- Imada, K., N. Lin, C. Liu, A. Lu, W. Chen, M. Yano, T. Sato, and A. Ito (2008). Nobiletin, a citrus polymethoxy flavonoid, suppresses gene expression and production of aggrecanases-1 and -2 in collagen-induced arthritic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 373:181-185.
- Imada, K., H. Oka, D. Kawasaki, N. Miura, T. Sato, and A. Ito (2010). Anti-arthritic action mechanisms of natural chondroitin sulfate in human articular chondrocytes and synovial fibroblasts. *Biol Pharm Bull.* 33:410-414.
- Imai, K., M. Morikawa, J. D'Armiento, H. Matsumoto, K. Komiya, and Y. Okada (2006). Differential expression of WNTs and FRPs in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 345:1615-1620.
- Intekhab-Alam, N.Y., O.B. White, S.J. Getting, A. Petsa, R.A. Knight, H.S. Chowdrey, P.A. Townsend, K.M. Lawrence, and I.C. Locke (2013). Urocortin protects chondrocytes from NO-induced apoptosis: a future therapy for osteoarthritis? *Cell Death Dis.* 4:e717.
- Inzucchi, S.E., and D.K. McGuire (2008). New drugs for the treatment of diabetes: part II: Incretin-based therapy and beyond. *Circulation.* 117:574-584.
- Ishii, H., H. Tanaka, K. Katoh, H. Nakamura, M. Nagashima, and S. Yoshino (2002). Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 10:277-281.
- Ito, A., Y. Itoh, Y. Sasaguri, M. Morimatsu, and Y. Mori (1992). Effects of interleukin-6 on the metabolism of connective tissue components in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 35:1197-1201.
- Jackson, M.T., B. Moradi, M.M. Smith, C.J. Jackson, and C.B. Little (2014). Activation of matrix metalloproteinases 2, 9, and 13 by activated protein C in human osteoarthritic cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheumatol.* 66:1525-1536.
- Jeong, J.W., H.H. Lee, E.O. Choi, K.W. Lee, K.Y. Kim, S.G. Kim, S.H. Hong, G.Y. Kim, C. Park, H.K. Kim, Y.W. Choi, and Y.H. Choi (2015a). Schisandrae Fructus Inhibits IL-1beta-Induced Matrix Metalloproteinases and Inflammatory Mediators Production in SW1353 Human Chondrocytes by Suppressing NF-kappaB and MAPK Activation. *Drug Dev Res.* 76:474-483.
- Jeong, J.W., H.H. Lee, K.W. Lee, K.Y. Kim, S.G. Kim, S.H. Hong, G.Y. Kim, C. Park, H.K. Kim, Y.W. Choi, and Y.H. Choi (2015b). Mori folium inhibits interleukin-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases and inflammatory mediators by suppressing the activation of NF-kappaB and p38 MAPK in SW1353 human chondrocytes. *Int J Mol Med.*
- Jeppesen, P.B. (2006). Glucagon-like peptide-2: update of the recent clinical trials. *Gastroenterology.* 130:S127-131.

- Ji, Q., X. Xu, Y. Xu, Z. Fan, L. Kang, L. Li, Y. Liang, J. Guo, T. Hong, Z. Li, Q. Zhang, Q. Ye, and Y. Wang (2016). miR-105/Runx2 axis mediates FGF2-induced ADAMTS expression in osteoarthritis cartilage. *J Mol Med (Berl)*.
- Jiang, W., S.G. Gao, X.G. Chen, X.C. Xu, M. Xu, W. Luo, M. Tu, F.J. Zhang, C. Zeng, and G.H. Lei (2012). Expression of synovial fluid and articular cartilage VIP in human osteoarthritic knee: A new indicator of disease severity? *Clin Biochem*. 45:1607-1612.
- Jimeno, R., J. Leceta, C. Martinez, I. Gutierrez-Canas, M. Carrion, S. Perez-Garcia, M. Garin, M. Mellado, R.P. Gomariz, and Y. Juarranz (2014). Vasoactive intestinal peptide maintains the nonpathogenic profile of human th17-polarized cells. *J Mol Neurosci*. 54:512-525.
- Jimeno, R., J. Leceta, M. Garin, A.M. Ortiz, M. Mellado, J.M. Rodriguez-Frade, C. Martinez, S. Perez-Garcia, R.P. Gomariz, and Y. Juarranz (2015). Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect. *J Leukoc Biol*.
- Jin, T., A. Tarkowski, P. Carmeliet, and M. Bokarewa (2003). Urokinase, a constitutive component of the inflamed synovial fluid, induces arthritis. *Arthritis Res Ther*. 5:R9-R17.
- Johnson, G.L., and R. Lapadat (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 298:1911-1912.
- Jones, G.C., and G.P. Riley (2005). ADAMTS proteinases: a multi-domain, multi-functional family with roles in extracellular matrix turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther*. 7:160-169.
- Juarranz, M.G., B. Santiago, M. Torroba, I. Gutierrez-Canas, G. Palao, M. Galindo, C. Abad, C. Martinez, J. Leceta, J.L. Pablos, and R.P. Gomariz (2004). Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)*. 43:416-422.
- Juarranz, Y., C. Abad, C. Martinez, A. Arranz, I. Gutierrez-Canas, F. Rosignoli, R.P. Gomariz, and J. Leceta (2005). Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 7:R1034-1045.
- Juarranz, Y., I. Gutierrez-Canas, B. Santiago, M. Carrion, J.L. Pablos, and R.P. Gomariz (2008). Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 58:1086-1095.
- Juhasz, T., C. Matta, E. Katona, C. Somogyi, R. Takacs, T. Hajdu, S.L. Helgadottir, J. Fodor, L. Csernoch, G. Toth, E. Bako, D. Reglodi, A. Tamas, and R. Zakany (2014). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) signalling enhances osteogenesis in UMR-106 cell line. *J Mol Neurosci*. 54:555-573.
- Juhász, T., S.L. Helgadottir, A. Tamás, D. Reglődi, and R. Zákány (2015). PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides*. 66:51-57.
- Kageyama, K., and T. Suda (2009). Regulatory mechanisms underlying corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamus. *Endocr J*. 56:335-344.
- Kageyama, K., N. Tamasawa, and T. Suda (2011). Signal transduction in the hypothalamic corticotropin-releasing factor system and its clinical implications. *Stress*. 14:357-367.
- Kakurai, M., N. Fujita, S. Murata, Y. Furukawa, T. Demitsu, and H. Nakagawa (2001). Vasoactive intestinal peptide regulates its receptor expression and functions of human

- keratinocytes via type I vasoactive intestinal peptide receptors. *J Invest Dermatol.* 116:743-749.
- Kambayashi, T., C.O. Jacob, D. Zhou, N. Mazurek, M. Fong, and G. Strassmann (1995). Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *J Immunol.* 155:4909-4916.
- Kanwar, J.R., R.M. Samarasinghe, K. Kumar, R. Arya, S. Sharma, S.F. Zhou, S. Sasidharan, and R.K. Kanwar (2015). *Cissus quadrangularis* inhibits IL-1beta induced inflammatory responses on chondrocytes and alleviates bone deterioration in osteotomized rats via p38 MAPK signaling. *Drug Des Devel Ther.* 9:2927-2940.
- Kapoor, M., J. Martel-Pelletier, D. Lajeunesse, J.P. Pelletier, and H. Fahmi (2011). Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 7:33-42.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 270:16483-16486.
- Kashiwagi, M., M. Tortorella, H. Nagase, and K. Brew (2001). TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J Biol Chem.* 276:12501-12504.
- Kashiwagi, M., J.J. Enghild, C. Gendron, C. Hughes, B. Caterson, Y. Itoh, and H. Nagase (2004). Altered proteolytic activities of ADAMTS-4 expressed by C-terminal processing. *J Biol Chem.* 279:10109-10119.
- Kataoka, Y., W. Ariyoshi, T. Okinaga, T. Kaneuji, S. Mitsugi, T. Takahashi, and T. Nishihara (2013). Mechanisms involved in suppression of ADAMTS4 expression in synoviocytes by high molecular weight hyaluronic acid. *Biochem Biophys Res Commun.* 432:580-585.
- Kato, T., S. Miyaki, H. Ishitobi, Y. Nakamura, T. Nakasa, M.K. Lotz, and M. Ochi (2014). Exosomes from IL-1beta stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 16:R163.
- Kelwick, R., I. Desanlis, G.N. Wheeler, and D.R. Edwards (2015). The ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) family. *Genome Biol.* 16:113.
- Kempuraj, D., N.G. Papadopoulou, M. Lytinas, M. Huang, K. Kandere-Grzybowska, B. Madhappan, W. Boucher, S. Christodoulou, A. Athanassiou, and T.C. Theoharides (2004). Corticotropin-releasing hormone and its structurally related urocortin are synthesized and secreted by human mast cells. *Endocrinology.* 145:43-48.
- Kennedy, A., U. Fearon, D.J. Veale, and C. Godson (2011). Macrophages in synovial inflammation. *Front Immunol.* 2:52.
- Kevorkian, L., D.A. Young, C. Darrah, S.T. Donell, L. Shepstone, S. Porter, S.M. Brockbank, D.R. Edwards, A.E. Parker, and I.M. Clark (2004). Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in cartilage. *Arthritis Rheum.* 50:131-141.
- Khattak, M.N., M. Buchfelder, A. Kleindienst, C. Schofl, and N. Kremenevskaja (2010). CRH and SRIF have opposite effects on the Wnt/beta-catenin signalling pathway through PKA/GSK-3beta in corticotroph pituitary cells. *Cancer Invest.* 28:797-805.
- Kikuchi, H., W. Shimada, T. Nonaka, S. Ueshima, and S. Tanaka (1996). Significance of serine proteinase and matrix metalloproteinase systems in the destruction of human articular cartilage. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 23:885-889.

- Kim, K.S., Y.A. Lee, H.M. Choi, M.C. Yoo, and H.I. Yang (2012). Implication of MMP-9 and urokinase plasminogen activator (uPA) in the activation of pro-matrix metalloproteinase (MMP)-13. *Rheumatol Int.* 32:3069-3075.
- Kim, M.J., D.H. Kim, H.K. Na, and Y.J. Surh (2010). TNF-alpha induces expression of urokinase-type plasminogen activator and beta-catenin activation through generation of ROS in human breast epithelial cells. *Biochem Pharmacol.* 80:2092-2100.
- Kim, S.K., M.S. Shin, B.K. Jung, J.Y. Shim, H.S. Won, P.R. Lee, and A. Kim (2006). Effect of dehydroepiandrosterone on lipopolysaccharide-induced interleukin-6 production in DH82 cultured canine macrophage cells. *J Reprod Immunol.* 70:71-81.
- King, B.R., R. Smith, and R.C. Nicholson (2002). Novel glucocorticoid and cAMP interactions on the CRH gene promoter. *Mol Cell Endocrinol.* 194:19-28.
- Kjoller, L., and A. Hall (2001). Rac mediates cytoskeletal rearrangements and increased cell motility induced by urokinase-type plasminogen activator receptor binding to vitronectin. *J Cell Biol.* 152:1145-1157.
- Kobayashi, H., M. Hirata, T. Saito, S. Itoh, U.I. Chung, and H. Kawaguchi (2013). Transcriptional induction of ADAMTS5 by an NF-kappaB family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem.*
- Kobayashi, M., G.R. Squires, A. Mousa, M. Tanzer, D.J. Zukor, J. Antoniou, U. Feige, and A.R. Poole (2005). Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 52:128-135.
- Kohno, M., Y. Kawahito, Y. Tsubouchi, A. Hashiramoto, R. Yamada, K.I. Inoue, Y. Kusaka, T. Kubo, I.J. Elenkov, G.P. Chrousos, M. Kondo, and H. Sano (2001). Urocortin expression in synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: relation to inflammatory activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 86:4344-4352.
- Korkmaz, O.T., N. Tuncel, M. Tuncel, E.M. Oncu, V. Sahinturk, and M. Celik (2010). Vasoactive intestinal peptide (VIP) treatment of Parkinsonian rats increases thalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) levels and alters the release of nerve growth factor (NGF) by mast cells. *J Mol Neurosci.* 41:278-287.
- Koshelnick, Y., M. Ehart, P. Hufnagl, P.C. Heinrich, and B.R. Binder (1997). Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial tumor cell line TCL-598. *J Biol Chem.* 272:28563-28567.
- Koshy, P.J., C.J. Lundy, A.D. Rowan, S. Porter, D.R. Edwards, A. Hogan, I.M. Clark, and T.E. Cawston (2002). The modulation of matrix metalloproteinase and ADAM gene expression in human chondrocytes by interleukin-1 and oncostatin M: a time-course study using real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.* 46:961-967.
- Krabben, A., T.W. Huizinga, and A.H. Mil (2015). Biomarkers for radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des.* 21:147-169.
- Krupnick, J.G., and J.L. Benovic (1998). The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 38:289-319.
- Kuperman, Y., and A. Chen (2008). Urocortins: emerging metabolic and energy homeostasis perspectives. *Trends Endocrinol Metab.* 19:122-129.

- Kwan Tat, S., J.P. Pelletier, N. Amiable, C. Boileau, D. Lajeunesse, N. Duval, and J. Martel-Pelletier (2008a). Activation of the receptor EphB4 by its specific ligand ephrin B2 in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts. *Arthritis Rheum.* 58:3820-3830.
- Kwan Tat, S., J.P. Pelletier, D. Lajeunesse, H. Fahmi, M. Lavigne, and J. Martel-Pelletier (2008b). The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells. *Clin Exp Rheumatol.* 26:295-304.
- Kwan Tat, S., D. Lajeunesse, J.P. Pelletier, and J. Martel-Pelletier (2010). Targeting subchondral bone for treating osteoarthritis: what is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 24:51-70.
- Kyttaris, V.C. (2012). Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs. *Drug Des Devel Ther.* 6:245-250.
- Laburthe, M., and A. Couvineau (2002). Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP. *Regul Pept.* 108:165-173.
- Laburthe, M., A. Couvineau, and J.C. Marie (2002). VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels.* 8:137-153.
- Laburthe, M., A. Couvineau, and V. Tan (2007). Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology. *Peptides.* 28:1631-1639.
- Lai, Y., X. Bai, Y. Zhao, Q. Tian, B. Liu, E.A. Lin, Y. Chen, B. Lee, G.A. CT, F. Beier, X.P. Yu, and C.J. Liu (2014). ADAMTS-7 forms a positive feedback loop with TNF-alpha in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 73:1575-1584.
- Lane, N.E., M.C. Nevitt, L.Y. Lui, P. de Leon, M. Corr, and G. Study of Osteoporotic Fractures Research (2007). Wnt signaling antagonists are potential prognostic biomarkers for the progression of radiographic hip osteoarthritis in elderly Caucasian women. *Arthritis Rheum.* 56:3319-3325.
- Langer, I., N. Gaspard, and P. Robberecht (2006). Pharmacological properties of Chinese hamster ovary cells coexpressing two vasoactive intestinal peptide receptors (hVPAC1 and hVPAC2). *Br J Pharmacol.* 148:1051-1059.
- Langer, I., and P. Robberecht (2007). Molecular mechanisms involved in vasoactive intestinal peptide receptor activation and regulation: current knowledge, similarities to and differences from the A family of G-protein-coupled receptors. *Biochem Soc Trans.* 35:724-728.
- Langer, I. (2012). Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 3:129.
- Lark, M.W., E.K. Bayne, J. Flanagan, C.F. Harper, L.A. Hoerrner, N.I. Hutchinson, Singer, II, S.A. Donatelli, J.R. Weidner, H.R. Williams, R.A. Mumford, and L.S. Lohmander (1997). Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *J Clin Invest.* 100:93-106.
- Le Pechon-Vallee, C., K. Magalon, R. Rasolonjanahary, A. Enjalbert, and C. Gerard (2000). Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides stimulate mitogen-activated protein kinase in the pituitary cell line GH4C1 by a 3',5'-cyclic adenosine monophosphate pathway. *Neuroendocrinology.* 72:46-56.

- Leceta, J., R.P. Gomariz, C. Martinez, M. Carrion, A. Arranz, and Y. Juarranz (2007). Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *Neuroimmunomodulation*. 14:134-138.
- Lee, C.M., J.D. Kisiday, C.W. McIlwraith, A.J. Grodzinsky, and D.D. Frisbie (2013). Synoviocytes protect cartilage from the effects of injury in vitro. *BMC Musculoskelet Disord*. 14:54.
- Lee, J.G., and M. Heur (2014). Interleukin-1beta-induced Wnt5a enhances human corneal endothelial cell migration through regulation of Cdc42 and RhoA. *Mol Cell Biol*. 34:3535-3545.
- Lefevre, S., A. Knedla, C. Tennie, A. Kampmann, C. Wunrau, R. Dinser, A. Korb, E.M. Schnaker, I.H. Tarner, P.D. Robbins, C.H. Evans, H. Sturz, J. Steinmeyer, S. Gay, J. Scholmerich, T. Pap, U. Muller-Ladner, and E. Neumann (2009). Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med*. 15:1414-1420.
- Lester, R.D., M. Jo, V. Montel, S. Takimoto, and S.L. Gonias (2007). uPAR induces epithelial-mesenchymal transition in hypoxic breast cancer cells. *J Cell Biol*. 178:425-436.
- Leu, S.J., and V.K. Singh (1993). Suppression of in vitro antibody production by corticotropin-releasing factor neurohormone. *J Neuroimmunol*. 45:23-29.
- Li, J., A. Ny, G. Leonardsson, K.S. Nandakumar, R. Holmdahl, and T. Ny (2005). The plasminogen activator/plasmin system is essential for development of the joint inflammatory phase of collagen type II-induced arthritis. *Am J Pathol*. 166:783-792.
- Li, J., X. He, W. Wei, and X. Zhou (2015a). MicroRNA-194 promotes osteoblast differentiation via downregulating STAT1. *Biochem Biophys Res Commun*. 460:482-488.
- Li, K., Y. Li, Z. Ma, and J. Zhao (2015b). Crocin exerts anti-inflammatory and anti-catabolic effects on rat intervertebral discs by suppressing the activation of JNK. *Int J Mol Med*. 36:1291-1299.
- Li, W., C. Du, H. Wang, and C. Zhang (2014). Increased serum ADAMTS-4 in knee osteoarthritis: a potential indicator for the diagnosis of osteoarthritis in early stages. *Genet Mol Res*. 13:9642-9649.
- Lin, E.A., and C.J. Liu (2009). The emerging roles of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 matrix metalloproteinases. *Rheumatology Research and Reviews*. 1:121-131.
- Lin, E.A., and C.J. Liu (2010). The role of ADAMTSs in arthritis. *Protein Cell*. 1:33-47.
- Lin, F., W. Zhang, D. Xue, T. Zhu, J. Li, E. Chen, X. Yao, and Z. Pan (2016). Signaling pathways involved in the effects of HMGB1 on mesenchymal stem cell migration and osteoblastic differentiation. *Int J Mol Med*.
- Ling, S.M., D.D. Patel, P. Garnero, M. Zhan, M. Vaduganathan, D. Muller, D. Taub, J.M. Bathon, M. Hochberg, D.R. Abernethy, E.J. Metter, and L. Ferrucci (2009). Serum protein signatures detect early radiographic osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 17:43-48.
- Litherland, G.J., C. Dixon, R.L. Lakey, T. Robson, D. Jones, D.A. Young, T.E. Cawston, and A.D. Rowan (2008). Synergistic collagenase expression and cartilage collagenolysis are phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling-dependent. *J Biol Chem*. 283:14221-14229.
- Little, C.B., A. Barai, D. Burkhardt, S.M. Smith, A.J. Fosang, Z. Werb, M. Shah, and E.W. Thompson (2009). Matrix metalloproteinase 13-deficient mice are resistant to osteoarthritic cartilage erosion but not chondrocyte hypertrophy or osteophyte development. *Arthritis Rheum*. 60:3723-3733.

- Liu-Bryan, R., K. Pritzker, G.S. Firestein, and R. Terkeltaub (2005). TLR2 signaling in chondrocytes drives calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate crystal-induced nitric oxide generation. *J Immunol.* 174:5016-5023.
- Liu-Bryan, R., and R. Terkeltaub (2010). Chondrocyte innate immune myeloid differentiation factor 88-dependent signaling drives procatabolic effects of the endogenous Toll-like receptor 2/Toll-like receptor 4 ligands low molecular weight hyaluronan and high mobility group box chromosomal protein 1 in mice. *Arthritis Rheum.* 62:2004-2012.
- Liu, C.J., W. Kong, K. Ilalov, S. Yu, K. Xu, L. Prazak, M. Fajardo, B. Sehgal, and P.E. Di Cesare (2006a). ADAMTS-7: a metalloproteinase that directly binds to and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *FASEB J.* 20:988-990.
- Liu, C.J., W. Kong, K. Xu, Y. Luan, K. Ilalov, B. Sehgal, S. Yu, R.D. Howell, and P.E. Di Cesare (2006b). ADAMTS-12 associates with and degrades cartilage oligomeric matrix protein. *J Biol Chem.* 281:15800-15808.
- Liu, D., K. Krajniak, D. Chun, M. Sena, R. Casillas, V. Lelievre, T. Nguyen, D. Bravo, S. Colburn, and J.A. Waschek (2001). VIP gene transcription is regulated by far upstream enhancer and repressor elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 284:211-218.
- Liu, G., Y. Yang, S. Yang, S. Banerjee, A. De Freitas, A. Friggeri, K.I. Davis, and E. Abraham (2011). The receptor for urokinase regulates TLR2 mediated inflammatory responses in neutrophils. *PLoS One.* 6:e25843.
- Loeser, R.F. (2006). Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum.* 54:1357-1360.
- Loeser, R.F., S.R. Goldring, C.R. Scanzello, and M.B. Goldring (2012). Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 64:1697-1707.
- Lohmander, L.S., P.J. Neame, and J.D. Sandy (1993). The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 36:1214-1222.
- Lohmander, L.S., T. Saxne, and D.K. Heinegard (1994). Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 53:8-13.
- Long, D.L., J.S. Willey, and R.F. Loeser (2013). Rac1 is required for matrix metalloproteinase-13 production by chondrocytes in response to fibronectin fragments. *Arthritis Rheum.* 65:1561-1568.
- Longpre, J.M., D.R. McCulloch, B.H. Koo, J.P. Alexander, S.S. Apte, and R. Leduc (2009). Characterization of proADAMTS5 processing by proprotein convertases. *Int J Biochem Cell Biol.* 41:1116-1126.
- Lopez-Bergami, P., E. Lau, and Z. Ronai (2010). Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer.* 10:65-76.
- Lotz, M., J. Martel-Pelletier, C. Christiansen, M.L. Brandi, O. Bruyere, R. Chapurlat, J. Collette, C. Cooper, G. Giacobelli, J.A. Kanis, M.A. Karsdal, V. Kraus, W.F. Lems, I. Meulenbelt, J.P. Pelletier, J.P. Raynauld, S. Reiter-Niesert, R. Rizzoli, L.J. Sandell, W.E. Van Spil, and J.Y. Reginster (2013). Value of biomarkers in osteoarthritis: current status and perspectives. *Ann Rheum Dis.* 72:1756-1763.
- Loughlin, J., B. Dowling, K. Chapman, L. Marcelline, Z. Mustafa, L. Southam, A. Ferreira, C. Ciesielski, D.A. Carson, and M. Corr (2004). Functional variants within the secreted

- frizzled-related protein 3 gene are associated with hip osteoarthritis in females. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:9757-9762.
- Lourido, L., V. Calamia, P. Fernandez-Puente, J. Mateos, N. Oreiro, F.J. Blanco, and C. Ruiz-Romero (2015). Secretome analysis of human articular chondrocytes unravels catabolic effects of nicotine on the joint. *Proteomics Clin Appl*.
- Lu, S., X. Xiao, and M. Cheng (2015). Matrine inhibits IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases by suppressing the activation of MAPK and NF-kappaB in human chondrocytes in vitro. *Int J Clin Exp Pathol*. 8:4764-4772.
- Luan, Y., L. Kong, D.R. Howell, K. Ilalov, M. Fajardo, X.H. Bai, P.E. Di Cesare, M.B. Goldring, S.B. Abramson, and C.J. Liu (2008). Inhibition of ADAMTS-7 and ADAMTS-12 degradation of cartilage oligomeric matrix protein by alpha-2-macroglobulin. *Osteoarthritis Cartilage*. 16:1413-1420.
- Lubberts, E. (2010). Th17 cytokines and arthritis. *Semin Immunopathol*. 32:43-53.
- Luyten, F.P., P. Tylzanowski, and R.J. Lories (2009). Wnt signaling and osteoarthritis. *Bone*. 44:522-527.
- Lygren, I., M. Ostensen, P.G. Burhol, and G. Husby (1986). Gastrointestinal peptides in serum and synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis*. 45:637-640.
- Ma, B., C.A. van Blitterswijk, and M. Karperien (2012). A Wnt/beta-catenin negative feedback loop inhibits interleukin-1-induced matrix metalloproteinase expression in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 64:2589-2600.
- Ma, Z., Y. Wang, T. Piao, and J. Liu (2015). Echinocystic Acid Inhibits IL-1beta-Induced COX-2 and iNOS Expression in Human Osteoarthritis Chondrocytes. *Inflammation*.
- Mackay, M., J. Fantes, S. Scherer, S. Boyle, K. West, L.C. Tsui, E. Belloni, E. Lutz, V. Van Heyningen, and A.J. Harmar (1996). Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene: a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype. *Genomics*. 37:345-353.
- Madsen, C.D., G.M. Ferraris, A. Andolfo, O. Cunningham, and N. Sidenius (2007). uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *J Cell Biol*. 177:927-939.
- Mahavadi, S., S. Bhattacharya, J. Kim, S. Fayed, O. Al-Shboul, J.R. Grider, and K.S. Murthy (2013). Caveolae-dependent internalization and homologous desensitization of VIP/PACAP receptor, VPAC(2), in gastrointestinal smooth muscle. *Peptides*. 43:137-145.
- Malfait, A.M., R.Q. Liu, K. Ijiri, S. Komiya, and M.D. Tortorella (2002). Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem*. 277:22201-22208.
- Marcu, K.B., M. Otero, E. Olivotto, R.M. Borzi, and M.B. Goldring (2010). NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets*. 11:599-613.
- Marone, R., V. Cmiljanovic, B. Giese, and M.P. Wymann (2008). Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim Biophys Acta*. 1784:159-185.
- Martel-Pelletier, J., M.P. Faure, R. McCollum, F. Mineau, J.M. Cloutier, and J.P. Pelletier (1991). Plasmin, plasminogen activators and inhibitor in human osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol*. 18:1863-1871.

- Martel-Pelletier, J., R. McCollum, J. DiBattista, M.P. Faure, J.A. Chin, S. Fournier, M. Sarfati, and J.P. Pelletier (1992). The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum.* 35:530-540.
- Martel-Pelletier, J., D.J. Welsch, and J.P. Pelletier (2001). Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 15:805-829.
- Martel-Pelletier, J., and J.P. Pelletier (2010). Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Ekleml Hastalik Cerrahisi.* 21:2-14.
- Martel-Pelletier, J., L.M. Wildi, and J.P. Pelletier (2012). Future therapeutics for osteoarthritis. *Bone.* 51:297-311.
- Martin, J.A., T.D. Brown, A.D. Heiner, and J.A. Buckwalter (2004). Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res:*S96-103.
- Martinez, C., A.M. Ortiz, Y. Juarranz, A. Lamana, I.V. Seoane, J. Leceta, R. Garcia-Vicuna, R.P. Gomariz, and I. Gonzalez-Alvaro (2014). Serum levels of vasoactive intestinal Peptide as a prognostic marker in early arthritis. *PLoS One.* 9:e85248.
- Mazieres, B., B. Bannwarth, M. Dougados, and M. Lequesne (2001). EULAR recommendations for the management of knee osteoarthritis. Report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials. *Joint Bone Spine.* 68:231-240.
- McAlindon, T.E., J.B. Driban, and G.H. Lo (2012). Osteoarthritis year 2011 in review: clinical. *Osteoarthritis Cartilage.* 20:197-200.
- McEvoy, A.N., B. Bresnihan, O. FitzGerald, and E.P. Murphy (2001). Corticotropin-releasing hormone signaling in synovial tissue from patients with early inflammatory arthritis is mediated by the type 1 alpha corticotropin-releasing hormone receptor. *Arthritis Rheum.* 44:1761-1767.
- McEvoy, A.N., B. Bresnihan, O. FitzGerald, and E.P. Murphy (2002). Corticotropin-releasing hormone signaling in synovial tissue vascular endothelium is mediated through the cAMP/CREB pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 966:119-130.
- McEvoy, A.N., B. Bresnihan, O. FitzGerald, and E.P. Murphy (2004). Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 production by corticotropin-releasing hormone contributes to the activated cAMP response element binding protein content in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 50:1132-1145.
- McGillis, J.P., A. Park, P. Rubin-Fletcher, C. Turck, M.F. Dallman, and D.G. Payan (1989). Stimulation of rat B-lymphocyte proliferation by corticotropin-releasing factor. *J Neurosci Res.* 23:346-352.
- Medcalf, R.L., and J.A. Hamilton (1986). Human synovial fibroblasts produce urokinase-type plasminogen activator. *Arthritis Rheum.* 29:1397-1401.
- Melief, J., S.J. de Wit, C.G. van Eden, C. Teunissen, J. Hamann, B.M. Uitdehaag, D. Swaab, and I. Huitinga (2013). HPA axis activity in multiple sclerosis correlates with disease severity, lesion type and gene expression in normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol.* 126:237-249.
- Miao, C.G., C. Huang, Y. Huang, Y.Y. Yang, X. He, L. Zhang, X.W. Lv, Y. Jin, and J. Li (2013). MeCP2 modulates the canonical Wnt pathway activation by targeting SFRP4 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes in rats. *Cell Signal.* 25:598-608.

- Midwood, K., S. Sacre, A.M. Piccinini, J. Inglis, A. Trebault, E. Chan, S. Drexler, N. Sofat, M. Kashiwagi, G. Orend, F. Brennan, and B. Foxwell (2009). Tenascin-C is an endogenous activator of Toll-like receptor 4 that is essential for maintaining inflammation in arthritic joint disease. *Nat Med.* 15:774-780.
- Mimata, Y., A. Kamataki, S. Oikawa, K. Murakami, M. Uzuki, T. Shimamura, and T. Sawai (2012). Interleukin-6 upregulates expression of ADAMTS-4 in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 15:36-44.
- Miossec, P., and J.K. Kolls (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nat Rev Drug Discov.* 11:763-776.
- Mobasheri, A. (2013). The future of osteoarthritis therapeutics: emerging biological therapy. *Curr Rheumatol Rep.* 15:385.
- Moncada-Pazos, A., A.J. Obaya, M. Llamazares, R. Heljasvaara, M.F. Suarez, E. Colado, A. Noel, S. Cal, and C. Lopez-Otin (2012). ADAMTS-12 metalloprotease is necessary for normal inflammatory response. *J Biol Chem.* 287:39554-39563.
- Monfort, J., M. Nacher, E. Montell, J. Vila, J. Verges, and P. Benito (2005). Chondroitin sulfate and hyaluronic acid (500-730 kda) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *Drugs Exp Clin Res.* 31:71-76.
- Monfort, J. (2010). Artrosis: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Médica Panamericana, Madrid, España.
- Moroz, A., F.K. Delella, L.M. Lacorte, E. Deffune, and S.L. Felisbino (2013). Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 430:1319-1321.
- Moss, A.C., P. Anton, T. Savidge, P. Newman, A.S. Cheifetz, J. Gay, S. Paraschos, M.W. Winter, M.P. Moyer, K. Karalis, E. Kokkotou, and C. Pothoulakis (2007). Urocortin II mediates pro-inflammatory effects in human colonocytes via corticotropin-releasing hormone receptor 2alpha. *Gut.* 56:1210-1217.
- Muller-Ladner, U., J. Kriegsmann, B.N. Franklin, S. Matsumoto, T. Geiler, R.E. Gay, and S. Gay (1996). Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol.* 149:1607-1615.
- Murphy, E.P., A. McEvoy, O.M. Conneely, B. Bresnihan, and O. FitzGerald (2001). Involvement of the nuclear orphan receptor NURR1 in the regulation of corticotropin-releasing hormone expression and actions in human inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 44:782-793.
- Murphy, G., V. Knauper, S. Atkinson, G. Butler, W. English, M. Hutton, J. Stracke, and I. Clark (2002). Matrix metalloproteinases in arthritic disease. *Arthritis Res.* 4 Suppl 3:S39-49.
- Murphy, G., and M.H. Lee (2005). What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage? *Ann Rheum Dis.* 64 Suppl 4:iv44-47.
- Murphy, G., and H. Nagase (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med.* 29:290-308.
- Musumeci, G., P. Castrogiovanni, R. Leonardi, F.M. Trovato, M.A. Szychlinska, A. Di Giunta, C. Loreto, and S. Castorina (2014). New perspectives for articular cartilage repair treatment through tissue engineering: A contemporary review. *World J Orthop.* 5:80-88.

- Mutt, V., and S.I. Said (1974). Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. The amino-acid sequence. Use of kallikrein in its determination. *Eur J Biochem.* 42:581-589.
- Nagase, H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 378:151-160.
- Nair, A., V. Kanda, C. Bush-Joseph, N. Verma, S. Chubinskaya, K. Mikecz, T.T. Glant, A.M. Malfait, M.K. Crow, G.T. Spear, A. Finnegan, and C.R. Scanzello (2012). Synovial fluid from patients with early osteoarthritis modulates fibroblast-like synoviocyte responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 2 ligands via soluble CD14. *Arthritis Rheum.* 64:2268-2277.
- Naito, S., T. Shiomi, A. Okada, T. Kimura, M. Chijiwa, Y. Fujita, T. Yatabe, K. Komiya, H. Enomoto, K. Fujikawa, and Y. Okada (2007). Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage. *Pathol Int.* 57:703-711.
- Neidhart, M., N. Hauser, M. Paulsson, P.E. DiCesare, B.A. Michel, and H.J. Hauselmann (1997). Small fragments of cartilage oligomeric matrix protein in synovial fluid and serum as markers for cartilage degradation. *Br J Rheumatol.* 36:1151-1160.
- Nemoto, T., A. Mano, and T. Shibasaki (2013). miR-449a contributes to glucocorticoid-induced CRF-R1 downregulation in the pituitary during stress. *Mol Endocrinol.* 27:1593-1602.
- Ni, X., R.C. Nicholson, B.R. King, E.C. Chan, M.A. Read, and R. Smith (2002). Estrogen represses whereas the estrogen-antagonist ICI 182780 stimulates placental CRH gene expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:3774-3778.
- Nicholson, R.C., B.R. King, and R. Smith (2004). Complex regulatory interactions control CRH gene expression. *Front Biosci.* 9:32-39.
- Ning, B., P. Wang, X. Pei, Y. Kang, J. Song, D. Wang, W. Zhang, and R. Ma (2012). Dual function of beta-catenin in articular cartilage growth and degeneration at different stages of postnatal cartilage development. *Int Orthop.* 36:655-664.
- Noss, E.H., and M.B. Brenner (2008). The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 223:252-270.
- Ohsawa, K., Y. Hayakawa, M. Nishizawa, T. Yamagami, H. Yamamoto, N. Yanaihara, and H. Okamoto (1985). Synergistic stimulation of VIP/PHM-27 gene expression by cyclic AMP and phorbol esters in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 132:885-891.
- Okamoto, H., T.P. Cujec, H. Yamanaka, and N. Kamatani (2008). Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of transcription factors. *FEBS J.* 275:4463-4470.
- Okamura, Y., M. Watari, E.S. Jerud, D.W. Young, S.T. Ishizaka, J. Rose, J.C. Chow, and J.F. Strauss, 3rd (2001). The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem.* 276:10229-10233.
- Olivotto, E., M. Otero, A. Astolfi, D. Platano, A. Facchini, S. Pagani, F. Flamigni, A. Facchini, M.B. Goldring, R.M. Borzi, and K.B. Marcu (2013). IKKalpha/CHUK regulates extracellular matrix remodeling independent of its kinase activity to facilitate articular chondrocyte differentiation. *PLoS One.* 8:e73024.
- Otero, M., D.A. Plumb, K. Tsuchimochi, C.L. Dragomir, K. Hashimoto, H. Peng, E. Olivotto, M. Bevilacqua, L. Tan, Z. Yang, Y. Zhan, P. Oettgen, Y. Li, K.B. Marcu, and M.B. Goldring (2012). E74-like factor 3 (ELF3) impacts on matrix metalloproteinase 13 (MMP13)

- transcriptional control in articular chondrocytes under proinflammatory stress. *J Biol Chem.* 287:3559-3572.
- Ottaviani, E., A. Franchini, and C. Franceschi (1998). Presence of immunoreactive corticotropin-releasing hormone and cortisol molecules in invertebrate haemocytes and lower and higher vertebrate thymus. *Histochem J.* 30:61-67.
- Ou, J., J. Deng, X. Wei, G. Xie, R. Zhou, L. Yu, and H. Liang (2013). Fibronectin extra domain A (EDA) sustains CD133(+)/CD44(+) subpopulation of colorectal cancer cells. *Stem Cell Res.* 11:820-833.
- Oudit, G.Y., H. Sun, B.G. Kerfant, M.A. Crackower, J.M. Penninger, and P.H. Backx (2004). The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol.* 37:449-471.
- Owens, T.W., R.L. Rogers, S.A. Best, A. Ledger, A.M. Mooney, A. Ferguson, P. Shore, A. Swarbrick, C.J. Ormandy, P.T. Simpson, J.S. Carroll, J.E. Visvader, and M.J. Naylor (2014). Runx2 is a novel regulator of mammary epithelial cell fate in development and breast cancer. *Cancer Res.* 74:5277-5286.
- Paladini, F., E. Cocco, A. Cauli, I. Cascino, A. Vacca, F. Belfiore, M.T. Fiorillo, A. Mathieu, and R. Sorrentino (2008). A functional polymorphism of the vasoactive intestinal peptide receptor 1 gene correlates with the presence of HLA-B\*2705 in Sardinia. *Genes Immun.* 9:659-667.
- Paladini, F., N. Porciello, G. Camilli, S. Tuncer, E. Cocco, M.T. Fiorillo, and R. Sorrentino (2014). Single nucleotide polymorphisms in the 3'UTR of VPAC-1 cooperate in modulating gene expression and impact differently on the interaction with miR525-5p. *PLoS One.* 9:e112646.
- Palmer, G., P.A. Guerne, F. Mezin, M. Maret, J. Guicheux, M.B. Goldring, and C. Gabay (2002). Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes. *Arthritis Res.* 4:226-231.
- Pap, T. (2003). New insights into integrin signalling: implications for rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 5:154-155.
- Papathanasiou, I., K.N. Malizos, and A. Tsezou (2012). Bone morphogenetic protein-2-induced Wnt/beta-catenin signaling pathway activation through enhanced low-density-lipoprotein receptor-related protein 5 catabolic activity contributes to hypertrophy in osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy.* 14:R82.
- Pattoli, M.A., J.F. MacMaster, K.R. Gregor, and J.R. Burke (2005). Collagen and aggrecan degradation is blocked in interleukin-1-treated cartilage explants by an inhibitor of I $\kappa$ B kinase through suppression of metalloproteinase expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 315:382-388.
- Patwari, P., S.N. Lin, B. Kurz, A.A. Cole, S. Kumar, and A.J. Grodzinsky (2009). Potent inhibition of cartilage biosynthesis by coincubation with joint capsule through an IL-1-independent pathway. *Scand J Med Sci Sports.* 19:528-535.
- Pawlikowski, M., P. Zelazowski, K. Dohler, and H. Stepien (1988). Effects of two neuropeptides, somatoliberin (GRF) and corticoliberin (CRF), on human lymphocyte natural killer activity. *Brain Behav Immun.* 2:50-56.
- Pei, L. (1996). Identification of a negative glucocorticoid response element in the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene. *J Biol Chem.* 271:20879-20884.

- Pelletier, J.P., P.J. Roughley, J.A. DiBattista, R. McCollum, and J. Martel-Pelletier (1991). Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Semin Arthritis Rheum.* 20:12-25.
- Pelletier, J.P., J. Martel-Pelletier, and S.B. Abramson (2001). Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum.* 44:1237-1247.
- Persson, E., and U.H. Lerner (2011). The neuropeptide VIP regulates the expression of osteoclastogenic factors in osteoblasts. *J Cell Biochem.* 112:3732-3741.
- Petersson, I.F., T. Boegard, B. Svensson, D. Heinegard, and T. Saxne (1998). Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early osteoarthritis of the knee joint. *Br J Rheumatol.* 37:46-50.
- Petkov, V., W. Mosgoeller, R. Ziesche, M. Raderer, L. Stiebellehner, K. Vonbank, G.C. Funk, G. Hamilton, C. Novotny, B. Burian, and L.H. Block (2003). Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest.* 111:1339-1346.
- Pichika, R., and G.A. Homandberg (2004). Fibronectin fragments elevate nitric oxide (NO) and inducible NO synthetase (iNOS) levels in bovine cartilage and iNOS inhibitors block fibronectin fragment mediated damage and promote repair. *Inflamm Res.* 53:405-412.
- Piecha, D., J. Weik, H. Kheil, G. Becher, A. Timmermann, A. Jaworski, M. Burger, and M.W. Hofmann (2010). Novel selective MMP-13 inhibitors reduce collagen degradation in bovine articular and human osteoarthritis cartilage explants. *Inflamm Res.* 59:379-389.
- Pisarchik, A., and A. Slominski (2004). Molecular and functional characterization of novel CRFR1 isoforms from the skin. *Eur J Biochem.* 271:2821-2830.
- Poduval, P., T. Sillat, A. Beklen, V.P. Kouri, I. Virtanen, and Y.T. Konttinen (2007). Type IV collagen alpha-chain composition in synovial lining from trauma patients and patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56:3959-3967.
- Poliak, S., F. Mor, P. Conlon, T. Wong, N. Ling, J. Rivier, W. Vale, and L. Steinman (1997). Stress and autoimmunity: the neuropeptides corticotropin-releasing factor and urocortin suppress encephalomyelitis via effects on both the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the immune system. *J Immunol.* 158:5751-5756.
- Portal-Nunez, S., P. Esbrit, M.J. Alcaraz, and R. Largo (2015). Oxidative stress, autophagy, epigenetic changes and regulation by miRNAs as potential therapeutic targets in osteoarthritis. *Biochem Pharmacol.*
- Porter, S., I.M. Clark, L. Kevorkian, and D.R. Edwards (2005). The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J.* 386:15-27.
- Potter, E., D.P. Behan, W.H. Fischer, E.A. Linton, P.J. Lowry, and W.W. Vale (1991). Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin releasing factor-binding proteins. *Nature.* 349:423-426.
- Prasse, A., G. Zissel, N. Lutzen, J. Schupp, R. Schmiedlin, E. Gonzalez-Rey, A. Rensing-Ehl, G. Bacher, V. Cavalli, D. Bevec, M. Delgado, and J. Muller-Quernheim (2010). Inhaled vasoactive intestinal peptide exerts immunoregulatory effects in sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 182:540-548.
- Pretzel, D., D. Pohlers, S. Weinert, and R.W. Kinne (2009). In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage. *Arthritis Res Ther.* 11:R25.

- Prieto-Potin, I., R. Largo, J.A. Roman-Blas, G. Herrero-Beaumont, and D.A. Walsh (2015). Characterization of multinucleated giant cells in synovium and subchondral bone in knee osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 16:226.
- Pulai, J.I., H. Chen, H.J. Im, S. Kumar, C. Hanning, P.S. Hegde, and R.F. Loeser (2005). NF-kappa B mediates the stimulation of cytokine and chemokine expression by human articular chondrocytes in response to fibronectin fragments. *J Immunol.* 174:5781-5788.
- Quintero, M., J. Monfort, and D.R. Mitrovic (2010). Osteoartrosis: Biología, fisiopatología, clínica y tratamiento. Médica Panamericana, Madrid, España.
- Ralph, J.A., D. Zocco, B. Bresnihan, O. Fitzgerald, A.N. McEvoy, and E.P. Murphy (2007). A role for type 1alpha corticotropin-releasing hormone receptors in mediating local changes in chronically inflamed tissue. *Am J Pathol.* 170:1121-1133.
- Rasheed, Z., N. Akhtar, and T.M. Haqqi (2010). Pomegranate extract inhibits the interleukin-1beta-induced activation of MKK-3, p38alpha-MAPK and transcription factor RUNX-2 in human osteoarthritis chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 12:R195.
- Raymond, M., T. Marchbank, M.P. Moyer, R.J. Playford, I.R. Sanderson, and L. Kruidenier (2012). IL-1beta stimulation of CCD-18co myofibroblasts enhances repair of epithelial monolayers through Wnt-5a. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 303:G1270-1278.
- Rengel, Y., C. Ospelt, and S. Gay (2007). Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. *Arthritis Res Ther.* 9:221.
- Revell, P.A., N. al-Saffar, S. Fish, and D. Osei (1995). Extracellular matrix of the synovial intimal cell layer. *Ann Rheum Dis.* 54:404-407.
- Rinaldi, N., M. Schwarz-Eywill, D. Weis, P. Leppelmann-Jansen, M. Lukoschek, U. Keilholz, and T.F. Barth (1997). Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis in vitro correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins. *Ann Rheum Dis.* 56:45-51.
- Ritchlin, C. (2000). Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Res.* 2:356-360.
- Roach, H.I., N. Yamada, K.S. Cheung, S. Tilley, N.M. Clarke, R.O. Oreffo, S. Kokubun, and F. Bronner (2005). Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum.* 52:3110-3124.
- Rollin, R., F. Marco, J.A. Jover, J.A. Garcia-Asenjo, L. Rodriguez, L. Lopez-Duran, and B. Fernandez-Gutierrez (2008). Early lymphocyte activation in the synovial microenvironment in patients with osteoarthritis: comparison with rheumatoid arthritis patients and healthy controls. *Rheumatol Int.* 28:757-764.
- Roman-Blas, J.A., and S.A. Jimenez (2006). NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 14:839-848.
- Runday, H.K., H.H. Smits, G.N. Van Muijen, M.S. Pruszczynski, R.J. Dolhain, E.J. Van Langelaan, F.C. Breedveld, and J.H. Verheijen (1996). Difference in expression of the plasminogen activation system in synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol.* 35:416-423.
- Rosenberg, K., H. Olsson, M. Morgelin, and D. Heinegard (1998). Cartilage oligomeric matrix protein shows high affinity zinc-dependent interaction with triple helical collagen. *J Biol Chem.* 273:20397-20403.

- Rosengren, S., M. Corr, and D.L. Boyle (2010). Platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta synergistically potentiate inflammatory mediator synthesis by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Res Ther.* 12:R65.
- Rosignoli, F., M. Torroba, Y. Juarranz, M. Garcia-Gomez, C. Martinez, R.P. Gomariz, C. Perez-Leiros, and J. Leceta (2006). VIP and tolerance induction in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 1070:525-530.
- Sachs, A., and E. Wahle (1993). Poly(A) tail metabolism and function in eucaryotes. *J Biol Chem.* 268:22955-22958.
- Sadouk, M.B., J.P. Pelletier, G. Tardif, K. Kiansa, J.M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier (1995). Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor. *Lab Invest.* 73:347-355.
- Saha, N., F. Moldovan, G. Tardif, J.P. Pelletier, J.M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier (1999). Interleukin-1beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. *Arthritis Rheum.* 42:1577-1587.
- Said, S.I., and V. Mutt (1969). A peptide fraction from lung tissue with prolonged peripheral vasodilator activity. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 107:51-56.
- Saito, T., K. Nishida, T. Furumatsu, A. Yoshida, M. Ozawa, and T. Ozaki (2013). Histone deacetylase inhibitors suppress mechanical stress-induced expression of RUNX-2 and ADAMTS-5 through the inhibition of the MAPK signaling pathway in cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 21:165-174.
- Sandell, L.J. (2008). Metabolism of chondrocytes in osteoarthritis: why all this activity? *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 8:307.
- Sandell, L.J., X. Xing, C. Franz, S. Davies, L.W. Chang, and D. Patra (2008). Exuberant expression of chemokine genes by adult human articular chondrocytes in response to IL-1beta. *Osteoarthritis Cartilage.* 16:1560-1571.
- Sandell, L.J. (2012). Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development. *Nat Rev Rheumatol.* 8:77-89.
- Sandy, J.D., D.D. Chan, R.L. Trevino, M.A. Wimmer, and A. Plaas (2015). Human genome-wide expression analysis reorients the study of inflammatory mediators and biomechanics in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 23:1939-1945.
- Sarkissian, M., and R. Lafyatis (1999). Integrin engagement regulates proliferation and collagenase expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol.* 162:1772-1779.
- Sashinami, H., K. Kageyama, T. Suda, and A. Nakane (2005). Urocortin 2 suppresses host resistance to *Listeria monocytogenes* infection via up-regulation of interleukin-10. *Endocrinology.* 146:5003-5011.
- Saxne, T., and D. Heinegard (1992). Cartilage oligomeric matrix protein: a novel marker of cartilage turnover detectable in synovial fluid and blood. *Br J Rheumatol.* 31:583-591.
- Scanzello, C.R., A. Plaas, and M.K. Crow (2008). Innate immune system activation in osteoarthritis: is osteoarthritis a chronic wound? *Curr Opin Rheumatol.* 20:565-572.
- Scanzello, C.R., and S.R. Goldring (2012). The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone.* 51:249-257.

- Scott, D.L., J.P. Delamere, and K.W. Walton (1981). The distribution of fibronectin in the pannus in rheumatoid arthritis. *Br J Exp Pathol*. 62:362-368.
- Schwab, W., G. Schulze-Tanzil, A. Mobasheri, J. Dressler, M. Kotsch, and M. Shakibaei (2004). Interleukin-1beta-induced expression of the urokinase-type plasminogen activator receptor and its co-localization with MMPs in human articular chondrocytes. *Histol Histopathol*. 19:105-112.
- Seitz, M., P. Loetscher, B. Dewald, H. Towbin, M. Ceska, and M. Baggiolini (1994). Production of interleukin-1 receptor antagonist, inflammatory chemotactic proteins, and prostaglandin E by rheumatoid and osteoarthritic synoviocytes--regulation by IFN-gamma and IL-4. *J Immunol*. 152:2060-2065.
- Sellam, J., and F. Berenbaum (2010). The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 6:625-635.
- Sen, M., J. Reifert, K. Lauterbach, V. Wolf, J.S. Rubin, M. Corr, and D.A. Carson (2002). Regulation of fibronectin and metalloproteinase expression by Wnt signaling in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Arthritis Rheum*. 46:2867-2877.
- Seoane, I.V., E. Tomero, C. Martinez, R. Garcia-Vicuna, Y. Juarranz, A. Lamana, E. Ocon, A.M. Ortiz, N. Gomez-Leon, I. Gonzalez-Alvaro, and R.P. Gomariz (2015). Vasoactive Intestinal Peptide in Early Spondyloarthritis: Low Serum Levels as a Potential Biomarker for Disease Severity. *J Mol Neurosci*. 56:577-584.
- Seoane, I.V., A.M. Ortiz, L. Piris, A. Lamana, Y. Juarranz, R. Garcia-Vicuna, I. Gonzalez-Alvaro, R.P. Gomariz, and C. Martinez (2016). Clinical Relevance of VPAC1 Receptor Expression in Early Arthritis: Association with IL-6 and Disease Activity. *PLoS One*. 11:e0149141.
- Serrati, S., F. Margheri, A. Chilla, E. Neumann, U. Muller-Ladner, M. Benucci, G. Fibbi, and M. Del Rosso (2011). Reduction of in vitro invasion and in vivo cartilage degradation in a SCID mouse model by loss of function of the fibrinolytic system of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*. 63:2584-2594.
- Settle, S., L. Vickery, O. Nemirovskiy, T. Vidmar, A. Bendele, D. Messing, P. Ruminiski, M. Schnute, and T. Sunyer (2010). Cartilage degradation biomarkers predict efficacy of a novel, highly selective matrix metalloproteinase 13 inhibitor in a dog model of osteoarthritis: confirmation by multivariate analysis that modulation of type II collagen and aggrecan degradation peptides parallels pathologic changes. *Arthritis Rheum*. 62:3006-3015.
- Shahnazari, M., W. Yao, M. Corr, and N.E. Lane (2008). Targeting the Wnt signaling pathway to augment bone formation. *Curr Osteoporos Rep*. 6:142-148.
- Shetzline, M.A., J.K. Walker, K.J. Valenzano, and R.T. Premont (2002). Vasoactive intestinal polypeptide type-1 receptor regulation. Desensitization, phosphorylation, and sequestration. *J Biol Chem*. 277:25519-25526.
- Shi, Q., F. Vaillancourt, V. Cote, H. Fahmi, P. Lavigne, H. Afif, J.A. Di Battista, J.C. Fernandes, and M. Benderdour (2006). Alterations of metabolic activity in human osteoarthritic osteoblasts by lipid peroxidation end product 4-hydroxynonenal. *Arthritis Res Ther*. 8:R159.
- Shibakawa, A., H. Aoki, K. Masuko-Hongo, T. Kato, M. Tanaka, K. Nishioka, and H. Nakamura (2003). Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character. *Osteoarthritis Cartilage*. 11:133-140.

- Shieh, H.S., K.J. Mathis, J.M. Williams, R.L. Hills, J.F. Wiese, T.E. Benson, J.R. Kiefer, M.H. Marino, J.N. Carroll, J.W. Leone, A.M. Malfait, E.C. Arner, M.D. Tortorella, and A. Tomasselli (2008). High resolution crystal structure of the catalytic domain of ADAMTS-5 (aggrecanase-2). *J Biol Chem.* 283:1501-1507.
- Shiomi, T., V. Lemaitre, J. D'Armiento, and Y. Okada (2010). Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int.* 60:477-496.
- Shiotani, A., M. Takami, K. Itoh, Y. Shibasaki, and T. Sasaki (2002). Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFkB ligand and osteoprotegerin. *Anat Rec.* 268:137-146.
- Shiozawa, S., and K. Tsumiyama (2009). Pathogenesis of rheumatoid arthritis and c-Fos/AP-1. *Cell Cycle.* 8:1539-1543.
- Shiozawa, S., K. Tsumiyama, K. Yoshida, and A. Hashiramoto (2011). Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 59:89-95.
- Shuang, F., S.X. Hou, J.L. Zhu, Y. Liu, Y. Zhou, C.L. Zhang, and J.G. Tang (2015). Establishment of a rat model of lumbar facet joint osteoarthritis using intraarticular injection of urinary plasminogen activator. *Sci Rep.* 5:9828.
- Sieghart, D., M. Liszt, A. Wanivenhaus, H. Broll, H. Kiener, B. Klosch, and G. Steiner (2015). Hydrogen sulphide decreases IL-1beta-induced activation of fibroblast-like synoviocytes from patients with osteoarthritis. *J Cell Mol Med.* 19:187-197.
- Singh, L.K., W. Boucher, X. Pang, R. Letourneau, D. Seretakis, M. Green, and T.C. Theoharides (1999). Potent mast cell degranulation and vascular permeability triggered by urocortin through activation of corticotropin-releasing hormone receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 288:1349-1356.
- Singh, V.K., and S.J. Leu (1993). Corticotropin-releasing factor-induced production of cyclic AMP by human peripheral blood immunocytes. *Immunol Lett.* 35:239-245.
- Slominski, A., A. Pisarchik, D.J. Tobin, J.E. Mazurkiewicz, and J. Wortsman (2004). Differential expression of a cutaneous corticotropin-releasing hormone system. *Endocrinology.* 145:941-950.
- Smith, E.M., T.K. Hughes, P. Cadet, and G.B. Stefano (1992a). Corticotropin-releasing factor-induced immunosuppression in human and invertebrate immunocytes. *Cell Mol Neurobiol.* 12:473-481.
- Smith, E.M., T.K. Hughes, Jr., F. Hashemi, and G.B. Stefano (1992b). Immunosuppressive effects of corticotropin and melanotropin and their possible significance in human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:782-786.
- Smith, E.M. (2008). Neuropeptides as signal molecules in common with leukocytes and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Behav Immun.* 22:3-14.
- Smith, H.W., and C.J. Marshall (2010). Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:23-36.
- Smith, M.D. (2011). The normal synovium. *Open Rheumatol J.* 5:100-106.
- Sohn, D.H., J. Sokolove, O. Sharpe, J.C. Erhart, P.E. Chandra, L.J. Lahey, T.M. Lindstrom, I. Hwang, K.A. Boyer, T.P. Andriacchi, and W.H. Robinson (2012). Plasma proteins present in osteoarthritic synovial fluid can stimulate cytokine production via Toll-like receptor 4. *Arthritis Res Ther.* 14:R7.

- Sokolove, J., and C.M. Lepus (2013). Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 5:77-94.
- Somerville, R.P., J.M. Longpre, E.D. Apel, R.M. Lewis, L.W. Wang, J.R. Sanes, R. Leduc, and S.S. Apte (2004). ADAMTS7B, the full-length product of the ADAMTS7 gene, is a chondroitin sulfate proteoglycan containing a mucin domain. *J Biol Chem.* 279:35159-35175.
- Song, R.H., M.D. Tortorella, A.M. Malfait, J.T. Alston, Z. Yang, E.C. Arner, and D.W. Griggs (2007). Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* 56:575-585.
- Spector, N.H. (1987). Epilogue. *In Neuroimmune interactions Ann. N. Y. Acad. Sci.* 496:750-751.
- Stanton, H., L. Ung, and A.J. Fosang (2002). The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. *Biochem J.* 364:181-190.
- Stanton, H., J. Melrose, C.B. Little, and A.J. Fosang (2011). Proteoglycan degradation by the ADAMTS family of proteinases. *Biochim Biophys Acta.* 1812:1616-1629.
- Stengel, A., and Y. Tache (2009). Neuroendocrine control of the gut during stress: corticotropin-releasing factor signaling pathways in the spotlight. *Annu Rev Physiol.* 71:219-239.
- Stephanou, A., D.S. Jessop, R.A. Knight, and S.L. Lightman (1990). Corticotrophin-releasing factor-like immunoreactivity and mRNA in human leukocytes. *Brain Behav Immun.* 4:67-73.
- Sternberg, E.M. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol.* 6:318-328.
- Strassmann, G., V. Patil-Koota, F. Finkelman, M. Fong, and T. Kambayashi (1994). Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2. *J Exp Med.* 180:2365-2370.
- Straub, R.H., and M. Cutolo (2001). Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum.* 44:493-507.
- Straub, R.H., J.W. Bijlsma, A. Masi, and M. Cutolo (2013). Role of neuroendocrine and neuroimmune mechanisms in chronic inflammatory rheumatic diseases--the 10-year update. *Semin Arthritis Rheum.* 43:392-404.
- Stylianou, E., and J. Saklatvala (1998). Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 30:1075-1079.
- Su, J., J. Yu, T. Ren, W. Zhang, Y. Zhang, X. Liu, T. Sun, H. Lu, K. Miyazawa, and L. Yao (2009). Discoidin domain receptor 2 is associated with the increased expression of matrix metalloproteinase-13 in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *Mol Cell Biochem.* 330:141-152.
- Su, S.L., C.D. Tsai, C.H. Lee, D.M. Salter, and H.S. Lee (2005). Expression and regulation of Toll-like receptor 2 by IL-1beta and fibronectin fragments in human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage.* 13:879-886.
- Subbaramaiah, K., P.A. Cole, and A.J. Dannenberg (2002). Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Res.* 62:2522-2530.

- Sun, W., J. Hong, Y.C. Zang, X. Liu, and J.Z. Zhang (2006). Altered expression of vasoactive intestinal peptide receptors in T lymphocytes and aberrant Th1 immunity in multiple sclerosis. *Int Immunol*. 18:1691-1700.
- Sutton, S., A. Clutterbuck, P. Harris, T. Gent, S. Freeman, N. Foster, R. Barrett-Jolley, and A. Mobasher (2009). The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J*. 179:10-24.
- Suzuki, M., T. Tetsuka, S. Yoshida, N. Watanabe, M. Kobayashi, N. Matsui, and T. Okamoto (2000). The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL-1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett*. 465:23-27.
- Sweeney, S.E., and G.S. Firestein (2004). Signal transduction in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 16:231-237.
- Sylvester, J., M. El Mabrouk, R. Ahmad, A. Chaudry, and M. Zafarullah (2012). Interleukin-1 induction of aggrecanase gene expression in human articular chondrocytes is mediated by mitogen-activated protein kinases. *Cell Physiol Biochem*. 30:563-574.
- Symes, A., S. Lewis, L. Corpus, P. Rajan, S.E. Hyman, and J.S. Fink (1994). STAT proteins participate in the regulation of the vasoactive intestinal peptide gene by the ciliary neurotrophic factor family of cytokines. *Mol Endocrinol*. 8:1750-1763.
- Takagi, T., and H.E. Jasin (1992). Interactions between anticollagen antibodies and chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 35:224-230.
- Takeda, S. (2009). Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol*. 20:146-152.
- Taleisnik, S. (2006). Receptores celulares y la transducción de señales. Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Tang, Y.L., G.Q. Zhu, L. Hu, M. Zheng, J.Y. Zhang, Z.D. Shi, and X.H. Liang (2010). Effects of intra-articular administration of sodium hyaluronate on plasminogen activator system in temporomandibular joints with osteoarthritis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 109:541-547.
- Taylor, K.R., J.M. Trowbridge, J.A. Rudisill, C.C. Termeer, J.C. Simon, and R.L. Gallo (2004). Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem*. 279:17079-17084.
- Tetsunaga, T., K. Nishida, T. Furumatsu, K. Naruse, S. Hirohata, A. Yoshida, T. Saito, and T. Ozaki (2011). Regulation of mechanical stress-induced MMP-13 and ADAMTS-5 expression by RUNX-2 transcriptional factor in SW1353 chondrocyte-like cells. *Osteoarthritis Cartilage*. 19:222-232.
- Theoharides, T.C., L.K. Singh, W. Boucher, X. Pang, R. Letourneau, E. Webster, and G. Chrousos (1998). Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology*. 139:403-413.
- Thirunavukkarasu, K., Y. Pei, T.L. Moore, H. Wang, X.P. Yu, A.G. Geiser, and S. Chandrasekhar (2006). Regulation of the human ADAMTS-4 promoter by transcription factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 345:197-204.
- Thirunavukkarasu, K., Y. Pei, and T. Wei (2007). Characterization of the human ADAMTS-5 (aggrecanase-2) gene promoter. *Mol Biol Rep*. 34:225-231.

- Tobar, N., V. Villar, and J.F. Santibanez (2010). ROS-NFkappaB mediates TGF-beta1-induced expression of urokinase-type plasminogen activator, matrix metalloproteinase-9 and cell invasion. *Mol Cell Biochem.* 340:195-202.
- Tolboom, T.C., E. Pieterman, W.H. van der Laan, R.E. Toes, A.L. Huidekoper, R.G. Nelissen, F.C. Breedveld, and T.W. Huizinga (2002). Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10. *Ann Rheum Dis.* 61:975-980.
- Tornero-Esteban, P., A. Peralta-Sastre, E. Herranz, L. Rodriguez-Rodriguez, A. Mucientes, L. Abasolo, F. Marco, B. Fernandez-Gutierrez, and J.R. Lamas (2015). Altered Expression of Wnt Signaling Pathway Components in Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells in Osteoarthritis Patients. *PLoS One.* 10:e0137170.
- Tremble, P., C.H. Damsky, and Z. Werb (1995). Components of the nuclear signaling cascade that regulate collagenase gene expression in response to integrin-derived signals. *J Cell Biol.* 129:1707-1720.
- Troeberg, L., and H. Nagase (2012). Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta.* 1824:133-145.
- Tsatsanis, C., A. Androulidaki, E. Dermitzaki, I. Charalampopoulos, J. Spiess, A. Gravanis, and A.N. Margioris (2005). Urocortin 1 and Urocortin 2 induce macrophage apoptosis via CRFR2. *FEBS Lett.* 579:4259-4264.
- Tsatsanis, C., A. Androulidaki, T. Alissafi, I. Charalampopoulos, E. Dermitzaki, T. Roger, A. Gravanis, and A.N. Margioris (2006). Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages via activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. *J Immunol.* 176:1869-1877.
- Tsatsanis, C., A. Androulidaki, E. Dermitzaki, A. Gravanis, and A.N. Margioris (2007a). Corticotropin releasing factor receptor 1 (CRF1) and CRF2 agonists exert an anti-inflammatory effect during the early phase of inflammation suppressing LPS-induced TNF-alpha release from macrophages via induction of COX-2 and PGE2. *J Cell Physiol.* 210:774-783.
- Tsatsanis, C., E. Dermitzaki, M. Venihaki, E. Chatzaki, V. Minas, A. Gravanis, and A.N. Margioris (2007b). The corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides as local modulators of adrenal function. *Cell Mol Life Sci.* 64:1638-1655.
- Tsukada, T., S.J. Horovitch, M.R. Montminy, G. Mandel, and R.H. Goodman (1985). Structure of the human vasoactive intestinal polypeptide gene. *DNA.* 4:293-300.
- Tsukada, T., J.S. Fink, G. Mandel, and R.H. Goodman (1987). Identification of a region in the human vasoactive intestinal polypeptide gene responsible for regulation by cyclic AMP. *J Biol Chem.* 262:8743-8747.
- Ullewar, M.P., and S.N. Umathe (2015). A possible role of endogenous central corticotrophin releasing factor in lipopolysaccharide induced thymic involution and cell apoptosis: effect of peripheral injection of corticotrophin releasing factor. *J Neuroimmunol.* 280:58-65.
- Urano, T., M. Shiraki, K. Narusawa, T. Usui, N. Sasaki, T. Hosoi, Y. Ouchi, T. Nakamura, and S. Inoue (2007). Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *Spine (Phila Pa 1976).* 32:25-29.

- Usdin, T.B., T.I. Bonner, and E. Mezey (1994). Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology*. 135:2662-2680.
- Uzuki, M., H. Sasano, Y. Muramatsu, K. Totsune, K. Takahashi, Y. Oki, K. Iino, and T. Sawai (2001). Urocortin in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Sci (Lond)*. 100:577-589.
- Vacas, E., M.I. Arenas, L. Munoz-Moreno, A.M. Bajo, M. Sanchez-Chapado, J.C. Prieto, and M.J. Carmena (2013a). Antitumoral effects of vasoactive intestinal peptide in human renal cell carcinoma xenografts in athymic nude mice. *Cancer Lett*. 336:196-203.
- Vacas, E., A.M. Bajo, A.V. Schally, M. Sanchez-Chapado, J.C. Prieto, and M.J. Carmena (2013b). Vasoactive intestinal peptide induces oxidative stress and suppresses metastatic potential in human clear cell renal cell carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*. 365:212-222.
- Vaillancourt, F., B. Morquette, Q. Shi, H. Fahmi, P. Lavigne, J.A. Di Battista, J.C. Fernandes, and M. Benderdour (2007). Differential regulation of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase by 4-hydroxynonenal in human osteoarthritic chondrocytes through ATF-2/CREB-1 transactivation and concomitant inhibition of NF-kappaB signaling cascade. *J Cell Biochem*. 100:1217-1231.
- Valdehita, A., A.M. Bajo, A.B. Fernandez-Martinez, M.I. Arenas, E. Vacas, P. Valenzuela, A. Ruiz-Villaespesa, J.C. Prieto, and M.J. Carmena (2010). Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer. *Peptides*. 31:2035-2045.
- Valdes, A.M., J. Loughlin, M.V. Oene, K. Chapman, G.L. Surdulescu, M. Doherty, and T.D. Spector (2007). Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum*. 56:137-146.
- Vale, W., J. Spiess, C. Rivier, and J. Rivier (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 213:1394-1397.
- van den Bosch, M.H., A.B. Blom, A.W. Sloetjes, M.I. Koenders, F.A. van de Loo, W.B. van den Berg, P.L. van Lent, and P.M. van der Kraan (2015). Induction of Canonical Wnt Signaling by Synovial Overexpression of Selected Wnts Leads to Protease Activity and Early Osteoarthritis-Like Cartilage Damage. *Am J Pathol*. 185:1970-1980.
- van der Kraan, P.M., and W.B. van den Berg (2007). Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage*. 15:237-244.
- van der Kraan, P.M., and W.B. van den Berg (2012). Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthritis Cartilage*. 20:223-232.
- van Lent, P.L., A.B. Blom, R.F. Schelbergen, A. Sloetjes, F.P. Lafeber, W.F. Lems, H. Cats, T. Vogl, J. Roth, and W.B. van den Berg (2012). Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 64:1466-1476.
- van Zoelen, M.A., H. Yang, S. Florquin, J.C. Meijers, S. Akira, B. Arnold, P.P. Nawroth, A. Bierhaus, K.J. Tracey, and T. van der Poll (2009). Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. *Shock*. 31:280-284.

- Vandooren, J., P.E. Van den Steen, and G. Opdenakker (2013). Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): The next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 48:222-272.
- Van Kemmelbeke, M.N., I. Holen, A.G. Wilson, M.Z. Ilic, C.J. Handley, G.S. Kelner, M. Clark, C. Liu, R.A. Maki, D. Burnett, and D.J. Buttle (2001). Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium. *Eur J Biochem.* 268:1259-1268.
- Vial, E., E. Sahai, and C.J. Marshall (2003). ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell.* 4:67-79.
- Vidal Gómez, J. (2006). *Psiconeuroinmunología. Publicacions i Edicions de la Universitat de Barcelona, Barcelona, España.*
- Vimalraj, S., B. Arumugam, P.J. Miranda, and N. Selvamurugan (2015). Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int J Biol Macromol.* 78:202-208.
- Vu, T.H., and Z. Werb (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 14:2123-2133.
- Wang, L., Z. Liu, Y. Li, L. Pappan, A. Galliher-Beckley, and J. Shi (2012). Pro-inflammatory cytokine interleukin-1beta promotes the development of intestinal stem cells. *Inflamm Res.* 61:1085-1092.
- Wang, M., E.R. Sampson, H. Jin, J. Li, Q.H. Ke, H.J. Im, and D. Chen (2013). MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 15:R5.
- Wang, P., M. Tortorella, K. England, A.M. Malfait, G. Thomas, E.C. Arner, and D. Pei (2004). Proprotein convertase furin interacts with and cleaves pro-ADAMTS4 (Aggrecanase-1) in the trans-Golgi network. *J Biol Chem.* 279:15434-15440.
- Wang, Y.D., L. Wang, D.J. Li, and W.J. Wang (2006). Dehydroepiandrosterone inhibited the bone resorption through the upregulation of OPG/RANKL. *Cell Mol Immunol.* 3:41-45.
- Wang, Z., W.C. Hutton, and S.T. Yoon (2014). Bone morphogenetic protein-7 antagonizes tumor necrosis factor-alpha-induced activation of nuclear factor kappaB and up-regulation of the ADAMTS, leading to decreased degradation of disc matrix macromolecules aggrecan and collagen II. *Spine J.* 14:505-512.
- Wei, J., B. Richbrough, T. Jia, and C. Liu (2014). ADAMTS-12: a multifaced metalloproteinase in arthritis and inflammation. *Mediators Inflamm.* 2014:649718.
- Weng, L.H., J.Y. Ko, C.J. Wang, Y.C. Sun, and F.S. Wang (2012). Dkk-1 promotes angiogenic responses and cartilage matrix proteinase secretion in synovial fibroblasts from osteoarthritic joints. *Arthritis Rheum.* 64:3267-3277.
- Wernicke, D., C. Seyfert, B. Hinzmann, and E. Gromnica-Ihle (1996). Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol.* 23:590-595.
- Westermarck, J., S. Li, P. Jaakkola, T. Kallunki, R. Grenman, and V.M. Kahari (2000). Activation of fibroblast collagenase-1 expression by tumor cells of squamous cell carcinomas is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase-2. *Cancer Res.* 60:7156-7162.
- Wilbert-Lampen, U., F. Straube, A. Trapp, A. Deutschmann, A. Plasse, and G. Steinbeck (2006). Effects of corticotropin-releasing hormone (CRH) on monocyte function, mediated by CRH-receptor subtype R1 and R2: a potential link between mood disorders and endothelial dysfunction? *J Cardiovasc Pharmacol.* 47:110-116.

- Wolford, J.K., and S.A. Signs (1995). Binding of sequence-specific proteins to the 3'-untranslated region of vasoactive intestinal peptide mRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* 211:819-825.
- Wootten, D., H. Lindmark, M. Kadmiel, H. Willcockson, K.M. Caron, J. Barwell, T. Drmota, and D.R. Poyner (2013). Receptor activity modifying proteins (RAMPs) interact with the VPAC2 receptor and CRF1 receptors and modulate their function. *Br J Pharmacol.* 168:822-834.
- Wu, M., C. Li, G. Zhu, Y. Wang, J. Jules, Y. Lu, M. McConnell, Y.J. Wang, J.Z. Shao, Y.P. Li, and W. Chen (2014). Deletion of core-binding factor beta (Cbfbeta) in mesenchymal progenitor cells provides new insights into Cbfbeta/Runx complex function in cartilage and bone development. *Bone.* 65:49-59.
- Wu, Q., M. Zhu, R.N. Rosier, M.J. Zuscik, R.J. O'Keefe, and D. Chen (2010). Beta-catenin, cartilage, and osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1192:344-350.
- Xie, D.L., R. Meyers, and G.A. Homandberg (1992). Fibronectin fragments in osteoarthritic synovial fluid. *J Rheumatol.* 19:1448-1452.
- Xie, D.L., F. Hui, R. Meyers, and G.A. Homandberg (1994). Cartilage chondrolysis by fibronectin fragments is associated with release of several proteinases: stromelysin plays a major role in chondrolysis. *Arch Biochem Biophys.* 311:205-212.
- Xu, K., Y. Zhang, K. Ilalov, C.S. Carlson, J.Q. Feng, P.E. Di Cesare, and C.J. Liu (2007). Cartilage oligomeric matrix protein associates with granulins-epithelin precursor (GEP) and potentiates GEP-stimulated chondrocyte proliferation. *J Biol Chem.* 282:11347-11355.
- Xue, H., Y. Tu, T. Ma, X. Liu, T. Wen, M. Cai, Z. Xia, and J. Mei (2015). Lactoferrin Inhibits IL-1beta-Induced Chondrocyte Apoptosis Through AKT1-Induced CREB1 Activation. *Cell Physiol Biochem.* 36:2456-2465.
- Xue, M., L. March, P.N. Sambrook, and C.J. Jackson (2007). Differential regulation of matrix metalloproteinase 2 and matrix metalloproteinase 9 by activated protein C: relevance to inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 56:2864-2874.
- Yamanishi, Y., D.L. Boyle, M. Clark, R.A. Maki, M.D. Tortorella, E.C. Arner, and G.S. Firestein (2002). Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. *J Immunol.* 168:1405-1412.
- Yang, L., S.G. Carlson, D. McBurney, and W.E. Horton, Jr. (2005). Multiple signals induce endoplasmic reticulum stress in both primary and immortalized chondrocytes resulting in loss of differentiation, impaired cell growth, and apoptosis. *J Biol Chem.* 280:31156-31165.
- Yarushkina, N.I., T.R. Bagaeva, and L.P. Filaretova (2011). Central corticotropin-releasing factor (CRF) may attenuate somatic pain sensitivity through involvement of glucocorticoids. *J Physiol Pharmacol.* 62:541-548.
- Yasuda, T., A.R. Poole, M. Shimizu, T. Nakagawa, S.M. Julovi, H. Tamamura, N. Fujii, and T. Nakamura (2003a). Involvement of CD44 in induction of matrix metalloproteinases by a COOH-terminal heparin-binding fragment of fibronectin in human articular cartilage in culture. *Arthritis Rheum.* 48:1271-1280.
- Yasuda, T., M. Shimizu, T. Nakagawa, S.M. Julovi, and T. Nakamura (2003b). Matrix metalloproteinase production by COOH-terminal heparin-binding fibronectin fragment in rheumatoid synovial cells. *Lab Invest.* 83:153-162.

- Yasuda, T. (2006). Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod Rheumatol*. 16:197-205.
- Yasuda, T. (2010). Comparison of hyaluronan effects among normal, osteoarthritis, and rheumatoid arthritis cartilages stimulated with fibronectin fragment. *Biomed Res*. 31:63-69.
- Yasuda, T. (2011). Activation of Akt leading to NF-kappaB up-regulation in chondrocytes stimulated with fibronectin fragment. *Biomed Res*. 32:209-215.
- Yoshihara, Y., H. Nakamura, K. Obata, H. Yamada, T. Hayakawa, K. Fujikawa, and Y. Okada (2000). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 59:455-461.
- You, R., M. Zheng, and P.J. McKeown-Longo (2010). The first type III repeat in fibronectin activates an inflammatory pathway in dermal fibroblasts. *J Biol Chem*. 285:36255-36259.
- Yuan, G.H., M. Tanaka, K. Masuko-Hongo, A. Shibakawa, T. Kato, K. Nishioka, and H. Nakamura (2004). Characterization of cells from pannus-like tissue over articular cartilage of advanced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 12:38-45.
- Yuan, P.Q., S.V. Wu, C. Pothoulakis, and Y. Tache (2016). Urocortins and CRF Receptor Type 2 Variants in the Male Rat Colon: Gene Expression and Regulation by Endotoxin and Anti-inflammatory Effect. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*:ajpgi 00337 02015.
- Yuasa, T., T. Otani, T. Koike, M. Iwamoto, and M. Enomoto-Iwamoto (2008). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling stimulates matrix catabolic genes and activity in articular chondrocytes: its possible role in joint degeneration. *Laboratory Investigation*. 88:264-274.
- Zack, M.D., E.C. Arner, C.P. Anglin, J.T. Alston, A.M. Malfait, and M.D. Tortorella (2006). Identification of fibronectin neopeptides present in human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum*. 54:2912-2922.
- Zenz, R., R. Eferl, C. Scheinecker, K. Redlich, J. Smolen, H.B. Schonhaler, L. Kenner, E. Tschachler, and E.F. Wagner (2008). Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*. 10:201.
- Zhang, E., X. Yan, M. Zhang, X. Chang, Z. Bai, Y. He, and Z. Yuan (2013). Aggrecanases in the human synovial fluid at different stages of osteoarthritis. *Clin Rheumatol*. 32:797-803.
- Zhang, W., R.W. Moskowitz, G. Nuki, S. Abramson, R.D. Altman, N. Arden, S. Bierma-Zeinstra, K.D. Brandt, P. Croft, M. Doherty, M. Dougados, M. Hochberg, D.J. Hunter, K. Kwok, L.S. Lohmander, and P. Tugwell (2008). OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*. 16:137-162.
- Zhao, C., W. Hui, M.J. Fernandes, P.E. Poubelle, and S.G. Bourgoin (2014a). Lysophosphatidic acid-induced IL-8 secretion involves MSK1 and MSK2 mediated activation of CREB1 in human fibroblast-like synoviocytes. *Biochem Pharmacol*. 90:62-72.
- Zhao, W., C. Zhang, M. Shi, J. Zhang, M. Li, X. Xue, Z. Zhang, Z. Shu, J. Zhu, N. Mu, W. Li, Q. Hao, Z. Wang, L. Gong, W. Zhang, and Y. Zhang (2014b). The discoidin domain receptor 2/annexin A2/matrix metalloproteinase 13 loop promotes joint destruction in arthritis through promoting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheumatol*. 66:2355-2367.

- Zhou, Y., S.Q. Liu, L. Yu, B. He, S.H. Wu, Q. Zhao, S.Q. Xia, and H.J. Mei (2015). Berberine prevents nitric oxide-induced rat chondrocyte apoptosis and cartilage degeneration in a rat osteoarthritis model via AMPK and p38 MAPK signaling. *Apoptosis*. 20:1187-1199.
- Zhu, G., Y. Tang, X. Liang, M. Zheng, J. Yang, H. Zhou, L. Li, and T. Qin (2009). Role of hypoxia-inducible factor-1 alpha in the regulation of plasminogen activator activity in rat knee joint chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 17:1494-1502.
- Zoricic, S., I. Maric, D. Bobinac, and S. Vukicevic (2003). Expression of bone morphogenetic proteins and cartilage-derived morphogenetic proteins during osteophyte formation in humans. *J Anat*. 202:269-277.



Otras publicaciones





1. Th17 polarization of memory Th cells in early arthritis: the vasoactive intestinal peptide effect.  
Jimeno R, Leceta J, Garín M, Ortiz AM, Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Martínez C, **Pérez-García S**, Gomariz RP, Juarranz Y.  
*J Leukoc Biol.* 2015 Aug;98(2):257-69.
2. Vasoactive intestinal peptide maintains the nonpathogenic profile of human th17-polarized cells.  
Jimeno R, Leceta J, Martínez C, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M, **Pérez-García S**, Garín M, Mellado M, Gomariz RP, Juarranz Y.  
*J Mol Neurosci.* 2014 Nov;54(3):512-25.
3. Inflammatory mediators alter interleukin-17 receptor, interleukin-12 and -23 expression in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immunomodulation by vasoactive intestinal Peptide.  
Carrión M, **Pérez-García S**, Jimeno R, Juarranz Y, González-Álvaro I, Pablos JL, Gutiérrez-Cañas I, Gomariz RP.  
*Neuroimmunomodulation.* 2013;20(5):274-84.
4. Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells.  
Jimeno R, Leceta J, Martínez C, Gutiérrez-Cañas I, **Pérez-García S**, Carrión M, Gomariz RP, Juarranz Y.  
*Immunol Cell Biol.* 2012 Feb;90(2):178-86.
5. RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide.  
Carrión M, Juarranz Y, **Pérez-García S**, Jimeno R, Pablos JL, Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I.  
*Arthritis Rheum.* 2011 Jun;63(6):1626-36.