

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR



ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE TSLP EN LA PATOGENIA DE LA
ESCLERODERMIA

TESIS DOCTORAL DE:

ALICIA USATEGUI CORRAL

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE
TSLP EN LA PATOGENIA DE LA
ESCLERODERMIA**

Tesis Doctoral

Alicia Usategui Corral

Madrid, 2013

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de enfermedades inflamatorias y autoinmunes del Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), gracias a los proyectos financiados por el Instituto de Salud Carlos III (FIS 08/0316, FIS 12/439 y RIER RD 12/09/016).

Agradecemos la colaboración del Dr. Warren J. Leonard (Laboratory of Molecular Immunology and Immunology Center, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, EEUU) por ceder su cepa de ratones deficientes en el receptor de TSLP con la que se han realizado parte de los ensayos. Agradecemos al Dr. José L. Rodríguez Peralto (Servicio Anatomía patológica, Hospital 12 de Octubre, Madrid), a la Dra. Patricia Carreira (Servicio de Reumatología, Hospital 12 de Octubre) y al Dr. Pablo Ortiz (Servicio de Dermatología, Hospital 12 de Octubre) su contribución con los tejidos pulmonares y dérmicos utilizados.

Function of TSLP in the pathogenesis of Systemic Sclerosis

Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterized by progressive fibrosis of the skin and internal organs (1). SSc shares pathogenetic features with other autoimmune diseases, the participation of pro-fibrotic Th2 cytokines is unique to SSc (2-4) but the reasons for Th2 cytokine skewing are unknown. Extensive animal and human studies demonstrated that Th2 responses are associated to the production of pro-fibrotic mediators such as IL-4 and IL-13. Contrarily, Th1 effectors such as IFN- γ or TNF- α are anti-fibrotic (5). Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is an IL-7-like cytokine expressed by resident cells such as keratinocytes of atopic dermatitis skin lesions and bronchial epithelial cells of asthmatic airways (6-8). Recent studies revealed that other cells such mast cells, smooth muscle cells, fibroblasts and DC also express TSLP (6). TSLP can trigger dendritic cell-mediated Th2 inflammatory responses in skin and lung allergic inflammation (6, 9). Activation of toll like receptors may mediate up-regulation of TSLP expression and Th2 cytokine provide an amplification loop by directly inducing TSLP expression in resident cells (10, 11). Experimental mouse models genetically deficient in TSLPR or overexpressing TSLP in response to topical vitamin-D (vitD) have been described (12, 13). The later is characterized by atopic dermatitis-like skin irritation, an effect linked to the induction of TSLP and Th2 cytokines (14).

Objectives

The aim of this study was to analyze the expression and potential regulation of TSLP in human SSc, lung fibrosis and in the bleomycin mouse model of scleroderma. We investigate the potential mechanisms involved in the expression of TSLP and its contribution to Th2 cytokine expression and fibrosis in a mouse model of scleroderma.

We analyzed the effects of topical vitD non-calcemic analogue calcipotriol on the expression of TSLP and Th2 cytokines and skin fibrosis in the bleomycin mouse model of scleroderma.

Materials and Methods

Skin biopsies were obtained from 18 patients with diffuse SSc (mean disease duration 2.8 ± 0.5 years) and control normal forearm skin from 6 healthy donors. Lung fibrotic tissues were obtained from 18 patients with usual interstitial pneumonia. Normal lung specimen was also included as control.

Dermal fibrosis was induced in female C3H/HeNHse mice aged 6 week by subcutaneous injections of bleomycin (1mg/ml) or control saline into the shaved back skin every day for 4 weeks. On the other hand, we analyze the effect of TSLP receptor (TSLPR) deficiency on bleomycin induced fibrosis in TSLPR deficient mice (C57BL/6 background homozygous knockout) or wild type (WT/WT) 6 week old littermates. To explore the effect of vitD application in this model, mice were given a daily topical application of 3 nM of the non-calcemic vitD analogue calcipotriol or control vehicle cream on the bleomycin injected shaved skin area. Treated skin was harvested and histological examination and collagen content were determined by Masson's trichrome staining and total hydroxyproline content.

We analyzed by immunohistochemistry (IHC) the expression of TSLP in involved skin from SSc, lung fibrosis and in the bleomycin mouse model of scleroderma, compared to normal control tissues. Double immunofluorescent labeling of macrophages and IL-13 was done. TSLP mRNA expression was analyzed by quantitative RT-PCR in bleomycin induced skin lesions and in cultured fibroblasts. Normal human and mouse dermal fibroblasts were cultured from healthy skin and treated with bleomycin or specific TLR-2, -3 and -4 agonists (Pam3Cys, poly(I:C) and LPS respectively). IL-4, IL-13, IFN- γ and IL-17 mRNA expression were quantified by quantitative RT-PCR.

Data are expressed as mean \pm SEM. Quantitative data were analyzed by Mann-Whitney U-test, Kruskal-wallis test and Wilcoxon test. P-value <0.05 was considered significant.

Results

TSLP protein was detected by IHC in 14 of 18 (78%) human SSc skin sections whereas it was undetectable in normal skin from 3 healthy individuals. TSLP expression was observed in keratinocytes, mast cells and fibroblasts of involved SSc skin. In fibrotic lesions of bleomycin-injected mouse skin, we also observed an increase in TSLP

expression in mast cells, keratinocytes and fibroblasts by IHC. We confirmed a 4.6 ± 0.7 fold increase of the TSLP mRNA level in bleomycin-injected skin ($p < 0.05$). In normal lung tissue TSLP expression was detected in mast cells, whereas in lung fibrotic specimens TSLP expression was increased in epithelial cells, mononuclear cells and, to a lesser extent and weaker intensity, in fibroblasts.

To analyze whether TLR activation mediated TSLP expression, we stimulated human and mouse dermal fibroblasts with different TLR agonist and bleomycin as a potential TLR-2 agonist. In human fibroblasts, TLR-3 agonist induced a strong increase in TSLP mRNA expression (8.4 ± 5.4 , $p < 0.05$), whereas TLR-2 and -4 agonists and bleomycin did not significantly modify TSLP mRNA expression. In mouse fibroblasts, all TLR-2, -3 and -4 agonists but not bleomycin induced TSLP mRNA expression. The strongest effect was observed for TLR-3 agonist (30.95 ± 1.5 $p < 0.05$).

To study the contribution of TSLP to the development of skin fibrosis, we compared the fibrotic response to bleomycin in TSLPR deficient and WT mice. In both KO and WT mice, bleomycin induced dermal fibrosis and an increase in the collagen content of the skin. The fractional collagen area of the dermis and the total collagen protein content of the skin were significantly reduced in TSLPR deficient mice compared to WT mice. A significant increase on the expression of IL-13 and IL-17 but no IL-4 and IFN- γ mRNA in the skin was observed in bleomycin injected compared to saline injected controls WT mice. In TSLPR deficient mice, the expression of IL-13 and IL-17 mRNA in fibrotic skin was significantly reduced compared to WT mice. A significant increase in the number of double macrophage positive/IL-13-positive cells by IHC was observed in bleomycin injected skin compared to saline injected controls. This response was significantly reduced in TSLPR deficient compared to WT mice. Bleomycin did not increase IL-17 protein expression in either group of mice.

To analyze the effect of vitD application in this model, we compared the fibrotic responses to bleomycin in vehicle and calcipotriol treated mice. Skin fibrosis, measured as the increase on Masson's trichrome stained collagen dermal area, was observed in both bleomycin/vehicle and bleomycin/calcipotriol treated groups compared to saline injected group. There were no significant differences between bleomycin/vehicle and bleomycin/calcipotriol groups. Collagen protein measured as hydroxyproline content was also similar in vehicle and calcipotriol treated groups. Dermatitis and scaling were

observed only in the calcipotriol treated group, together with a more intense inflammatory cell infiltrate. In bleomycin injected mouse skin, a significantly increased expression of TSLP, and IL-17, and a modest, non-significant increase in IL-13, IL-4 and IFN- γ mRNA expression were observed compared to the saline injected group. In bleomycin injected mice treated with calcipotriol, a significantly higher increase in TSLP mRNA expression and a modest increase in IL-13 mRNA expression compared to vehicle treated mice were observed. IL-4 and IFN- γ expression were not modified by calcipotriol treatment.

Conclusions

Our data provide the first evidence of TSLP contribution to non-allergic fibrotic human diseases. We demonstrate overexpression of TSLP in human SSc skin, fibrotic lung and in mouse bleomycin-induced scleroderma. In vitro, TLR-3 activation was the main stimulus capable to induce TSLP expression in human and mouse dermal fibroblasts. TSLP overexpression in response to TLR-3 activation may contribute to Th2 differentiation in scleroderma skin.

TSLP deficiency reduces the skin fibrotic response in the bleomycin model, demonstrating a pro-fibrotic role for this cytokine. The effect of TSLP was not a direct effect on fibroblasts but associated to changes in the local cytokine milieu. In the absence of TSLP, reduced lesional IL-13 positive skin macrophages accounted for reduced expression of this pro-fibrotic Th2 cytokine.

Topical calcipotriol induced dermatitis and intense inflammatory cell infiltration and enhanced the expression of TSLP in this model. However, calcipotriol did not modify the development of fibrosis. vitD might therefore induce complex effects that collectively do not result in changes on skin fibrosis in this model.

TSLP is a pro-fibrotic cytokine in scleroderma and the TSLP/IL-13 pathway represents a new target for the development of anti-fibrotic therapies for this orphan disease.

References

1. LeRoy E.C., Black C., Fleischmajer R. *et al.* *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis.* J Rheumatol, 1988. 15(2): p. 202-5.
2. Aliprantis A.O., Wang J., Fathman J.W. *et al.* *Transcription factor T-bet regulates skin sclerosis through its function in innate immunity and via IL-13.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(8): p. 2827-30.
3. Parel Y., Aurrand-Lions M., Scheja A., *et al.* *Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 2007. 56(10): p. 3459-67.
4. Boin F., De Fanis U., Bartlett S.J., *et al.* *T cell polarization identifies distinct clinical phenotypes in scleroderma lung disease.* Arthritis Rheum, 2008. 58(4): p. 1165-74.
5. Wynn TA. *Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis.* J Exp Med, 2011. 208(7):p. 1339–50.
6. Soumelis V, Reche P.A., Kanzler H., *et al.* *Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP.* Nat Immunol, 2002. 3(7):p. 673–80.
7. Ying S., O'Connor B., Ratoff J., *et al.* *Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity.* J Immunol, 2005. 174(12):p. 8183–90.
8. Al-Shami A., Spolski R., Kelly J., *et al.* *A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model.* J Exp Med, 2005. 202(6):p. 829–39.
9. Ito T., Wang Y.H., Duramad O., *et al.* *TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand.* J Exp Med, 2005. 202(9):p. 1213–23.
10. Lee H.C., Ziegler S.F. *Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB.* Proc Natl Acad Sci USA, 2007. 104(3):p. 914–19.
11. Kato A., Favoreto S. Jr, Avila P.C., *et al.* *TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells.* J Immunol, 2007. 179(2):p. 1080–7.
12. Al-Shami A., Spolski R., Kelly J., *et al.* *A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model.* J Exp Med, 2005. 202(6): p. 829-39.
13. Li M., Hener P., Zhang Z., *et al.* *Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(31): p. 11736-41.
14. Li M., Hener P., Zhang Z., *et al.* *Induction of thymic stromal lymphopoietin expression in keratinocytes is necessary for generating an atopic dermatitis upon application of the active vitamin D3 analogue MC903 on mouse skin.* J Invest Dermatol, 2009. 129(2): p. 498-502.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1 Esclerosis Sistémica	3
1.1 Patogenia de la ES	6
1.1.1 Alteraciones vasculares	6
1.1.2 Mecanismos de fibrosis	10
1.1.2.1 Determinantes celulares de la fibrosis	10
1.1.2.2 Factores moleculares implicados en la fibrosis	13
1.1.2.2.1 TGF- β	13
1.1.2.2.2 Otros mediadores profibróticos	15
a) PDGF	15
b) CTGF	15
c) ET-1	16
d) IL-1 e IL-6	16
e) Wnt	17
1.1.2.3 Factores que regulan la degradación de colágeno	17
1.1.3 Alteraciones inmunológicas	19
1.1.3.1 Inmunidad adaptativa	19
1.1.3.1.1 IL-4	21
1.1.3.1.2 IL-13	22
1.1.3.1.3 IL-17	23
1.1.3.2 Inmunidad innata	24
1.1.3.2.1 Toll like receptors	24
1.1.3.2.2 Thymic Stromal Lymphopoietin	26
2 Modelos Animales de ES	30
2.1 Modelo de fibrosis inducido por bleomicina	31
3 Tratamiento de la ES	32
II. HIPÓTESIS	35
III. OBJETIVOS	39
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	43
1 Modelo animal de fibrosis dérmica inducida por bleomicina	45
1.1 Efecto de la vitamina D en el modelo de bleomicina	45
1.2 Estudio del modelo de fibrosis inducida por bleomicina en ratones deficientes para el receptor del TSLP	46
2 Pacientes	47
3 Métodos histológicos	48
3.1 Tinciones histológicas	48

3.1.1 Evaluación histológica del contenido de colágeno en la piel.....	48
3.1.2 Azul de toluidina	49
3.2 Inmunodetección.....	49
3.2.1 Inmunoperoxidasa	49
3.2.2 Inmunofluorescencia	50
3.3 Obtención y cuantificación de los datos IHC	50
4 Cultivos celulares	51
4.1 Tratamiento de los fibroblastos con diferentes estímulos.....	52
4.2 Estimulación de los fibroblastos con plasma de pacientes con ES.....	52
5 Extracción de ARN y PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	53
6 Determinación del contenido en hidroxiprolina	54
7 Análisis de la expresión de citoquinas mediante elisa.....	54
8 Análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo.....	55
9 Análisis estadístico	56
V. RESULTADOS	57
1 Inducción de fibrosis mediada por bleomicina.....	59
2 Expresión de TSLP en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina.....	59
3 Expresión de TSLP en tejidos fibróticos humanos.....	62
4 Regulación de la expresión de TSLP en fibroblastos dérmicos	64
4.1 Regulación de la expresión de TSLP mediada por TLRs.....	64
4.2 Regulación de la expresión de TSLP en fibroblastos dérmicos por TGF- β	66
5 Análisis del papel de TSLP en la regulación del colágeno.....	67
6 Modelo de fibrosis inducida por bleomicina en ratones deficientes para el receptor de TSLP.....	68
6.1 Fibrosis por bleomicina en ratones TSLPR ^{-/-}	68
6.2 Análisis de la expresión local de citoquinas en los ratones TSLPR ^{-/-}	69
6.3 Determinación IHC de la expresión de IL-13 e IL-17 en la piel fibrótica.....	71
6.4 Análisis de las poblaciones celulares T en ratones TSLPR ^{-/-}	73
7 Efecto de la aplicación tópica de vitamina D en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina	74
7.1 Efecto de la vitamina D en el modelo de bleomicina	74
7.2 Análisis de la expresión de citoquinas tras la aplicación tópica de calcipotriol ..	76
VI. DISCUSIÓN	77
1 TSLP en las lesiones fibróticas dérmicas y pulmonares	79
2 TSLP en el desarrollo de la fibrosis.....	82
3 Papel de la Vitamina D en el modelo de fibrosis por bleomicina	86

VII. CONCLUSIONES	89
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	93
IX. ARTICULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS	121

I. INTRODUCCIÓN

1 ESCLEROSIS SISTÉMICA

La Esclerosis Sistémica o Esclerodermia (ES) es una enfermedad crónica autoinmune caracterizada por alteraciones inmunológicas, lesiones vasculares y fibrosis progresiva de la piel y órganos internos [1]. La fibrosis es el resultado de una excesiva acumulación de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular (MEC) en el tejido conectivo y está considerada una lesión irreversible y no tratable, que lleva a una progresiva pérdida de la función en los órganos afectados [2]. Se distinguen dos fenotipos en la ES, limitada (ESl) y difusa (ESd), diferenciados en la extensión de la afectación cutánea y en el patrón de afectación de los diferentes órganos internos, pero sin diferencias patogénicas claras [3].

La esclerodermia es una enfermedad rara del tejido conectivo y su prevalencia varía geográficamente [4]. Su prevalencia estimada oscila entre 3 y 24 casos por cada 100.000 habitantes, siendo más elevada en EE.UU. y Australia comparada con Japón y Europa [5-9]. Existe una población nativa en Oklahoma, los indios Choctaw, que presentan una prevalencia muy elevada estimada en 469 casos por cada 100.000 habitantes, subrayando el componente genético de esta enfermedad [10]. Es más frecuente en mujeres, con una proporción de 3:1 a 14:1 y su comienzo es más habitual entre los 50 y 70 años, aunque puede ocurrir a cualquier edad [7, 11].

La etiología de la enfermedad no ha sido completamente aclarada, pero estudios genéticos y epidemiológicos confirman un complejo componente genético junto a influencias ambientales no bien conocidas [12]. En relación a los factores genéticos, los datos obtenidos en estudios poblacionales y familiares sugieren que éstos desempeñan un papel tanto en la susceptibilidad como en la expresión clínica de la ES. Se ha observado un alto grado de agregación familiar para la ES, estimándose que el riesgo relativo de padecer la enfermedad es 15 veces mayor en hermanos de pacientes y 13 veces superior en familiares de primer grado comparado con la población normal [13], así como una concordancia del 90% en la presencia de autoanticuerpos específicos de ES en gemelos monocigóticos [14]. Existen numerosos estudios de genes individuales candidatos potencialmente implicados en la susceptibilidad a la ES (Tabla 1), y un reciente estudio de asociación de genoma completo (GWAS; de *Genome-wide association study*). Éste ha confirmado algunas hipótesis previas y ha permitido la identificación de nuevos genes y vías moleculares implicadas en la susceptibilidad a la

ES. Los genes implicados están en general relacionados con la regulación del sistema inmune innato o adaptativo, como son genes de la región MHC (de *major histocompatibility complex*) de clase II, STAT (de *signal transducer and activator of trnascription*) 4, PTPN22 (de *protein tyrosine phosphatase, non receptor type 22*), IRF5 (de *interferon regulatory factor 5*), BANK1 (de *B cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*) y CD247 [15-23], y coinciden en parte con genes asociados con otras enfermedades autoinmunes como la Artritis Reumatoide (AR) o el Lupus Eritematoso Sistémico (LES) [24]. En menor medida, podrían estar implicados algunos genes de susceptibilidad asociados a funciones vasculares o la regulación de la producción de MEC.

Gen	Función	Gen	Función
MHC-II	Autoinmunidad (Respuesta T)	HIF-1α	Vascular (Respuesta hipoxia) Fibrosis
STAT4	Autoinmunidad (Respuesta T)	uPAR	Vascular Fibrosis
PTPN22	Autoinmunidad (Respuesta T)	VEGF	Vascular (Angiogénesis) Inflamación
IRF5	Autoinmunidad (I. innata)	NOS3	Vascular (Vasodilatador)
BANK1	Autoinmunidad (Respuesta B)	Endotelina-1	Vascular (Vasoconstrictor)
CD247	Autoinmunidad (Respuesta T)	Caveolina-1	Fibrosis
BLK	Autoinmunidad (Respuesta B)	CTGF	Fibrosis
CTLA-4	Autoinmunidad (Respuesta T)	TGF-β	Fibrosis
TNFSF4 (OX40L)	Autoinmunidad (Respuesta Th2 y B)	Receptor Serotonina 5- HT2A	Fibrosis Agregación plaquetaria
IL-13	Respuesta Th2 Fibrosis	IL-1	Inflamación Fibrosis
Endoglina	Vascular	MMP	Fibrosis
SDF-1 (CXCL12)	Vascular	Fibrilina-1	Fibrosis

Tabla 1. Genes de riesgo asociados a la ES [18, 25-26].

Existen algunos datos que sugieren una posible asociación de la ES con factores ambientales. Por una parte, se han asociado determinadas exposiciones ambientales a diferentes síndromes esclerodermiformes, como la exposición al sílice, a solventes orgánicos (como tolueno, benceno, xileno o hidrocarburos alifáticos) o la enfermedad por exposición al cloruro de polivinilo, caracterizada por un engrosamiento de la piel, fenómeno de Raynaud y afectación pulmonar. Algunos de estos síndromes se han producido de forma epidémica tras la exposición a tóxicos como el síndrome del aceite tóxico en España en 1981 [27]. Otros como el síndrome de eosinofilia-mialgia asociado a la ingesta de cápsulas de L-triptófano contaminadas utilizadas para el insomnio y el síndrome premenstrual que afectó a unas 1600 personas en EEUU en 1989 o la fibrosis sistémica nefrogénica asociada a la exposición a contrastes de gadolinio utilizados para resonancia magnética, presentan también cuadros clínicos con similitudes con la esclerodermia. Por otro lado existen cambios esclerodermiformes asociados a la enfermedad del injerto contra huésped, que aparecen habitualmente tras la suspensión del tratamiento inmunosupresor. Se han propuesto otras posibles influencias ambientales en la ES primaria como los implantes de silicona o la exposición a diferentes tóxicos que no siempre se han confirmado en diferentes estudios epidemiológicos [28].

La epigenética es otra fuente de variabilidad fenotípica. Las modificaciones epigenéticas comprenden todos los cambios heredables del genoma sin alterar la secuencia de los nucleótidos en el ADN (de *ácido desoxiribonucleico*). Al contrario que ocurre con las mutaciones genéticas, los cambios epigenéticos son reversibles. La metilación, fosforilación, adenilación y otras modificaciones de las histonas y del ADN son conocidas por desempeñar un papel importante en enfermedades como el síndrome de Angelman y el de Prader-Willi. Existen estudios que apuntan a influencias epigenéticas en la patogenia de la ES [29], en los que se han observado determinados patrones de inactivación del cromosoma X, variación en el patrón de metilación de las células T CD4⁺ o metilación de genes supresores de colágeno [29-31]. Además de la regulación de la expresión de genes, las modificaciones epigenéticas participan en la regulación de los microARNs (miARNs; ARN de *ácido ribonucleico*), que son secuencias de ARN monocatenario que regulan la expresión de genes mediante diversos procesos y que participan en diferentes patologías bloqueando la transcripción o

promoviendo la degradación de dianas de ARN mensajero (ARNm). Recientemente se han identificado algunas influencias de este tipo en procesos fibróticos [32-35].

1.1 Patogenia de la ES

1.1.1 Alteraciones vasculares

En la patogenia de la ES, la fibrosis, las alteraciones inmunológicas y la lesión vascular parecen interrelacionadas, aunque las relaciones precisas entre los tres componentes no han sido completamente aclaradas.

Los síntomas más precoces de la enfermedad son los relacionados con el daño vascular. Las lesiones vasculares afectan por lo general a la microcirculación y a las arteriolas, observándose una necrosis capilar con proliferación de la íntima arteriolar y fibrosis miointimal, que acaba produciendo oclusión de los vasos, disminución del flujo en los órganos e isquemia progresiva de los tejidos [36-37]. La manifestación clínica más precoz de esta alteración es el síndrome de Raynaud, caracterizado por episodios recurrentes de palidez y cianosis. Estos episodios se producen por una intensa vasoconstricción de las arterias y arteriolas de las extremidades, sobre todo en los dedos de manos y pies, bien de forma espontánea, o más típicamente en respuesta al frío. Éste fenómeno se acompaña de una lesión estructural progresiva del lecho microvascular, que sufre dilataciones y pérdida progresiva de capilares. Éstas se pueden comprobar mediante la observación de dilataciones vasculares visibles o telangiectasias, y sobre todo mediante el examen directo de la microcirculación a través de la fina piel del lecho ungueal (capilaroscopia) [38]. En ocasiones estas lesiones progresan produciendo úlceras necróticas e incluso la pérdida completa de los dedos. En la ES, la presencia del fenómeno de Raynaud es una constante, y puede preceder en años al desarrollo de otras manifestaciones de la enfermedad, sobre todo en los pacientes con la forma limitada en que la fibrosis progresa más lentamente.

Otras manifestaciones relacionadas con la lesión generalizada de los vasos son las crisis isquémicas renales esclerodérmicas, la isquemia miocárdica, y la hipertensión pulmonar, manifestaciones muy graves que afectan de forma variable a distintos pacientes, produciendo compromiso vital [39].

No se conocen completamente los factores patogénicos que causan este tipo de lesión vascular en los pacientes genéticamente susceptibles. Tanto en la ES como en algunos modelos animales, la lesión vascular se acompaña de forma precoz de apoptosis de las células endoteliales (CE). Ésta parece ser un proceso inmunomediado pero su mecanismo preciso no se ha aclarado [40]. Los mecanismos de daño inmune, como autoanticuerpos contra las CE o la citotoxicidad por células T parecen involucrados en el daño inicial [39, 41]. Otros estudios apuntan a la participación de factores ambientales en la lesión vascular, como tóxicos o agentes infecciosos (citomegalovirus) [42]. La alteración y activación prolongadas del endotelio, provocadas por un mecanismo de isquemia intermitente con generación de radicales libres y mediadores vasoactivos, y la activación de los sistemas de fibrinólisis y coagulación, podrían también contribuir a hacer progresar estas lesiones [43-45].

Como consecuencia del daño vascular existe una situación tisular de hipoxia en la piel y tejidos afectados. La hipoxia es un potente estímulo para la formación de nuevos vasos sanguíneos desde los existentes (angiogénesis) a través de la inducción de la expresión de múltiples factores pro-angiogénicos. En la ES, este mecanismo compensador parece deficitario. Uno de los factores pro-angiogénicos más importantes es el VEGF (de *vascular endothelial growth factor*), que causa vasodilatación, proliferación y migración de las CE, estabilizando la formación de nuevos vasos [46]. Los niveles de VEGF y de sus receptores están paradójicamente elevados en pacientes con ES. La expresión de VEGF se ha encontrado incrementada en la epidermis, en fibroblastos, CE y células del sistema inmune de la piel de los pacientes, pero su función parece comprometida [46-48]. Otros factores pro-angiogénicos como PDGF (de *placental derived growth factor*) o FGF-2 (de *fibroblasts growth factor*)-2 también se encuentran elevados en plasma [49]. La angiopoyetina-1 (Ang-1) ejerce funciones vasoprotectoras y anti-inflamatorias, media la maduración de los vasos y mantiene su integridad en el reclutamiento de las CE. Se han encontrado bajos niveles de Ang-1 en los pacientes con ES, lo cual podría contribuir al desarrollo de la vasculopatía [50]. Algunos miembros de la familia de las calicreínas también participan en los procesos de migración, proliferación y diferenciación de CE. En la ES se ha observado una disminución de los niveles de las calicreínas asociada con la angiogénesis, como son las calicreínas-9, -11 y -12 [51]. El plasminógeno tiene un papel complejo en la regulación de la homeostasis vascular ya que sirve de precursor de la angiostatina, y de la plasmina. Ésta última

posee actividad pro-angiogénica y activa a VEGF y FGF promoviendo la angiogénesis. Por otro lado, se han descrito niveles elevados de factores anti-angiogénicos como son la angiostatina, factor plaquetario 4 (también conocido como CXCL4), trombospondina-1 e IL (de *interleukin*)-4 [52-53]. La endostatina, un fragmento de 20kDa derivado del colágeno tipo XVIII, ha sido caracterizado como un potente inhibidor de la angiogénesis y del crecimiento tumoral, reduciendo la proliferación y migración de las CE. Se han observado altos niveles de endostatina en los pacientes con ES que correlacionan con la severidad de la enfermedad [46]. Además, existen altos niveles de Ang-2 en los pacientes con ES, que actúa como una citoquina desestabilizante de los vasos [50], así como de calicreína-3, con propiedades anti-angiogénicas [51].

La vasculogénesis es definida como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de las CE progenitoras circulantes. Los progenitores endoteliales movilizados desde la médula ósea pueden contribuir al remodelado vascular patológico, migrando a los sitios donde se ha producido daño vascular y diferenciándose a CE, contribuyendo de esta forma a la proliferación y alteración vascular [54-55]. La participación de este proceso en la ES no está muy clara, aunque se han observado niveles aumentados de CE progenitoras movilizadas desde la médula ósea [56]. Por otro lado, las células madre mesenquimales (MSC) podrían ser una fuente de CE progenitoras, y en la ES se ha visto que el potencial angiogénico de estas células está reducido [57].

En resumen, aunque el mecanismo primario del daño vascular no está claramente establecido, parece que diferentes tipos de daño inmunomediado en la CE, producen secundariamente importantes defectos en los mecanismos de homeostasis y regeneración vascular con pérdida irreversible del lecho vascular y consecuencias clínicas importantes.

Teóricamente el daño vascular puede inducir la producción de numerosos mediadores que podrían contribuir a la fibrosis. Sin embargo existen numerosas enfermedades vasculares donde la isquemia no se acompaña de fibrosis, y no conocemos qué hace diferente a la ES. Uno de éstos mediadores es la endotelina-1 (ET-1), que ha sido estudiada recientemente como uno de los posibles factores patogénicos de origen endotelial en la ES. La ET-1 es un vasoconstrictor muy potente que se encuentra en concentraciones elevadas en la sangre y lavado broncoalveolar de pacientes con ES [58-59]. Permite la adhesión leucocitaria al endotelio, así como la proliferación de células

musculares lisas de pared vascular. La ET-1 puede tener efectos profibróticos aumentando la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno I y III, y disminuyendo la expresión de metaloproteinasas (MMPs) [60]. Muchas sustancias, entre ellas la trombina, adrenalina, TNF- α (de *tumoral necrosis factor-alpha*), TGF- β (de *transforming growth factor-beta*), angiotensina II y la hipoxia pueden estimular la síntesis de ET-1 [43]. Existen antagonistas farmacológicos de la ET-1 que se están utilizando para tratar alteraciones vasculares en la ES. Estos antagonistas cuyo prototipo es el Bosentan han demostrado efectos beneficiosos sobre todo en la hipertensión pulmonar, pero no existen pruebas de que modifiquen la progresión de la fibrosis.

Los cambios moleculares producidos en respuesta a la hipoxia han sido objeto de estudio en la ES, en especial los dependientes de HIF-1 α (de *hypoxia-inducible factor-1 alpha*), un factor de transcripción que se acumula en condiciones de hipoxia en diferentes tipos celulares y que activa la transcripción de genes fundamentales en el metabolismo anaeróbico, angiogénesis, control vasomotor, apoptosis, proliferación y producción de MEC [61]. A pesar de los reducidos niveles de oxígeno, la activación de HIF-1 α en la ES parece deficitaria. Estudios inmunohistoquímicos (IHC) han mostrado una elevada expresión de VEGF discordante con los bajos niveles de expresión de HIF-1 α en la piel de los pacientes con ES [47]. Los procesos de angiogénesis y vasculogénesis son fundamentales para mejorar la oxigenación del tejido hipóxico. HIF-1 α promueve la vascularización induciendo la expresión de múltiples mediadores angiogénicos como VEGF, PDGF, Ang-1 y Ang-2 [62]. Por otro lado se ha demostrado que la hipoxia induce en los fibroblastos la expresión de genes de la MEC, incluyendo fibronectina-1, trombospondina-1 y procolágeno α 2(I) entre otras, de manera parcialmente regulada por HIF-1 α [63]. Los ROS (de *reactive oxygen species*) también podrían contribuir a incrementar la proliferación de los fibroblastos dérmicos y la expresión de colágeno en la ES [64-66].

Varios estudios han demostrado una correlación entre la presencia de altos niveles de CCL2 (o MCP-1; de *monocyte chemoattractant proteína-1*) en el suero y fluido broncoalveolar de pacientes con ES y la severidad de la enfermedad, así como un aumento de su expresión en la piel esclerodérmica y en fibroblastos dérmicos en ambientes hipóxicos [67-68]. CCL2 pertenece a la familia de las quimioquinas CC y actúa como quimioatrayente de monocitos y de linfocitos T de memoria activados [69].

Además de sus efectos pro-inflamatorios, CCL2 estimula la producción de colágeno directa o indirectamente a través de la inducción de TGF- β e IL-4 *in vitro* [70].

Otra observación interesante implica la hipoxia y los ROS en la inmunogenicidad de algunas proteínas autoantigénicas en la ES que parecen modificarse específicamente en presencia de ROS y metales como el hierro o el cobre [71], vinculando la autoinmunidad al daño vascular.

1.1.2 Mecanismos de fibrosis

La fibrosis es la característica patológica más importante de la ES, y es especialmente prominente en la afectación cutánea de la forma difusa de la enfermedad [72]. La fibrosis está causada por una acumulación excesiva de múltiples componentes de la MEC en el tejido conectivo, sobre todo de los más abundantes como los colágenos fibrilares tipo I y III, así como de otros tipos de colágeno y otras múltiples proteínas (fibronectina, proteoglicanos, etc.) [73]. En esta acumulación está implicado un desequilibrio entre mecanismos de producción y de degradación o remodelado pero el mecanismo fundamental parece un incremento transcripcional de la expresión del ARNm de múltiples proteínas de la MEC [74-76].

1.1.2.1 Determinantes celulares de la fibrosis

Los fibroblastos son las principales células implicadas en la producción de MEC en el tejido conectivo en condiciones normales o patológicas. Tienen una gran capacidad de respuesta, aumentando la producción de MEC necesaria para la reparación y cicatrización. En estas situaciones, los fibroblastos son un grupo heterogéneo de células con características fenotípicas y funcionales variables, características que se pueden reproducir solo parcialmente en cultivo [73-74].

Los mediadores solubles liberados por las células (plaquetas, CE, células epiteliales e inflamatorias) inducen grandes cambios en los fibroblastos que incluyen su capacidad de adherencia, contractilidad, producción de MEC y capacidad de remodelado del tejido conectivo. Además, producen factores de crecimiento y participan en la respuesta inflamatoria e inmune produciendo citoquinas y otros factores. Durante la fase

proliferativa de cicatrización, los fibroblastos desarrollan adhesiones focales que permiten transmitir señales de la MEC al interior celular, y fibras de estrés que les confieren diferentes propiedades mecánicas y de movilidad. En este contexto tiene lugar la transdiferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos [77]. Estos procesos de activación ocurren en circunstancias normales durante el proceso reparativo, siendo desactivados o eliminados por apoptosis las células activadas al final del mismo, mientras que en la ES la activación de los fibroblastos se perpetúa en el tiempo [78].

Se han formulado diferentes hipótesis para explicar la transformación de fibroblastos con baja actividad y síntesis homeostática de MEC en células altamente productoras de MEC. LeRoy observó por primera vez un cambio fenotípico adquirido en los fibroblastos de la ES, caracterizados por un incremento de la síntesis de la MEC que podía propagarse en cultivo, formulando dos hipótesis no excluyentes [73]. La primera de ellas propone el desarrollo de un fenotipo estable, transcripcionalmente activo, de los fibroblastos residentes (activación transcripcional), mientras que la segunda propone un crecimiento favorable de subpoblaciones celulares altamente productoras de componentes de la MEC presentes en baja proporción entre los fibroblastos normales (expansión clonal) [73, 76, 79]. Los fibroblastos de la ES presentan alteraciones tanto del crecimiento (respuestas de proliferación y apoptosis), como de la regulación transcripcional de la expresión de genes de MEC [78, 80-81].

En la ES se han descrito otros marcadores fenotípicos de los fibroblastos [82-84], siendo los más estudiados los implicados en la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos. Los miofibroblastos son fibroblastos especializados con un fenotipo característico, que expresan una proteína contráctil del citoesqueleto, α -SMA (de *alpha smooth-muscle actin*), y tienen una elevada producción de MEC durante procesos de cicatrización normal o patológica [77, 85]. Estas células no siempre se observan en las lesiones fibróticas de la ES. Se han observado únicamente en fases precoces en la forma difusa de la enfermedad y en capas profundas de la dermis [82-83]. Se ha encontrado alguna correlación entre la expresión de α -SMA y la expresión de colágeno y otros marcadores de activación, pero no parece que la fibrosis en la ES pueda explicarse únicamente por la aparición de miofibroblastos [79, 82-84].

Los miofibroblastos y otros tipos de fibroblastos con alta producción de MEC pueden diferenciarse *ex vivo* a partir de fibroblastos tisulares de tejidos normales mediante diferentes estímulos, de los cuales TGF- β es el mejor caracterizado [85-86].

Otra estirpe celular potencialmente implicada en la patogenia de la ES son los pericitos. Son células de origen mesenquimal que se encuentran en los vasos en contacto con el endotelio [87]. En la ES se produce un aumento del número de pericitos y de los receptores para el PDGF en su superficie [88]. Parece que este proceso está interrelacionado con la expansión de fibroblastos y miofibroblastos durante el proceso fibrótico [83, 89]. Particularmente los pericitos activados en la ES expresan una variante del dominio ED-A de la fibronectina, que en presencia de TGF- β participa en su transdiferenciación a miofibroblastos [83].

También se ha descrito como potencial factor celular pro-fibrótico el reclutamiento de nuevas células productoras de MEC. Los fibrocitos son células circulantes CD34⁺ derivadas de la médula ósea [90] con capacidad de sintetizar colágeno, que expresan también marcadores mieloides (CD14) y receptores de quimioquinas (CCR3, CCR5 y CXCR4). Estos fibrocitos pueden diferenciarse desde precursores mononucleares periféricos expuestos a TGF- β y citoquinas Th (T helper) 2, mientras que las citoquinas Th1 inhiben su diferenciación [91]. La expresión de estos receptores en la superficie celular de los fibrocitos permitiría que respondan a gradientes de quimioquinas y se acumulen en los tejidos. Además de la síntesis de MEC, los fibrocitos comparten funciones con células mieloides como la activación de las células T a través de la expresión de moléculas MHC-II y moléculas coestimuladoras [92].

En resumen, parece que tanto mecanismos de diferenciación y activación celular, como la participación de varias estirpes celulares puede contribuir a la acumulación de fibroblastos pro-fibróticos en los tejidos. Además, la presencia de múltiples factores extracelulares como citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento permiten perpetuar el proceso. Dentro de este grupo de factores, TGF- β parece el mediador multifuncional más potente en el inicio y progresión de la respuesta fibrótica.

1.1.2.2 Factores moleculares implicados en la fibrosis

1.1.2.2.1 TGF- β

TGF- β es una glicoproteína soluble que pertenece a una superfamilia de proteínas reguladoras en la que se incluyen las isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, activinas y BMPs (de *bone morphogenetic proteins*). Estructuralmente consiste en dos subunidades ligadas por puentes disulfuro, formando un homodímero de 25kDa. Participa en el crecimiento, desarrollo, diferenciación y en procesos reparativos a través de la unión específica a sus receptores de membrana [93-94]. Puede ser producido por plaquetas, monocitos, macrófagos, linfocitos T y fibroblastos en la ES. TGF- β promueve la migración, diferenciación, proliferación y supervivencia de los fibroblastos, e incrementa la síntesis de colágeno y otros componentes de la MEC [95-98].

TGF- β se secreta como un precursor latente formado por TGF- β maduro, el propéptido TGF- β (también llamado LAP de *latency-associated protein*) y la proteína LTBP (de *latent TGF-beta binding protein*). LAP se encuentra anclada a un homodímero de TGF- β maduro mediante uniones no covalentes e impide la unión de TGF- β 1 a sus receptores. La activación de TGF- β 1 se produce a través de la degradación o la alteración de la conformación de LAP, un proceso mediado por proteasas, trombospondina-1, MMPs e integrinas [99]. Se han descrito alteraciones en muchos de estos elementos de regulación de expresión y activación de TGF- β en la ES [100-104].

La unión de TGF- β a sus receptores induce la activación de varias cascadas de señalización. La ruta de las Smad es la más específica de la familia de TGF- β y su activación se ha confirmado en la ES [102]. TGF- β se une a su receptor TGF- β RII que induce la fosforilación del receptor TGF- β RI, una quinasa serina-treonina transmembrana que fosforila a las proteínas Smad activadoras (Smad-2 y -3) que forman heterocomplejos con Smad-4. En esta forma se translocan al núcleo donde reconocen y se unen a los SBE (de *Smad-binding elements*), reclutando factores transcripcionales y permitiendo la transcripción de genes específicos [93]. Los SBE se encuentran en los promotores de muchos genes inducibles por TGF- β , incluyendo los de proteínas asociadas a la producción de la MEC como colágenos α 1(I) y α 2(I), PAI-1 (de *plasminogen activator inhibitor-1*), α -SMA y CTGF (de *connective tissue growth factor*), factores de crecimiento y factores anti-apoptóticos [105-106] que participan en los procesos de proliferación, migración y diferenciación.

Existen otras rutas de señalización independientes de proteínas Smad que son variablemente activadas en respuesta a TGF- β y que podrían también contribuir a sus efectos pro-fibróticos [107]. Una de estas rutas es c-Abl (de *c-Abelson*) que puede ser activada por TGF- β en los fibroblastos y se ha implicado recientemente en sus efectos pro-fibróticos [108]. Otras moléculas activadas por TGF- β son los miembros de la familia de las MAP (de *mitogen activated protein*) quinasas, que responden ante estímulos extracelulares o estrés y regulan procesos de diferenciación, proliferación, supervivencia celular y apoptosis, como son p38 y JNK (de *jun N terminal kinase*), FAK (de *focal adhesion kinase*) y TAK-1 (de *TGF- β -activated kinase-1*). Además TGF- β puede activar PI3K (de *Phosphatidylinositol 3 kinase*) y Akt (conocida también como proteína quinasa B), que participan en las respuestas pro-fibróticas y cooperan con las cascadas de señalización de *Wnt* y Notch [106]. La inhibición química de la actividad PI3K reduce la fosforilación y transcripción de Smad-2 inducida por TGF- β durante la transdiferenciación epitelio-mesénquima, otro proceso dependiente de TGF- β [109]. La activación de todas estas vías de señalización intracelulares se asocia a múltiples respuestas transcripcionales que pueden converger o ser independientes en sus efectos finales con la vía canónica (Smad) [110]. En la ES se han descrito múltiples alteraciones en todas estas vías de señalización [110-114].

Aunque muchas de estas vías pueden ser también activadas por otros factores, TGF- β desempeña un papel dominante en la fibrogénesis y la manipulación de esta vía de señalización es suficiente para reducir la respuesta fibrótica [115-118].

Recientemente se ha encontrado una ruta capaz de modular significativamente la señalización de TGF- β , en la que está implicada caveolina-1. Esta proteína es el miembro más importante de la familia formada por tres proteínas integrales de la membrana plasmática (caveolina-1, -2 y -3) que están presentes en estructuras celulares denominadas caveolas. Estas estructuras son invaginaciones de la membrana plasmática expresadas en la mayoría de los tipos celulares y localizadas en balsas lipídicas de sus membranas. Estudios recientes han mostrado que caveolina-1 participa en la regulación de la señalización mediada por TGF- β gracias a la capacidad de internalización y degradación de su receptor (TGF- β R), inhibiendo así la ruta de señalización de TGF- β y restaurando el balance de producción-degradación de la MEC [119]. Kasper *y col.* evidenciaron la existencia de una asociación entre caveolina-1 y un fenotipo fibrótico [120] que ha sido respaldado por diferentes estudios posteriores [121-123] en los que se

muestra que la expresión de caveolina-1 está disminuida en la ES, amplificando así la señalización de TGF- β .

Además de TGF- β , numerosas citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas con capacidad reguladora de la función de las MSC, se han encontrado sobreexpresadas en la ES, donde también parecen contribuir a la patogénesis de la fibrosis.

1.1.2.2.2 Otros mediadores profibróticos

a) PDGF

La familia de PDGF está formada por cuatro cadenas polipeptídicas (de la A a la D) que forman dímeros. Células como los macrófagos activados, CE, células del músculo liso y fibroblastos pueden producirlo. Actúa como mitógeno potente y quimioatrayente de fibroblastos. Es capaz de inducir la síntesis de colágeno, fibronectina y proteoglicanos, así como estimular la secreción de TGF- β 1, CCL2 e IL-6. A pesar de que se describió como un producto de síntesis plaquetaria, existen diferentes isoformas que son producidas por macrófagos, CE y por los mismos fibroblastos. Se ha evidenciado un aumento en la expresión de PDGF y de sus receptores en los fibroblastos de la ES y en los tejidos lesionados [81, 124-125]. Además se han detectado en la ES autoanticuerpos específicos contra el receptor de PDGF cuya unión induce su activación en la misma medida que PDGF [126-127].

b) CTGF

CTGF es una proteína rica en cisteína que pertenece a la familia de los factores de crecimiento del tejido conectivo, también conocida como CCN2. CTGF participa en procesos como la regulación del ciclo celular, migración, adhesión y angiogénesis [128]. La expresión de CTGF es directamente inducida por TGF- β y aumenta el crecimiento de los fibroblastos y la producción de MEC [129-131]. Algunos modelos animales apoyan una hipótesis en la que TGF- β induciría fibrosis en las etapas tempranas y CTGF contribuiría a la progresión o mantenimiento de la fibrosis en una segunda fase [132-133]. CTGF potencia indirectamente la señalización vía Smad a través de su interacción con TGF- β , incrementando su unión al receptor y prolongando la señalización de TGF- β [129, 134]. Resulta casi indetectable en individuos sanos, pero

aparece constantemente sobreexpresado en las enfermedades fibrosantes, siendo un buen marcador de la acción de TGF- β . En pacientes con ES, existe una correlación entre su concentración plasmática y la extensión de la fibrosis cutánea y pulmonar [128, 135].

Existen pruebas de que el bloqueo terapéutico de CTGF disminuye la fibrosis inducida por bleomicina en pulmón y piel. Por ejemplo, la terapia con anticuerpos anti-CCN2 o con siARN, reduce la expresión de colágeno y α -SMA en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina [136]. Por otro lado, el uso de KO (de *knockout*) condicionales ha mostrado que CCN2 es indispensable para aparición de fibrosis dérmica inducida por bleomicina [137].

c) ET-1

La endotelina es un factor inducible por TGF- β también sobreexpresado en lesiones de pacientes con ES con potenciales efectos sobre la diferenciación de los fibroblastos, su proliferación y la síntesis de la MEC [138]. Se trata de un polipéptido de 21 aminoácidos que se sintetiza principalmente en el endotelio y ejerce su acción a través de la unión a receptores específicos. Estos receptores se expresan en diversas líneas celulares incluyendo los fibroblastos, células musculares lisas y CE. Es capaz de incrementar la expresión de TGF- β , α -SMA y moléculas de adhesión tipo ICAM-1 (de *intracellular adhesion molecule-1*) [139]. Estudios realizados en modelos animales muestran que el desarrollo de fibrosis pulmonar mediante bleomicina se asocia a un incremento en la expresión de ET-1 y de sus receptores [140-141]. Además, ratones transgénicos para la ET-1 humana desarrollan inflamación y fibrosis pulmonar de forma espontánea [142]. Se ha postulado que el tratamiento con Bosentan, un antagonista de los receptores de ET-1, para la hipertensión pulmonar no sólo ejercería su efecto sobre la vasculatura arterial pulmonar, sino que además poseería propiedades anti-fibróticas, aunque este último aspecto no se ha demostrado [143].

d) IL-1 e IL-6

La familia de IL-1 incluye a las isoformas IL-1 α , IL-1 β y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-2Ra) [144]. Se han encontrado elevadas concentraciones de IL-1 en el suero, en el fluido broncoalveolar y en los fibroblastos de pacientes con ES [145-146]. Un aumento en la expresión de IL-1 α en fibroblastos sanos induce la expresión de IL-6,

procolágeno y su proliferación [147-148]. Por el contrario, IL-1 β inhibe la producción de colágeno e induce la expresión de MMPs [149-150].

IL-6 es una citoquina con funciones pro-inflamatorias, producida por múltiples tipos celulares [151]. En el suero de pacientes con ES se han encontrado niveles elevados de IL-6 en las fases más tempranas de la enfermedad [152-153], y en estudios IHC se ha demostrado su sobreexpresión en el endotelio y fibroblastos en fases más tardías [154]. IL-6 tiene la capacidad de modular la expresión de α -SMA y colágeno en los fibroblastos dérmicos y de inducir la diferenciación de miofibroblastos, contribuyendo así al mantenimiento de la fibrosis. Además puede modular el balance entre células Th17 y células T reguladoras, potencialmente implicado en la patogénesis de la ES [155]. Los estudios realizados en modelos animales de fibrosis dérmica y pulmonar han confirmado la participación de IL-6 en la patogénesis de la fibrosis [156-158].

e) *Wnt*

Las proteínas *Wnt* son ligandos que se secretan y transmiten su señal a través de la unión específica al receptor *Frizzled*, induciendo la activación de una cascada de señalización intracelular que culmina con la transcripción de los genes diana de β -catenina [159]. Se han implicado alteraciones en la activación de esta vía en diferentes enfermedades como malformaciones congénitas, osteoporosis, cáncer y enfermedades óseas [160-161]. Existen pruebas de que la activación patológica de *Wnt* desempeña un papel importante en la patogénesis de la fibrosis pulmonar y dérmica [162-164]. Recientemente se ha observado una interacción entre la vía de señalización de *Wnt* y TGF- β que parece participar en la fibrosis. TGF- β activa la vía de señalización de *Wnt* disminuyendo la expresión del antagonista de *Wnt*, Dkk-1 (de *Dickkopf-1*). La activación de *Wnt* estimula la producción de colágeno y la diferenciación de miofibroblastos *in vitro* e induce fibrosis *in vivo* [165].

1.1.2.3 Factores que regulan la degradación de colágeno

Las MMPs son una familia de proteinasas responsables de la degradación de la MEC. Tienen varias características comunes: comparten secuencias aminoacídicas, son sintetizadas como precursores inactivos que se activan por proteólisis del pro-péptido, tienen un ión de zinc en el sitio de activación, requieren de un segundo cofactor como el

calcio y son secretadas o existen como pro-enzimas transmembrana. De acuerdo a sus propiedades enzimáticas y estructurales, se clasifican en diferentes grupos: colagenasas (MMP-1, -8, -13 y -18), gelatinasas (MMP-2 y -9), estromelinas (MMP-3, -10, -11 y -19), matrilisinas (MMP-7 y -26), MMPs transmembrana (MMP-14, -15, -16, -17, -24 y -25) y otras MMPs (MMP-12, -20, -21, -22, -23, -27 y -28).

La regulación de las MMPs es compleja y ocurre a varios niveles, incluyendo la transcripción de sus genes, la activación post-translacional de las proenzimas inactivas y la inhibición endógena [166]. Muchos factores reguladores como citoquinas, factores de crecimiento (EGF, TGF- β y PDGF), hormonas, esteroides y transformaciones celulares oncogénicas están involucradas en la regulación transcripcional de la expresión de MMPs [167-168].

La actividad de las MMPs está sometida a la acción de potentes inhibidores como las TIMPs (de *tissue inhibitor of metalloproteinases*), una familia de pequeñas proteínas extracelulares cuya expresión es también regulada por PDGF, TGF- β y diferentes citoquinas [169]. Está compuesta por cuatro miembros, TIMP-1, -2, -3 y -4 que controlan la expresión y actividad de las MMPs evitando la degradación inapropiada de la MEC [170]. Todas contienen 12 residuos conservados de cisteína que estabilizan los dominios C-terminal y N-terminal. Este último está altamente conservado en todos los miembros de la familia y ejerce una importante función en la inhibición de las MMPs. Inhiben la actividad enzimática de las MMPs a través de la unión no covalente a las formas activas de las MMPs [171]. El equilibrio dinámico entre las MMPs activas y las TIMPs es crucial en los procesos celulares de proliferación, migración, adhesión y apoptosis.

MMPs y TIMPs pueden ser producidas por células como fibroblastos, miofibroblastos, CE, células inflamatorias (macrófagos, monocitos y neutrófilos) o células tumorales [172-174]. Los elevados niveles de expresión de TIMP-1 que se observan tanto en suero como en los fibroblastos de pacientes con ES correlacionan con la severidad de la enfermedad [175-176]. Además se han descrito autoanticuerpos anti-MMPs en pacientes con ES [177]. La disminución de la actividad de MMPs por un incremento de la expresión de TIMP-1 o por anticuerpos anti-MMPs en la ES, podría contribuir a la acumulación de MEC en la fibrosis.

En condiciones normales, el balance de la degradación y remodelado de proteínas de la MEC está controlado por las acciones celulares de TGF- β y de otras citoquinas. TGF- β no sólo participa induciendo la expresión de componentes de la matriz como fibronectina, colágenos y proteoglicanos [178-179], sino que además promueve la acumulación de componentes de la MEC induciendo la síntesis de TIMPs y de PAI-1.

1.1.3 Alteraciones inmunológicas

1.1.3.1 Inmunidad adaptativa

La alteración inmune mejor conocida en la ES es la presencia en el suero de autoanticuerpos, algunos específicos, como son los anti-topoisomerasa I (Scl-70), los anti-centrómero (ACA, de los cuales el más conocido es el anti-cenpB) y los anti-polimerasa de ARN I y III, que por lo general, preceden a la aparición de la enfermedad [180] y ayudan al diagnóstico, aunque no se ha demostrado una relación patogénica directa entre éstos y la fibrosis. Por otro lado, se han identificado otros autoanticuerpos con una posible implicación en la ES, como son los anticuerpos anti-MMPs 1 y 3 [177, 181], anticuerpos contra la chaperona específica de colágeno hsp47 [182], los anti-fibrilina 1 [183] y los anticuerpos contra el receptor de PDGF que son capaces de inducir la activación de dicho receptor y que podrían tener un efecto patogénico profibrótico directo [126].

También se han descrito ocasionalmente infiltrados de linfocitos B en la piel y pulmón de pacientes con ES [184-185]. Las células B circulantes de los pacientes con ES presentan características de células B activadas, con altos niveles de expresión de moléculas como CD19, MHC-II, CD80, CD86 y CD23. Las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) y el factor de activación de células B (BAFF; de *B-cell activating factor belonging to the TNF family*) podrían perpetuar la activación de estas células y contribuir a las respuestas de autoanticuerpos [186-187].

La base genética de la ES implica claramente factores relacionados con la respuesta de las células T. Entre éstos destaca STAT4, perteneciente a la familia STAT, que dirige la diferenciación de los linfocitos T y determina su patrón de producción de citoquinas [155, 188]. Por otro lado, PTPN22 es una proteína-tirosín fosfatasa específica de linfocitos implicada en la regulación de la señalización intracelular a través del TCR

tras la estimulación antigénica. Se ha confirmado la asociación del alelo de riesgo 620W con una mayor actividad fosfatasa de la enzima PTPN22 incrementado así el umbral para la activación de las células T [189]. Otro factor conocido es TNFSF4 (de *TNF ligand superfamily 4*), que codifica para OX40 (CD134) y OX40 ligando (OX40L; CD252). OX40L es expresado en células presentadoras de antígeno activadas y en CE en procesos inflamatorios. Favorece la proliferación y diferenciación de las células B y se une a OX40 promoviendo la proliferación y supervivencia de las células T [190-191] y el inicio de las respuestas celulares tipo Th2 [192-193]. Diferentes estudios han confirmado la asociación entre varios polimorfismos de OX40L y la susceptibilidad de padecer ES [194-195]. La vía del IFN (de *interferon*) tipo I podría ser otro de los mecanismos implicados en la autoinmunidad en la ES. La expresión de los IFN tipo I está regulada por una familia de factores de transcripción conocida como factores reguladores de IFN o IRF. Entre ellos, IRF5 ha adquirido gran interés ya que se han descrito variantes genéticas que confieren mayor susceptibilidad a la ES [22, 196].

Los exámenes histológicos realizados en lesiones dérmicas de ES temprana demuestran un infiltrado inflamatorio que precede a la fibrosis [197], formado principalmente por células T, macrófagos y células cebadas distribuidas en su mayoría perivascularmente. En relación a las células T se observa un predominio de células T con un fenotipo CD4⁺ frente a las células T CD8⁺ [198]. Un grupo considerable del infiltrado de células T lo forman las células T $\gamma\delta$ que expresan varios marcadores de activación [199]. En la piel y pulmón de pacientes con ES, las células T expresan un fenotipo activado con un incremento de la expresión del receptor de IL-2 y de CD69, que permite la interacción entre las células T con otras células como los fibroblastos que se encuentran próximos a su área de infiltración [41, 200].

En general, en múltiples enfermedades inflamatorias fibrosantes, tanto idiopáticas o autoinmunes, como las causadas por procesos alérgicos o agentes infecciosos, se considera a las células Th2 como las principales células T efectoras de fibrosis, mientras que las repuestas Th1 tienen efectos anti-fibróticos. Citoquinas Th1 como IFN- γ , TNF- α e IL-12 son potentes anti-fibróticos que suprimen el desarrollo del tejido fibrótico, inhibiendo la producción de colágeno en fibroblastos *in vitro* [201-202]. Varios estudios animales han sugerido que las células Th1 definidas por la producción de IFN- γ tienen actividad anti-fibrótica [203-204]. IFN- γ es secretado por células T CD4⁺ y CD8⁺ y por células NK (de *natural killer*) activadas [205]. IFN- γ suprime directamente la expresión

de genes que codifican diferentes procolágenos e inhibe los efectos transcripcionales de TGF- β [206-207]. Además, inhibe la proliferación de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos [208]. También puede actuar previniendo la diferenciación de monocitos CD14⁺ inducida por citoquinas Th2 hacia fibrocitos [91]. En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado su capacidad de inhibir la respuesta fibrótica [209].

IL-12 participa en la producción de IFN- γ y en la polarización de células Th1. Los niveles de IL-12 en suero están disminuidos en fases precoces y correlacionan inversamente con la evolución y extensión de la fibrosis [152]. Varios estudios realizados en modelos animales han revelado que la administración de IL-12 atenúa la fibrosis [210-211]. La ausencia de T-bet (de *T-box expressed in T cells*), el factor principal de polarización Th1, se asocia a una mayor expresión de la citoquina Th2 IL-13 y a una susceptibilidad aumentada a la fibrosis por bleomicina [212-213]. Recientemente se ha encontrado una asociación de una variante genética de la subunidad β 2 del receptor de IL-12 (IL-12R β 2) con la ES [214], subrayando la potencial importancia de este factor anti-fibrótico en la patogenia de la ES.

En la ES y a diferencia con otras enfermedades autoinmunes, existen algunas pruebas que indican la participación de respuestas de tipo Th2 en su patogenia [212, 215-218]. Algunos datos recientes también apuntan a la posible participación de respuestas Th17, implicadas a su vez en la inflamación autoinmune producida en otras enfermedades aunque no se conoce bien su relevancia en la patogenia de la ES.

Las citoquinas Th2, sobre todo IL-4 e IL-13 pueden inducir fibrosis a través de numerosos efectos celulares, que incluyen la estimulación directa de la síntesis de colágeno en los fibroblastos humanos.

1.1.3.1.1 IL-4

IL-4 es una citoquina producida por células Th2, mastocitos, basófilos y posiblemente eosinófilos [219]. Actúa como regulador de las respuestas de las células T efectoras y de la función de las células B e inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias por CE y macrófagos. Se conoce bien su capacidad de estimular la proliferación de fibroblastos, y la expresión de genes de proteínas de MEC como procolágenos y tenascina [220-221]. Además regula la producción de TIMP-2 en los fibroblastos dérmicos a través de la ruta de las MAP quinasas y la producción de TGF- β en

eosinófilos y células T [222-224]. Análisis realizados en pacientes con ES muestran niveles elevados de IL-4 en el suero [216, 225], así como de los niveles de ARNm y de proteína en tejidos [226]. Además, en el fluido broncoalveolar de los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, en el intersticio pulmonar de pacientes con alveolitis fibrosante y en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con fibrosis periportal se han encontrado niveles incrementados de esta citoquina [227-229].

Por otro lado se ha demostrado su participación en los modelos animales, ya que el uso de anticuerpos frente a IL-4 o la supresión del gen de la IL-4 reducen la fibrosis dérmica [230-231]. Además de su capacidad para inducir la expresión de TGF- β , existe una interacción entre TGF- β e IL-4 en la regulación de la expresión de los genes de procolágeno *in vitro* [230]. Como TGF- β puede promover la expansión de las células Th2 [232], y la expresión de los genes CTGF es inducida por TGF- β e IL-4 en fibroblastos dérmicos y pulmonares [130, 233], podría existir una sinergia entre estas citoquinas contribuyendo a la patogénesis de la ES.

1.1.3.1.2 IL-13

IL-13 es una citoquina producida predominantemente por las células Th2 activadas que participa típicamente como un importante mediador en la inflamación alérgica [234-235]. IL-13 ha sido implicada en la patogénesis de múltiples enfermedades fibróticas incluyendo la ES [236]. Comparte funciones con IL-4 ya que ambas citoquinas señalizan a través de STAT6 mediante la cadena α del receptor de la IL-4 [237]. IL-13 induce la expresión de la proteína de colágeno $\alpha 2(I)$ [238] y estimula la producción de TGF- β en los macrófagos de diferentes formas, incluyendo la producción de TGF- β latente y regulando la expresión de MMPs [239-240]. Además actúa como un potente estimulador de CCL2 [241], que también puede desempeñar un papel en la patogénesis de la fibrosis.

Al igual que ocurre con IL-4, se han encontrado niveles elevados de IL-13 en el suero de pacientes con ES [236], y una correlación de éstos con la severidad de la enfermedad [67]. Además se ha observado un incremento de la expresión de IL-13 en el fluido broncoalveolar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática y en macrófagos alveolares [242]. Estudios genéticos han implicado polimorfismos en los genes de IL-13 [243] y de su receptor (IL-13R $\alpha 2$) [244] con una mayor susceptibilidad a la ES. Se han identificado varios polimorfismos de nucleótidos en el gen de IL-13 y alguno de ellos

está asociado con el asma y otras enfermedades atópicas [245], donde junto a IL-4 parece mediar la fibrosis asociada a la inflamación alérgica crónica que causa obstrucción irreversible de la vía aérea. En ensayos con el modelo animal de fibrosis inducida por bleomicina se ha observado un incremento de la expresión de IL-13 en la piel y de su receptor en células mononucleares y macrófagos del infiltrado dérmico [246]. La expresión de IL-13 tanto por células T como por células del sistema inmune innato, contribuye al proceso fibrótico por bleomicina tanto en ratones inmunocompetentes como en ratones SCID (de *severe combined immunodeficient*) [212-213]. También se ha demostrado que los ratones deficientes para la citoquina están protegidos frente a la fibrosis pulmonar inducida por isotiocianato de fluoresceína [247].

En relación a las células T CD8⁺, se ha demostrado un aumento en su número en el fluido broncoalveolar de pacientes con ES. Estas células expresan altos niveles de ARNm de citoquinas Th2 que correlaciona con la disminución de la función pulmonar [248]. Las células CD8⁺ efectoras que se encuentran en sangre periférica también producen altas cantidades de IL-13 sugiriendo que las CD8⁺ pueden desempeñar un papel importante en la ES [249]. Asimismo, se han detectado células T dobles positivas (CD4⁺ CD8⁺) productoras de altas cantidades de IL-4 en la piel y en el lavado broncoalveolar de pacientes con ES que podrían participar en el desarrollo y perpetuación de la fibrosis [216].

1.1.3.1.3 IL-17

La familia de IL-17 comprende 6 miembros (IL-17A, -B, -C, -D, -E y -F), de las cuales IL-17A es la más estudiada. Es producida por células T, macrófagos, células dendríticas (DCs; de *dendritic cells*), células NK, células NKT, y células T $\gamma\delta$ [250]. La expresión de IL-17 está ligada a diferentes enfermedades autoinmunes como la AR, esclerosis múltiple, psoriasis o la enfermedad inflamatoria intestinal [251], en las que actúa como un potente mediador pro-inflamatorio [252].

Varios estudios muestran un incremento de los niveles de IL-17 en el suero, sangre periférica y en el líquido broncoalveolar de pacientes con ES, proponiendo un papel de las células Th17 en la patogenia de la enfermedad [155, 215, 253-254]. IL-17A tiene la capacidad de inducir la proliferación de fibroblastos, pero es menos clara su acción reguladora sobre la producción de colágeno [253]. IL-17A puede inducir la producción

de otras citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 y la expresión de ICAM-1 en fibroblastos humanos [255]. Los niveles de IL-17A están también elevados en suero en el modelo animal de fibrosis por bleomicina, donde parece contribuir a la producción de TGF- β [256]. IL-17F puede inducir la producción de TGF- β en CE [155].

Todas estas observaciones demuestran la implicación y alteración de respuestas T y B en la ES, pero de manera similar a otras enfermedades autoinmunes que comparten elementos genéticos, no es posible definir un modelo inmunopatológico integrador y que explique la patología. Como elementos diferenciales de la ES cabe destacar una menor presencia de células inflamatorias en el foco de lesión, la presencia y posible implicación de citoquinas Th2 y una mayor resistencia de la enfermedad a la inmunosupresión. Los modelos clásicos de enfermedad Th2 son las enfermedades alérgicas y las parasitosis, dos grupos de enfermedades que en sus formas crónicas asocian fibrosis. La participación Th2 en la inflamación alérgica no está limitada a su capacidad para inducir la producción de anticuerpos IgE específicos contra los alérgenos y a promover el infiltrado de eosinófilos en los tejidos dañados, sino que además producen citoquinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que participan directa o indirectamente en la inflamación y fibrosis. Tanto en autoinmunidad como en este grupo de enfermedades es necesario analizar la contribución del sistema inmune innato para comprender su inmunopatología.

1.1.3.2 Inmunidad innata

1.1.3.2.1 Toll like receptors

El sistema inmune innato es la primera barrera de respuesta rápida ante la presencia de motivos o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; de *pathogen-associated molecular patterns*), como son el ADN no metilado rico en dinucleótidos CpG, el ARN de cadena simple y de doble cadena y los componentes de las paredes celulares bacterianas. Los receptores encargados del reconocimiento de estos PAMPs son los PRRs (de *pattern recognition receptors*). Dentro de este grupo, la familia más importante son los receptores tipo Toll (TLRs; de *Toll like receptors*), una familia formada por receptores extracelulares y endosomales caracterizados por la presencia de un dominio con repeticiones ricas en leucina, un dominio similar al del receptor de IL-1

(TIR) y un dominio intracelular [257]. Los TLRs se pueden dividir en dos grupos: el primero de ellos comprende a los receptores TLR-1, -2, -4, -5, -6 y -10, que se encuentran en la superficie celular y reconocen moléculas de bacterias, micobacterias, hongos y parásitos. El segundo grupo se localiza intracelularmente y en endosomas y reconocen componentes bacterianos y de genoma viral. En este grupo se encuentra TLR-3 (reconoce ARN de doble cadena), TLR-7 y -8 (reconocen ARN de cadena sencilla) y TLR-9 (reconoce ADN hipometilado rico en CpG).

La señalización de los TLR puede realizarse mediante la vía de activación dependiente o independiente de MyD88 [257-258]. Esta molécula adaptadora es esencial en la cascada de señalización de los TLRs, exceptuando a TLR-3, y permite la expresión de genes vía NF- κ B (de *nuclear factor kappa-light-chain-enhance of activated B cells*), AP-1 (de *activating proteína-1*) o IRF [259-261]. Por otro lado, el reclutamiento de TRIF (de *Toll-receptor-associated activator of interferon*) es exclusivo de TLR-3 permitiendo la activación de IRF3 principalmente, aunque también puede inducir la de NF- κ B [262-263].

Diversos estudios han revelado que los TLR responden y desempeñan un papel importante en la patogenia de diferentes enfermedades inflamatorias o autoinmunes no infecciosas, como LES, esclerosis múltiple, diabetes tipo I o AR, donde parecen responder a ligandos endógenos [264]. Trabajos recientes en LES han identificado que los TLRs, particularmente TLR-7, -8 y -9, reconocen inmunocomplejos que contienen ADN o ARN endógenos y contribuyen al inicio de la inflamación, realimentando la estimulación del sistema inmune adaptativo a estos antígenos [265-267]. Tras la activación de los TLRs, se produce un incremento en la expresión de genes regulados por IFN- α que correlaciona con la actividad de la enfermedad [268-271]. Este patrón de expresión se ha observado también en los pacientes con ES, aunque sin correlaciones clínicas definidas [272-274]. Por otra parte, existen pruebas de la participación de TLR-9 en la ES a través de la estimulación de la producción de IFN- α , especialmente en aquellos pacientes con anticuerpos anti-topoisomerasa I [275]. En la ES se han sugerido como potenciales ligandos endógenos de los TLRs moléculas derivadas de la MEC como el ácido hialurónico u otros productos de degradación de bajo peso molecular, proteínas producidas por estrés celular, o factores liberados por las células en procesos necróticos, y ácidos nucleicos e inmunocomplejos de manera similar al LES.

En general, la posible contribución de respuestas TLR a la fibrosis es poco conocida, pero en algunos casos puede estar mediada por TGF- β [276]. Trabajos recientes han sugerido que la activación de los TLRs en los fibroblastos permite su diferenciación a miofibroblastos a través de TLR-3 o TLR-9 [277-278]. Los fibroblastos dérmicos humanos sanos expresan TLR-2, -3, -4 y -5, pero otros subtipos de fibroblastos, como los sinoviales en la AR, expresan además TLR-6 y -7 [279-281]. Se conoce que la expresión de TLR-3 y -4 puede ser inducida durante el proceso inflamatorio en la AR [280], donde el ARN de las células necróticas activa a los fibroblastos a través de TLR-3 induciendo la producción de citoquinas inflamatorias [282]. Recientemente se ha demostrado que en la ES la activación de TLR-3 podría incrementar la fibrosis a través de la producción de ET-1 por fibroblastos y CE [283-284]. El IFN de tipo I induce la expresión de TLR-3 en fibroblastos dérmicos sanos y de ES, incrementando su potencial inflamatorio y posiblemente pro-fibrótico [285]. Estudios en DCs procedentes de pacientes con ES han mostrado la existencia de alteraciones en su respuesta a la estimulación de los TLRs *ex vivo* [286]. La participación de TLR-4 ha sido más estudiada en la AR, donde parece reconocer y responder a ligandos endógenos. En la ES, también se ha sugerido un posible papel para este receptor, encontrándose altas concentraciones de agonistas de TLR-4 en el suero [287].

1.1.3.2.2 Thymic Stromal Lymphopoietin

Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) es una citoquina de la familia de IL-7, aislada a partir de una línea celular del estroma tímico [288] y caracterizada como un potente factor de diferenciación Th2 [289-291]. TSLP tiene un receptor heterodimérico formado por la cadena α del receptor de la IL-7 (IL-7R α) y una cadena γ específica (TSLPR) (Figura 1) [292-293]. TSLP se une primero a TSLPR con baja afinidad, y a continuación lo hace a IL-7R α , que permite la formación de un complejo de alta afinidad [294]. Ambas citoquinas inducen la fosforilación del residuo tirosina del factor de transcripción STAT5, pero mientras IL-7 media esa señalización activando la vía JAK1 (de *Janus kinase*) y JAK3, TSLP lo hace interaccionando con JAK1 y JAK2 [295-296]. Además de la activación de STAT5, TSLP puede activar otras rutas de señalización como PI3K/Akt, MAP quinasas y la familia de quinasas Src [297]. Estudios comparativos muestran que las secuencias murina y humana de TSLP

comparten una estructura de cuatro cadenas α -hélice con varios sitios de N-glicosilación y seis residuos de cisteína conservados a pesar de que tienen un bajo grado de identidad aminoacídica (43%). Los receptores humano y murino comparten únicamente un 39% de la secuencia aminoacídica [298].

La ruta de señalización de NF- κ B, activada por citoquinas pro-inflamatorias y TLRs, parece regular la expresión de TSLP [299-300]. Estudios recientes revelan que citoquinas como TNF- α e IL-1, sinergizan con citoquinas Th2 (IL-4 e IL-13) incrementando los niveles de TSLP en células del epitelio aéreo y en queratinocitos humanos [299, 301]. De forma similar, la activación de TLR-2, -3, -8 y -9 pueden aumentar la producción de TSLP en las células epiteliales [299, 302-303]. Se había propuesto que la activación de las células epiteliales mediada por TLR-4 no afectaba a la producción de TSLP, pero se ha encontrado que la estimulación de las células intestinales con LPS incrementa la expresión de ARNm de TSLP [300].

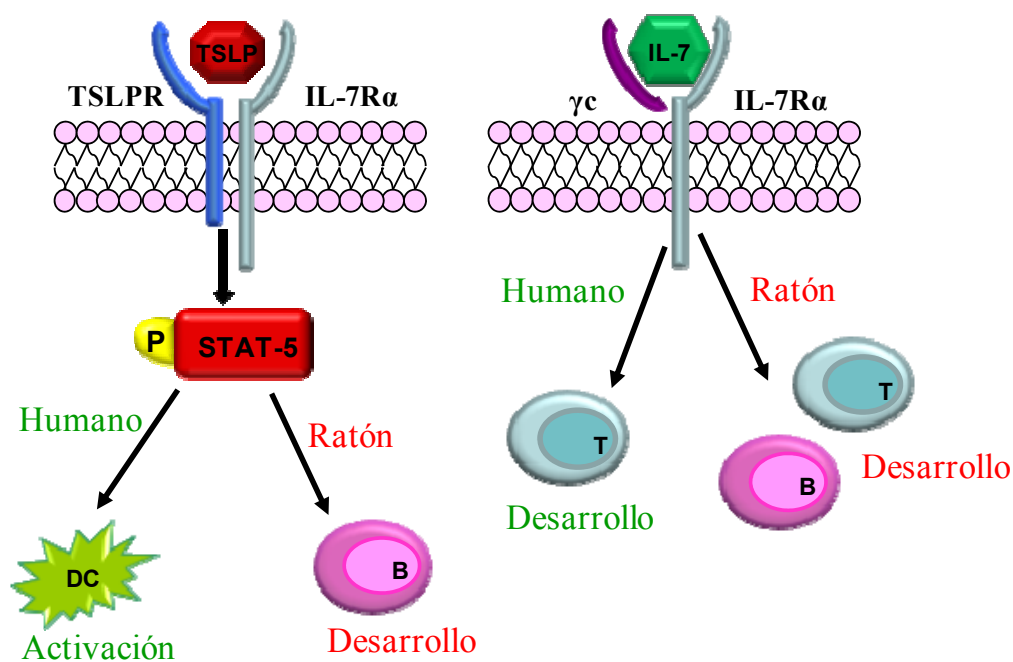


Figura 1. Receptores de TSLP e IL-7.

TSLP se expresa en queratinocitos, fibroblastos de pulmón, mastocitos y basófilos [288, 304], mientras que su receptor se expresa en células hematopoyéticas, incluyendo monocitos, células T, B y DCs [290, 294, 298]. Estas últimas responden incrementando la expresión de MHC-II, CD40, CD80/CD86, OX40L y TARC (de *T-helper 2 attracting*

chemokines activation-regulated chemokine) [297]. Las células cebadas no sólo expresan altos niveles de ARNm de TSLP, sino que también responden a la presencia de la citoquina [288, 305] liberando mediadores inflamatorios, entre los que se encuentran TNF- α , histamina, citoquinas Th2 y quimioquinas. La estimulación con IL-1 β y TNF- α en presencia de TSLP de mastocitos humanos *in vitro* induce una gran liberación de citoquinas Th2 (IL-5, -6, -10 y -13) así como quimioquinas que participan en las enfermedades alérgicas. El bloqueo de TSLP endógeno liberado por las células humanas del epitelio aéreo inhibe completamente la producción de IL-13 [303].

En relación a las células T, inicialmente se observó que TSLP ejercía efectos directos sobre las células T murinas mientras que en las humanas el efecto era indirecto a través de las DCs [297], aunque estudios posteriores mostraron que las células T CD4⁺ de ambas especies responden directamente a la citoquina [306-307]. Las células T CD4⁺ humanas pre-activadas, pero no las *naïve*, expresan TSLPR y tras su activación se induce de forma rápida la expresión de genes mediados por STAT5. Además TSLP incrementa la expresión del receptor IL-2R α , aumentando la sensibilidad de las células T CD4⁺ a bajas dosis de IL-2 [307].

En el ratón, TSLP promueve el desarrollo de células B y T [288, 290, 308], mientras que la isoforma humana activa a las células mieloides, como las DC CD11c⁺ [288, 298]. La activación de células T CD4⁺ por DCs tratadas *ex vivo* con TSLP induce su diferenciación en células Th2 de tipo inflamatorio, definidas por la producción de citoquinas tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), altos niveles de TNF- α y bajos niveles de IL-10 e INF- γ (Figura 2) [288]. Por otro lado las DCs activadas por TSLP inducen la diferenciación de las células T CD8⁺ a células citotóxicas productoras de IL-5 e IL-13 [309].

En humanos, TSLP participa en la homeostasis de las células CD4 en la mucosa asociada a tejidos linfoides [310-311] y en la selección positiva y/o expansión de células T reguladoras en el timo [310]. En condiciones inflamatorias, TSLP se sobreexpresa en lesiones agudas y crónicas de pacientes con dermatitis atópica y asma, donde su nivel de expresión correlaciona con la severidad de la enfermedad [305, 312]. En relación a las infecciones parasitarias se ha visto que TSLP participa en las respuestas Th2, donde parece tener un papel en la fase aguda, pero no en la fase fibrótica o crónica de la enfermedad [313].

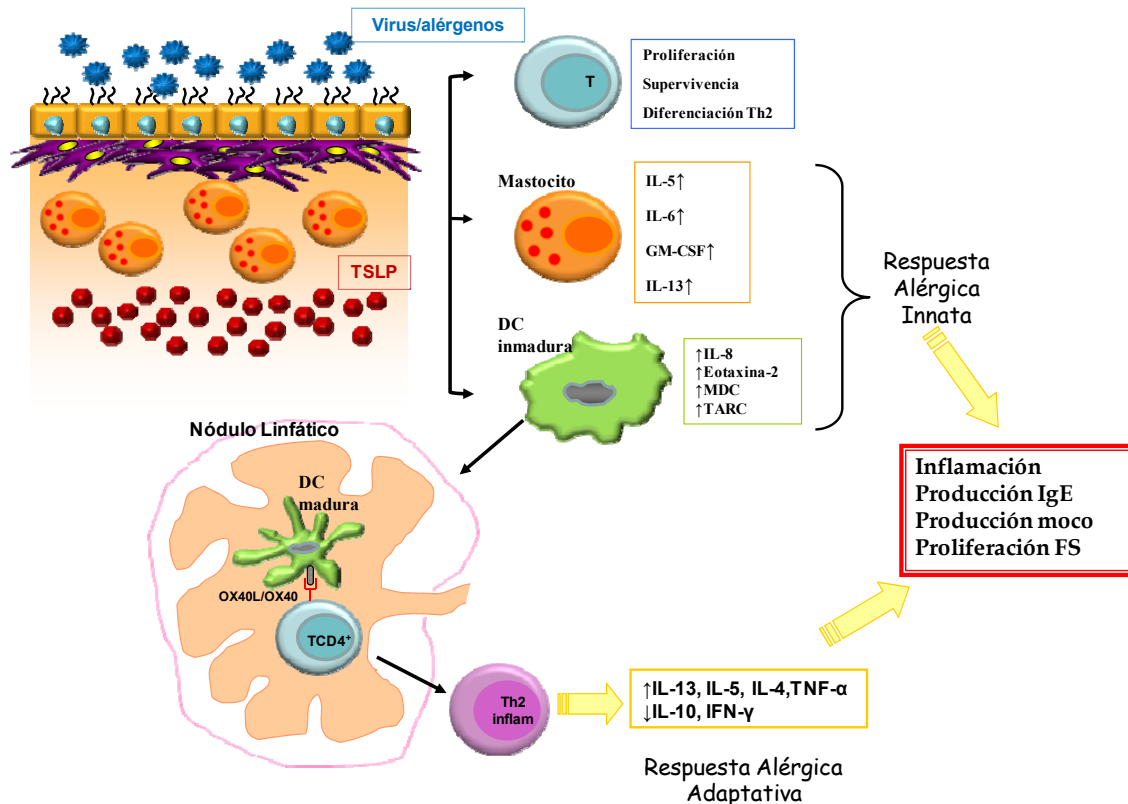


Figura 2. Esquema de actuación de TSLP. El daño celular causado por la presencia de alérgenos o virus provoca la liberación de TSLP por las células epiteliales o de la dermis (queratinocitos, fibroblastos o mastocitos). TSLP induce una respuesta alérgica del sistema inmune activando las DCs inmaduras al unirse a su receptor (TSLPR). Esto provoca la producción de IL-8, eotaxina-2, MDC y TARC, y la maduración de las DCs, que migran a los nódulos linfáticos y producen OX40L. Éste se une a OX40 permitiendo la diferenciación de las células T CD4⁺ a células Th2 de tipo inflamatorio, productoras de IL-4, IL-5, IL-13 y TNF- α que permiten el inicio de la inflamación. Por otro lado, TSLP activa a los mastocitos que producen IL-5, IL-13, GM-CSF, e IL-6. MDC: *macrophage-derived chemokine*.

Estudios *in vivo* han demostrado que TSLP es un factor crítico para el desarrollo de inflamación alérgica. Modelos animales transgénicos que expresan TSLP en queratinocitos o células epiteliales de pulmón desarrollan dermatitis atópica o asma respectivamente [314-316]. El grupo de Leonard comprobó que ratones deficientes para el receptor de TSLP (TSLPR^{-/-}) no desarrollaban asma en un modelo experimental [315], y este defecto podía ser revertido al introducir células T CD4⁺ de ratones WT (de *wild type*). Curiosamente, diferentes combinaciones de células T CD4⁺ y DCs de ratones WT *versus* TSLPR^{-/-} revelaron que el déficit del receptor en las células T CD4⁺ tiene efectos más severos que su déficit en las DCs [315]. Por otro lado, la expresión forzada de TSLP asociada al déficit del receptor del ácido retinoico X en los queratinocitos o inducida por análogos de la vitamina D, inducen dermatitis en los ratones [317-318].

En relación con la fibrosis, se ha demostrado que IL-7 actúa como un factor anti-fibrótico que disminuye la producción y señalización de TGF- β en fibroblastos pulmonares en cultivo y en el modelo animal de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina [319]. Sin embargo la participación de TSLP en las enfermedades fibrosantes no ha sido estudiada con detalle. Únicamente se ha descrito que la administración intradérmica de TSLP induce inflamación localizada y fibrosis acompañadas por un incremento en la expresión de citoquinas y quimioquinas Th2 [320].

2 MODELOS ANIMALES DE ES

Se han descrito numerosos modelos animales, espontáneos o inducidos de ES, aunque ninguno de ellos reproduce todos los aspectos patogénicos y manifestaciones sistémicas de la ES.

Existen dos modelos genéticos monogénicos de esclerodermia denominados Tsk-1⁺ (de *Tight Skin*), causado por una duplicación en tándem del gen de la fibrilina 1 [321] y Tsk-2⁺, causado por una mutación heredable con un patrón autosómico dominante inicialmente inducida por el agente alquilante etilnitrosurea [322]. Ambos reproducen la afectación cutánea pero no otras manifestaciones de la enfermedad. El primero parece más una anomalía no inflamatoria del desarrollo del tejido conectivo, aunque parece dependiente de TGF- β y el segundo se asocia con infiltrados inflamatorios lesionales.

Mediante manipulación genética se han obtenido ratones que desarrollan de forma espontánea algunos procesos fibróticos similares a la ES. Dentro de este grupo, los modelos transgénicos de sobreexpresión de Fra-2 [323] y TGF- β RI [324] presentan fibrosis generalizada, inflamación y alteraciones vasculares pulmonares. Los ratones genéticamente deficientes (KO) en TGF- β RII [325] presentan un incremento de la proliferación de los fibroblastos, hiperactividad de TGF- β y desarrollan fibrosis pulmonar y cutánea. El déficit genético de caveolina 1^{-/-} [121, 326] muestra un fenotipo caracterizado por fibrosis pulmonar, alteraciones del sistema vascular y dislipemia.

Otros modelos adquiridos de ES son el modelo de fibrosis cutánea o pulmonar por bleomicina, del que se hablará en el siguiente apartado, o el modelo GVHD (de *graft-versus-host disease*). Éste último puede inducirse transplantando células

hematopoyéticas de ratones B10.D2 en ratones BALB/c irradiados (conocido como modelo estándar de GVHD) [327] o en ratones inmunodeficientes RAG-2 (conocido como modelo modificado de GVHD) en el que se inyectan células del bazo procedentes de ratones B10.D2 induciendo engrosamiento dérmico, fibrosis progresiva de los órganos internos y presencia de autoanticuerpos [328]. La enfermedad humana GVHD muestra manifestaciones esclerodermiformes similares, por lo que este modelo reproduce mejor este proceso que la ES.

2.1 Modelo de fibrosis inducido por bleomicina

La bleomicina induce una potente respuesta fibrótica local en la piel o el pulmón, y este es un modelo ampliamente utilizado en la investigación terapéutica, ya que permite analizar los efectos de una intervención en un tiempo relativamente corto.

La bleomicina es un antibiótico obtenido de *Streptomyces verticillus* [329] utilizado frecuentemente en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Actúa causando daño en el ADN de las células tumorales e induciendo apoptosis [330]. Los beneficios clínicos de la bleomicina son limitados, ya que altas dosis provocan una respuesta inflamatoria y neumonitis que podría progresar hasta un estado final de fibrosis pulmonar [331-332]. Además, diferentes estudios han mostrado el desarrollo de fibrosis dérmica tras el tratamiento con bleomicina y un incremento de la síntesis de colágeno en cultivos de fibroblastos dérmicos y pulmonares [333-334].

Debido a estos efectos pro-fibróticos, se utilizó inicialmente como modelo de fibrosis pulmonar en roedores [335-336] y más tarde, el grupo de Yamamoto describió un modelo de fibrosis dérmica con inyecciones subcutáneas diarias de bleomicina durante un periodo de 4 semanas [156] que mimetiza los cambios inflamatorios que ocurren en las etapas tempranas de la ES.

La hipótesis más extendida postula que la bleomicina induciría la producción de radicales libres de oxígeno, causando daño en las CE y expresión de moléculas de adhesión [337]. Esto produciría un infiltrado en la zona de la lesión compuesto por leucocitos (incluyendo linfocitos T y B), mastocitos, macrófagos y eosinófilos que activarían a los fibroblastos residentes [156] desencadenando la producción de altas

cantidades de MEC, que culminaría en una lesión fibrótica en la zona de inyección de la bleomicina.

En este modelo se ha descrito una activación de la señalización pro-fibrótica de TGF- β , y la expresión de otros numerosos mediadores pro-fibróticos y pro-inflamatorios como CCL2, PDGF, IL-4, IL-6 e IL-13 [337-339]. En la zona lesionada se observa un incremento en la expresión de TGF- β producido por los fibroblastos y células inflamatorias, y un incremento de los niveles de Smad-2/3 fosforilado o coactivadores de la ruta TGF- β /Smad como la histona acetiltransferasa p300 y CTGF [339-341]. La participación de esta ruta se confirma por la reducción de la fibrosis observada en los ratones deficientes para Smad-3 [118]. Sin embargo, en este modelo, la vía independiente de Smad también participa en la expresión de colágeno a través de Erg-1 (de *early growth response factor-1*) [342]. Esta vía se ha descrito en ratones con una delección de Nab2, un factor que bloquea la respuesta transcripcional de Erg-1, que resulta en una acumulación de colágeno en la piel [343]. Otros ensayos realizados con ratones KO para CCL2 o STAT4 muestran una disminución del infiltrado inflamatorio y de la fibrosis tras la administración de bleomicina [344-345]. Estudios con ratones SCID han demostrado que tras la administración de bleomicina se induce fibrosis, sugiriendo que este modelo es independiente de células T [346-347].

Aunque el modelo presenta algunas limitaciones, como que la fibrosis es exclusivamente local y no reproduce algunos factores patogénicos presentes en la ES como el prominente daño vascular y la autoinmunidad, representa un modelo válido para examinar la importancia de factores moleculares o evaluar intervenciones dirigidas en el proceso fibrótico.

3 TRATAMIENTO DE LA ES

La ES es una enfermedad heterogénea en sus manifestaciones en diferentes pacientes, donde la aparición y gravedad de las diferentes manifestaciones vasculares o fibrosis de la piel y diferentes órganos es variable. No existe un tratamiento general, modificador de la patogenia de la enfermedad (Tabla 2). Aunque se usan fármacos inmunosupresores, en general su eficacia no ha sido contrastada en ensayos clínicos controlados. La ciclofosfamida, metotrexato, el micofenolato mofetil, o agentes

biológicos como el rituximab (anti-CD20) y tocilizumab (anti-IL-6R), han mostrado algún efecto beneficioso en estudios observacionales [348-351]. No existe ninguna terapia que haya demostrado eficacia que intervenga directamente sobre el proceso de fibrosis. Se ha promovido el desarrollo de varias estrategias inhibitorias de TGF- β durante la última década, desarrollando anticuerpos o péptidos antagonistas de las diferentes isoformas de TGF- β , así como péptidos inhibidores de TGF- β 1, hasta ahora sin éxito en los ensayos [352-353]. Imatinib mesilato, un inhibidor de tirosin-quinasa que ejerce actividad inhibitoria sobre la señal intracelular de los receptores de PDGF y TGF- β , reduce la proliferación de fibroblastos dérmicos sanos y de ES [354-355], pero diferentes estudios clínicos han mostrado resultados terapéuticos inconsistentes en la ES. Por otro lado, bosentan, un antagonista de los receptores de endotelina ha demostrado eficacia en la prevención de úlceras digitales y en el control de la hipertensión arterial pulmonar, pero no en modificar el curso de la fibrosis [356-358].

Existen diferentes posibilidades eficaces de tratamiento de la afectación vascular en diferentes órganos, pero no han demostrado alterar el curso de la fibrosis. En el caso del fenómeno de Raynaud, los bloqueantes de canales de calcio y la prostaciclina (Iloprost) constituyen el tratamiento de elección inicial ya que reducen la frecuencia y severidad de los episodios isquémicos [359-360]. Los vasodilatadores utilizados en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar y las úlceras digitales son la prostaciclina, los antagonistas del receptor de la ET-1 (Bosentan, Sitaxentan y Ambrisentan) y los inhibidores de la fosfodiesterasa 5 (Sildenafil y Tadalafilo) [356-358, 361]. En el caso de la crisis vascular renal esclerodérmica, los inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECA) y los antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA II) son muy eficaces [358].

Una manifestación muy grave de la ES es la fibrosis pulmonar. El diagnóstico está basado en pruebas de función e imagen pulmonar. Existen dudas sobre la influencia del tratamiento inmunosupresor sobre la fibrosis aunque se sigue considerando la ciclofosfamida como una opción posiblemente eficaz en algunos pacientes [358, 362].

En resumen, no existe actualmente ninguna opción terapéutica contrastada capaz de detener o mejorar la fibrosis actuando directa o indirectamente sobre las vías moleculares implicadas en su patogenia, por lo que la investigación de nuevas dianas es particularmente necesaria en la ES y otras enfermedades en las que el mecanismo principal de lesión es la fibrosis.

Manifestaciones Clínicas	Tratamiento
Síndrome de Raynaud	Bloqueantes canales de calcio, alpha bloqueantes, inhibidores serotonina, inhibidores receptor II angiotensina, nitratos locales, Iloprost
Úlceras Digitales	Iloprost, Sildenafil
Esclerodermia	Metrotexato
Alveolitis	Ciclofosfamida
Hipertensión pulmonar	Bosentan, Sildenafil, Prostanoides
Reflujo esofágico	Inhibidores de la bomba de protones
Crecimiento bacteriano	Antibióticos de amplio espectro
Artritis	Corticosteroides, Metrotexato
Miositis	Corticosteroides, Metrotexato, Inmunoglobulinas
Serocarditis	Corticosteroides, Ciclofosfamida
Crisis renal esclerodérmica	IECA y ARA II

Tabla 2. Opciones de tratamiento en la ES. Modificado de Balbir-Gurman A; 2012 [363].

II. HIPÓTESIS

La hipótesis se basa en las siguientes premisas:

- La ES es una enfermedad autoinmune mediada por células T que se diferencia de otras enfermedades similares en la intensa respuesta fibrótica y en la participación de citoquinas efectoras diferentes a las de otras enfermedades autoinmunes sistémicas.
- La polarización Th2 y las citoquinas asociadas a esta respuesta predominan en la esclerodermia frente al mecanismo Th1/Th17 predominante en otras enfermedades inmunomediadas.
- TSLP es el factor regulador más importante de las respuestas Th2 en las enfermedades alérgicas y parasitarias.

Por tanto, la hipótesis de este trabajo es que la expresión aumentada de TSLP contribuye al desarrollo de fibrosis en la ES y el modelo experimental por bleomicina mediante su efecto promotor de respuestas de citoquinas Th2 pro-fibróticas.

III. OBJETIVOS

1. Analizar la expresión de TSLP en la piel esclerodérmica y otros tejidos fibróticos humanos y en el modelo experimental de fibrosis dérmica inducido por bleomicina.
2. Estudiar la regulación de la expresión de TSLP por diferentes estímulos potencialmente relacionados con la fibrosis como TGF- β y agonistas de TLRs en fibroblastos dérmicos humanos y murinos.
3. Analizar la posible actividad directa de TSLP sobre la expresión de colágeno en fibroblastos dérmicos humanos.
4. Analizar la contribución de TSLP a la fibrosis y a la expresión de citoquinas Th2 en el modelo de esclerodermia por bleomicina mediante la utilización de ratones deficientes en su receptor específico (TSLPR).
5. Analizar el efecto de sobreexpresar TSLP en la piel estimulada por el análogo no calcémico de la vitamina D calcipotriol sobre la fibrosis y la expresión de citoquinas Th2 en el modelo de esclerodermia por bleomicina.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1 MODELO ANIMAL DE FIBROSIS DÉRMICA INDUCIDA POR BLEOMICINA

Se utilizaron ratones hembra C3H/HeNHsd de 6 semanas de edad (Harlan-Ibérica, Barcelona, España) a los que se les inyectó diariamente bleomicina subcutánea durante 4 semanas (Merck, Barcelona, España). Se hicieron dos grupos de ratones y se inyectaron con 100µl de una solución de bleomicina (1mg/ml) en suero salino, o con suero salino como tratamiento control en las mismas condiciones. El punto de inyección se localizó en un área previamente rasurada de la región interescapular. Transcurridas 4 semanas, los ratones fueron sacrificados en una atmósfera de CO₂ y se recogieron muestras de piel con un *punch* de 4mm de diámetro. Las muestras destinadas a analizar el ARNm y medir el contenido en hidroxiprolina se conservaron a -80°C, mientras que los tejidos destinados a evaluación histológica se congelaron bien en N₂ líquido incluidos en OCT (de *optimal cutting temperature*; CellPath, Newtown Powys, Reino Unido) o bien se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% (Krape, Madrid, España) para su posterior inclusión en parafina.

Sobre este modelo animal de fibrosis inducida por bleomicina se realizaron diferentes ensayos con el fin de estudiar el papel de TSLP en la fibrosis cutánea.

1.1 Efecto de la vitamina D en el modelo de bleomicina

Basándonos en estudios previos que demuestran que la aplicación tópica de vitamina D provoca un incremento de la expresión de TSLP [318, 364], y una respuesta inflamatoria local dependiente de TSLP y linfocitos T CD4⁺, eosinófilos, DCs y mastocitos así como por el incremento de citoquinas Th2 en la piel, analizamos el efecto de esta intervención en el curso de la fibrosis.

Grupos de 10 ratones hembras C3H de 6 semanas de edad a los que se les indujo fibrosis por bleomicina, fueron tratados diariamente con una crema que contenía 3nM de Calcipotriol (Daivonex crema; laboratorio Leo Pharma, Barcelona, España) o una crema control en el mismo área de inyección de la bleomicina.

1.2 Estudio del modelo de fibrosis inducida por bleomicina en ratones deficientes para el receptor del TSLP

Los ratones deficientes para el receptor del TSLP (C57/bl6 TSLPR^{-/-}; KO) generados en el laboratorio de Warren J. Leonard [306], se cruzaron con ratones WT C57bl/6 procedentes de Harlan-Ibérica. Los animales fueron mantenidos en el animalario de la Unidad de Investigación del Hospital 12 de Octubre.

El genotipado de las crías se realizó a partir de una muestra de tejido de la oreja al que se le añadieron 75µl del buffer HOT-SHOT (25mM NaOH, 0,2mM EDTA pH7) y se dejó durante una hora a 99°C. Pasado ese tiempo se añadieron 75µl de buffer de neutralización (40mM Tris pH 7,4), se mezclaron y guardaron a 4°C hasta su uso. Los oligonucleótidos utilizados en la PCR para determinar el genotipo de los ratones fueron los siguientes:

Gen A mTSLPR: 5'-AACCTCTCCCACAAGAAGTCCAGAAGT-3'

Gen B mTSLPR: 5'-AGACTTTACCTGATTCCTGCCTTG-3'

Gen Neo mTSLPR: 5'-ATCGCCTTCTATCGCCTTCTT-3'

Los oligonucleótidos A y B amplifican una banda de 250pb correspondientes al gen endógeno TSLPR, mientras que la pareja formada por los oligonucleótidos B y Neo amplifican una banda de 650pb correspondiente al gen diana de la neomicina (Figura 3). La PCR se realizó con las siguientes condiciones: 94°C 2 minutos, 40 ciclos de 94°C 30 segundos, 62°C 45 segundos y 45°C 45 segundos. Finalmente un ciclo de 72°C 7 minutos antes de mantenerse a 4°C.

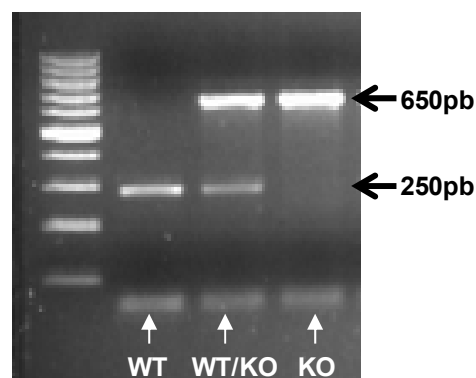


Figura 3. Gel de agarosa al 2% de la PCR realizada para genotipar los ratones.

Finalmente se realizaron los ensayos de inducción de fibrosis en ratones WT y KO.

2 PACIENTES

Las biopsias dérmicas fueron obtenidas de piel afectada del antebrazo de 18 pacientes con esclerodermia difusa diagnosticados en base a los criterios del ACR (de *American College of Rheumatology*) (Tabla 3) con una media de duración de la enfermedad de 2.8 ± 0.5 años. Los tejidos de pulmón se obtuvieron de 18 pacientes con fibrosis pulmonar idiopática primaria, diagnosticados de neumonía intersticial usual mediante tomografía axial computarizada y biopsia pulmonar. Seis biopsias dérmicas utilizadas como controles se obtuvieron de intervenciones cosméticas de individuos sanos, mientras que el tejido pulmonar sano se obtuvo de un pulmón procedente de neumectomía. Las biopsias fueron fijadas en PFA e incluidas en parafina o congeladas en nitrógeno líquido tras incluirse en OCT.

Además se recogió plasma sanguíneo de 5 individuos sanos y de 9 pacientes con esclerodermia (5 de ellos con anticuerpos anti-topoisomerasa I (Scl-70) y 4 sin anticuerpos) y se conservaron a -80°C hasta su uso.

Todos los pacientes dieron su consentimiento informado y el estudio fue aprobado por el comité ético del Hospital 12 de Octubre.

Criterio Mayor	Engrosamiento, retracción e induración simétrica de la piel de los dedos y de la piel proximal a las articulaciones metacarpofalángicas. Los cambios pueden afectar a toda la extremidad, la cara, el cuello y el tronco (tórax y abdomen).
	Esclerodermia proximal.
Criterios Menores	Esclerodactilia. Los cambios arriba indicados pero limitados a los dedos de las manos.
	Cicatrices digitales o pérdida de sustancia de los pulpejos de los dedos: áreas deprimidas en las puntas de los dedos o pérdida de tejido en los pulpejos, como resultado de isquemia.
	Fibrosis pulmonar basal bilateral. Patrón reticular de densidades lineales o lineonodulares bilaterales, más pronunciado en las porciones basales de ambos pulmones en un estudio radiológico de rutina, puede tener la apariencia de moteado difuso o pulmón "en panal de abeja". Estos cambios no deben ser atribuibles a enfermedad pulmonar primaria.

Tabla 3. Criterios de diagnóstico de la esclerosis sistémica (ACR 1980): Se requiere un criterio mayor o dos o más criterios menores para el diagnóstico.

3 MÉTODOS HISTOLÓGICOS

3.1 Tinciones histológicas

Se realizaron estudios histológicos e IHC de las biopsias de pacientes con ES, controles sanos y tejidos animales incluidos en parafina o en OCT.

3.1.1 Evaluación histológica del contenido de colágeno en la piel

Las muestras de piel procedentes de los ensayos en el modelo animal se tiñeron mediante el método tricrómico de Masson (Sigma-Aldrich) para evaluar su contenido en colágeno. Las muestras se desparafinaron calentándolas a 60°C en un termo-bloque (Techne, Cambridge, Reino Unido), se sumergieron en xileno (Merck) 10 minutos y posteriormente se rehidrataron con alcoholes (Merck) seriados (100%, 96%, 70%) durante 2 minutos cada uno. Se post-fijaron con solución Bouin durante 15 minutos a 56°C y se lavaron abundantemente con agua. A continuación se tiñeron con hematoxilina (Vector Laboratories, CA, EEUU) durante 20 minutos y se lavaron con agua hasta retirar el exceso. Posteriormente se incubaron durante 3 minutos en solución Scotts (dilución 1/10) continuando con la solución Biebrich Scarlet durante 1 minuto y lavando extensamente con agua destilada. Tras ello, las preparaciones se sumergieron durante 20 minutos en una solución al mismo porcentaje en volumen (v/v) de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico y seguidamente en anilina el mismo tiempo. Se lavaron rápidamente con agua desionizada y se dejaron en ácido acético (Sigma-Aldrich) al 1% durante 1 minuto. A continuación, las muestras se deshidrataron en alcoholes seriados durante 1 minuto cada uno y xilenos durante 10 minutos. Por último se montaron con el medio de montaje DPX (Panreac, Barcelona, España).

La cuantificación del área de colágeno se realizó analizando el porcentaje de área de color azul obtenido tras la tinción con anilina en imágenes digitalizadas realizadas con un aumento de 200x.

3.1.2 Azul de toluidina

Las muestras rehidratadas se lavaron en agua destilada. A continuación se tiñeron con azul de toluidina (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos y se hicieron 3 lavados rápidos con agua destilada. Finalmente, las muestras se deshidrataron con alcoholes seriados y xilenos y se montaron con DPX como se explicó anteriormente.

Los datos cuantitativos del número de células cebadas se obtuvieron contando el número de células teñidas de color púrpura, debido a la tinción metacromásica de estas células, por área en imágenes digitalizadas realizadas con un aumento de 400x.

3.2 Inmunodetección

Los tejidos incluidos en parafina se cortaron en un microtomo a 4µm y se montaron en portaobjetos silanizados (Dako, CA, EEUU). Se desparafinaron y se rehidrataron como se explicó en el apartado 3.1.1. Las muestras se calentaron en microondas para la recuperación de epítomos en un tampón EDTA 1mM pH8 (Sigma-Aldrich, MO, EEUU) durante 20 minutos. Una vez atemperadas, las muestras se lavaron con tampón fosfato-salino (PBS; Invitrogen, Piesley, Reino Unido).

Las muestras congeladas en OCT se cortaron en un criostato a 8µm y se montaron en portaobjetos silanizados (Dako). Se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos a 4°C y se lavaron con PBS.

Realizados los pasos anteriores se detectaron los antígenos que eran objeto de nuestro estudio mediante anticuerpos específicos. La detección de los anticuerpos se llevó a cabo mediante inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia.

3.2.1 Inmunoperoxidasa

La detección de los anticuerpos por inmunoperoxidasa se realizó siguiendo el método indirecto de avidina-biotina-peroxidasa ABC (Vector Laboratories). En los tejidos lavados con PBS, la peroxidasa endógena se bloqueó sumergiendo las preparaciones en metanol (Lab-scan, Sowinskiego, Polonia) al 3% de H₂O₂ (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos en oscuridad. Después se bloquearon los tejidos con suero (de la misma especie animal del anticuerpo secundario) al 1,5% (en PBS con 0,5% de leche) durante 30

minutos y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario adecuado (Tabla 4) toda la noche en una cámara húmeda a 4°C. Se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG biotinilado apropiado (Tabla 5) durante 20 minutos. Se prepararon los complejos avidina-biotina según el protocolo del producto y con ellos se incubaron las secciones durante 30 minutos. Las muestras se revelaron con diaminobenzidina (DAB; Vector Laboratories) según las instrucciones del fabricante. Por último se realizó una tinción con hematoxilina y tras la deshidratación de los tejidos con alcoholes seriados y xilenos se montaron con medio DPX. Se incluyeron controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario y se incubaron con los sueros no inmunes adecuados.

Para confirmar la especificidad de la tinción de TSLP se realizaron tinciones de piel de ratón y humano preincubando el anticuerpo anti-TSLP con 40µg/ml del péptido de TSLP (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, EEUU) durante 2 horas a temperatura ambiente y en rotación.

3.2.2 Inmunofluorescencia

Las secciones se lavaron con PBS y se bloquearon con suero (de la misma especie del anticuerpo secundario) durante 30 minutos. Se realizó una tinción doble para determinar la expresión de macrófagos (MAC-2) y células IL-13 positivas con los anticuerpos primarios adecuados (Tabla 4) incubándolos toda la noche en una cámara húmeda a 4°C. Se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario específico (Tabla 5) marcado con Alexa 488 o 594 durante una hora. Los tejidos fueron teñidos con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), se lavaron con PBS y se montaron con medio FluorSave (Calbiochem, Darmstadt, Alemania). Se incluyeron controles negativos en los que se omitió el anticuerpo primario.

3.3 Obtención y cuantificación de los datos IHC

Las muestras se fotografiaron y digitalizaron con una cámara Spot RT CCD y el software Spot 4.0.4 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, EEUU) sobre un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan-2 (Zeiss, Jena, Alemania). Para cuantificar el área de colágeno o la densidad celular (células cebadas y células IL-13 positivas) se utilizó el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Antígeno	Nombre	Especie	Dilución	Casa Comercial
TSLP	L-18	Cabra anti-ratón IgG	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, EEUU
IL-13	M-17	Cabra anti-ratón IgG	1:20	Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, EEUU
IL-17	—	Conejo anti- ratón IgG	1:20	Abcam, Cambridge, Reino Unido
MAC-2	M3/38	Rata anti-ratón IgG2 α k	1: 400	Biolegend, CA, EEUU

Tabla 4. Anticuerpos primarios

Isotipo	Fluoróforo	Dilución	Anticuerpo reconocido	Casa Comercial
Caballo anti-cabra IgG	Biotinilado	1:200	Anti-TSLP Anti-IL-13	Vector Laboratories, CA, EEUU
Cabra anti-conejo IgG	Biotinilado	1:200	Anti-IL-17	Jackson ImmunoResearch, MD, EEUU
Mono anti-rata IgG	Alexa 488	1:500	Anti-MAC-2	Molecular Probes, Invitrogen, OR, EEUU
Pollo anti-cabra IgG	Alexa 594	1:500	Anti-IL-13	Molecular Probes, Invitrogen, OR, EEUU

Tabla 5. Anticuerpos secundarios

4 CULTIVOS CELULARES

A partir de las biopsias dérmicas humanas y murinas recogidas, se obtuvieron explantes con los que se establecieron los cultivos de fibroblastos dérmicos.

Las células se mantuvieron con medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Lonza, Viviers, Bélgica) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; Lonza) inactivado por calor, 20mM de glutamina (Invitrogen) y una mezcla de

antibióticos que contenía 50U/ml de penicilina y 50µg/ml de estreptomicina (Lonza). Los cultivos se mantuvieron a 37°C y en una atmósfera de CO₂ del 5%. Los ensayos se realizaron entre los pases tercero y sexto.

4.1 Tratamiento de los fibroblastos con diferentes estímulos

Para analizar la regulación de la expresión de TSLP por TGF-β, se estimularon fibroblastos dérmicos humanos con 1ng/ml de TGF-β (Calbiochem) y se mantuvieron en cultivo durante 24 horas con medio DMEM suplementado al 0,5% de FBS.

Para evaluar el papel que TSLP ejerce sobre la regulación de colágeno en los fibroblastos dérmicos humanos, se realizó una estimulación con TGF-β, 10-500ng/ml de TSLP (Recombinant Human TSLP, R&D Systems, Inc., MN, EEUU) o ambas citoquinas y se mantuvieron 24 horas en cultivo con medio DMEM al 0,5% de FBS.

Por otro lado, para analizar la regulación de la expresión de TSLP por la activación de TLRs se estimularon durante 18 horas fibroblastos dérmicos humanos y murinos con 1µg/ml de bleomicina, 10µg/ml de Pam3Cys-SKXXX (ligando de TLR-2; EMC Microcollections, Tübingen, Alemania), 20µg/ml de LPS (ligando de TLR-4; Lipopolysaccharides, Sigma-Aldrich) o 20µg/ml de poly(I:C) (ligando de TLR-3; InvivoGen, CA, EEUU).

Las células se recogieron una vez terminado el tiempo de incubación para la extracción de ARNm, para ello se guardaron hasta su procesamiento a -80°C con 1ml de TRI Reagent (Sigma-Aldrich).

4.2 Estimulación de los fibroblastos con plasma de pacientes con ES

Para analizar si algún componente presente en el plasma regulaba la expresión de TSLP, se realizaron ensayos con fibroblastos dérmicos humanos sanos mantenidos en cultivo con DMEM suplementado al 0,5% de FBS. Cuando los fibroblastos alcanzaron el estado de confluencia, se cambió el medio por DMEM sin FBS. Pasadas 24 horas, se estimularon con 10% de plasma de controles sanos y pacientes con esclerodermia (previamente centrifugados a 20.000g 10 minutos y descomplementados a 56°C durante 45 minutos) y se incubaron durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se recogieron los sobrenadantes y se conservaron a -80°C para analizar posteriormente la concentración de TSLP mediante ELISA.

5 EXTRACCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (QPCR)

La extracción de ARN total de los tejidos murinos se llevó a cabo con el RNeasy Micro Kit (Qiagen, Copenhague, Dinamarca) siguiendo las recomendaciones del fabricante, mientras que la de los pellets celulares conservados en TRI Reagent se realizó siguiendo las instrucciones del producto. El ADN complementario se sintetizó a partir de 1µg de ARN mediante el High capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, CA, EEUU).

Los niveles de expresión génica se midieron mediante PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real en un 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystem). Se usaron sondas Taqman (Applied Biosystem) para cuantificar la expresión de *Collα(1)*, TSLP y GAPDH humano. Para cuantificar expresión en genes de ratón se utilizaron las parejas de oligos listadas en la tabla 6 mediante SYBR Green (power SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems).

Oligonucleótido	Secuencia directa 5'→3'	Secuencia reversa 5'→3'
GAPDH	CATGGCCTTCCGTGTTCTTA	GCGGCACGTCAGATCCA
TSLP	TCGAGCAAATCGAGGACTGTG	CAAATGTTTTGTCGGGGAGTGA
IL-4	CCCCAGCTAGTTGTCATCCTG	CGCATCCGTGGATATGGCTC
IL-13	TGAGCAACATCACACAAGACC	GGCCTTGCGGTTACAGAGG
IFN-γ	GCGGCTGACTGAACTCAGATT	CACTGCAGCTCTGAATGTTTCTTATT
IL-17	GCAATGAAGACCCTGATAGATATCC	TTCATGTGGTGGTCCAGCTTT

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos de ratón utilizadas en la PCR cuantitativa mediante SYBR Green.

En tejido de ratón, la cuantificación relativa se realizó comparando la expresión del gen diana normalizado al gen endógeno usado como referencia (GAPDH) mediante curvas estándar. En los ensayos con cultivos celulares, la cuantificación relativa se hizo por el método comparativo de las Cts donde la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ representa las diferencias de expresión del gen diana en una muestra tratada comparada con la muestra basal y previamente normalizadas con la expresión del gen endógeno GAPDH. Antes de usar el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ se comprobó que las eficiencias de las parejas de oligonucleótidos de los genes diana y endógeno eran similares.

6 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN HIDROXIPROLINA

Las muestras de piel de ratón fueron deshidratadas con alcoholes seriados (96%, 100%) durante 30 minutos, pesadas e hidrolizadas en 1ml de ácido clorhídrico (Panreac) 6N a 120°C durante 8 horas. Posteriormente se neutralizaron con hidróxido sódico (NaOH; Carlo Erba Reagenti, Rodano, Milán) 6N y se secaron en un concentrador plus (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) toda la noche. Se añadieron 50µl de buffer citrato-acetato pH6 (5% ácido cítrico, 3,4% NaOH (Carlo Erba), 7,24% acetato sódico (Sigma-Aldrich), 1,2% ácido acético glacial (Merck)) y 1ml de Cloramina-T trihidratada al 98% (Sigma-Aldrich) y se mantuvieron 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación se añadió 1ml de solución Ehrlich (6,75g 4-dimetilaminobenzaldehído, 27,9ml n-propanol, 11,7ml ácido perclórico (Sigma-Aldrich)) y se incubaron durante 15 minutos a 65°C. Se enfriaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 550nm. Se utilizaron distintas diluciones de trans-4-hydroxy-L-proline (Sigma-Aldrich) para la realización de una curva estándar. Los datos obtenidos se expresaron en mg/g de tejido.

7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS MEDIANTE ELISA

La cantidad de TSLP humano liberado por los fibroblastos en los sobrenadantes recogidos tras 24 horas de estimulación con plasma de pacientes con ES y de individuos sanos se cuantificó mediante el kit *human TSLP max deluxe set* (BioLegend, CA, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La determinación de la concentración de IL-17 murina se realizó a partir de muestras de piel que fueron congeladas tras el sacrificio de los ratones y mantenidas a -80°C hasta su

procesamiento. El tejido se homogeneizó en nitrógeno líquido evitando la descongelación de la muestra y posteriormente se pesó para obtener el peso en seco. Se añadieron 250µl de Tritón X-100 al 0,25% en PBS y se dejaron toda la noche rotando a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 3.000g durante 15 minutos y se recogieron los sobrenadantes. Se siguieron las indicaciones del kit *mouse IL-17A ELISA max standard* (BioLegend) para obtener la cantidad de la citoquina en piel.

8 ANÁLISIS DE POBLACIONES CELULARES MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Las suspensiones celulares se obtuvieron a partir de ganglios linfáticos inguinales de ratón mediante separación mecánica. Una vez recogidas se sembraron 400.000 células por pocillo en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium, Lonza) completo y se estimularon con 20ng/ml de PMA (de *Phorbol Myristate Acetate*) (Sigma-Aldrich) y 1µg/ml de ionomicina (Sigma-Aldrich), en presencia de 10µg/ml de brefeldina A (Sigma-Aldrich) durante 4 horas a 37°C al 5% de CO₂. Transcurrido ese tiempo se realizó una tinción extracelular con anticuerpo de rata anti-ratón CD4-PerCP (clon RM4-5, BD Biosciences, CA, EEUU) durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Tras lavar las muestras con buffer (PBS al 0,5% de BSA, EDTA 2mM), se centrifugaron a 500g durante 5 minutos, se fijaron con cytofix/cytoperm (BD Biosciences) durante 15 minutos a 4°C en oscuridad y se permeabilizaron con buffer de permeabilización (PBS al 0,5% de BSA, EDTA 2mM, 0,5% saponina), durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

A continuación se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente con suero de rata y se tiñeron intracelularmente con los anticuerpos apropiados (Tabla 7) durante 30 minutos en oscuridad a 4°C. Las combinaciones de anticuerpos que se realizaron fueron las siguientes:

- Marcaje triple IFN- γ ⁺/IL-17⁺/CD4⁺ (Th1/Th17).
- Marcaje triple IL-10⁺/IL-4⁺/CD4⁺ (Th2).

Por último se lavaron las células, se resuspendieron en PBS y se analizaron con el Citómetro FACSCalibur (BD Biosciences).

La adquisición y análisis de las muestras se realizó con el programa Cell Quest Pro (BD Biosciences). En primer lugar, se definió la población de linfocitos del total de células de ganglio linfático inguinal por su tamaño y complejidad y se seleccionó la región de interés correspondiente a las células positivas según la tinción. Posteriormente se calculó el porcentaje de estas células productoras de citoquinas.

Anticuerpo	Fluoróforo	Clon	Casa Comercial
INF- γ	FITC	XMG1.2	BD Biosciences, CA, EEUU
IL-17	PE	TC11-18H10	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania
IL-10	FITC	JES5-16E3	BD Biosciences, CA, EEUU
IL-4	PE	11B11	BD Biosciences, CA, EEUU

Tabla 7. Anticuerpos utilizados en citometría de flujo

9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio estadístico se empleó el software Prism versión 4.00 (GraphPad Software, CA, EEUU). Los resultados fueron expresados como media \pm ES. Para la comparación de medias se utilizó el test de la U de Mann-Whitney. Los resultados obtenidos en los ensayos con citometría de flujo se analizaron mediante una comparación de medias entre más de dos grupos con un ANOVA de una vía utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos obtenidos en los ensayos celulares se analizaron con el test no paramétrico de Wilcoxon, en el que se compararon las medias de los grupos de células estimuladas respecto al grupo control. Los valores $p < 0.05$ se consideraron significativos.

V. RESULTADOS

1 INDUCCIÓN DE FIBROSIS MEDIADA POR BLEOMICINA

Las inyecciones subcutáneas de bleomicina administradas diariamente durante 4 semanas a las hembras C3H de 6 semanas de edad provocaron una marcada fibrosis dérmica caracterizada por un incremento de fibras de colágeno y por la presencia de un infiltrado inflamatorio, mientras que no se observaron cambios histológicos en los ratones del grupo control (inyección de suero salino). Para cuantificar la fibrosis, como acumulación de colágeno, se realizó una tinción tricrómica de Masson de la piel tras el sacrificio de los ratones. Como resultado de esta tinción, el colágeno se tiñe específicamente de color azul por la anilina.

El estudio reveló un aumento significativo del grosor de la dermis, ocupado por colágeno, y una disminución de la capa de grasa subcutánea en los ratones inyectados con bleomicina al compararlos con los ratones control (Figura 4A-B). Asimismo se observó una hiperplasia de la epidermis en los ratones del grupo de la bleomicina, con un aumento del número de capas celulares epidérmicas como se indica en la figura 4C-D. Otro cambio asociado a la fibrosis en este y otros modelos es un aumento de la densidad y degranulación de los mastocitos [156, 365-367]. Con objeto de analizar la densidad de los mastocitos, se realizaron tinciones con azul de toluidina con la que se tiñen específicamente de color púrpura debido a la metacromasia característica de estas células. Se confirmó un aumento en la densidad de mastocitos en el grupo de ratones inyectados con bleomicina comparado con el grupo de ratones control (Figura 4E-F). Todos estos cambios histológicos se analizaron de forma cuantitativa observándose cambios estadísticamente significativos en el área de colágeno ($p < 0,0001$), el engrosamiento epidérmico ($p = 0,016$) y el número de mastocitos por área ($p = 0,002$) entre los grupos de ratones tratados con bleomicina y el grupo control (Figura 4G-I).

2 EXPRESIÓN DE TSLP EN EL MODELO DE FIBROSIS INDUCIDA POR BLEOMICINA

Con objeto de estudiar la expresión de TSLP en el modelo de fibrosis, se realizaron estudios IHC con un anticuerpo policlonal anti-TSLP y de qPCR en las muestras de piel de ratón recogidas tras el sacrificio.

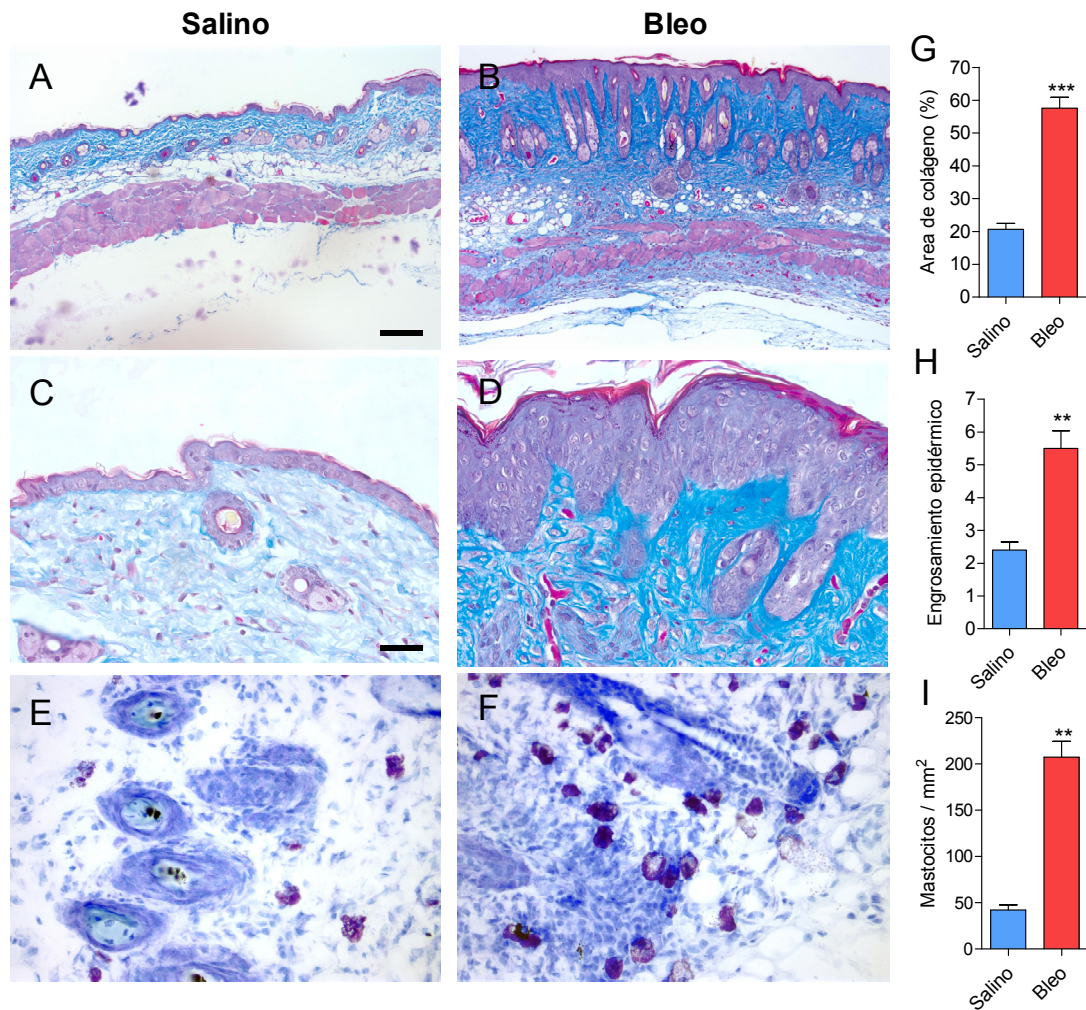


Figura 4. Cambios en la piel inducidos por bleomicina. Tinción tricrómica de Masson de piel representativa del grupo control (A) o tratado con inyecciones diarias de bleomicina 1mg/ml durante 4 semanas (B). Comparación de la epidermis en ambos grupos (C y D). Tinción con azul de toluidina en la que se muestran los mastocitos (E y F). Análisis cuantitativo del área de colágeno (G) $***p < 0,0001$, del número de capas de queratinocitos en la epidermis (H) $**p < 0,01$ y del número de mastocitos por mm^2 en ambos grupos (I) $**p < 0,001$. Barra 100 μm (A-B) y 50 μm (C-D).

En las muestras procedentes de los ratones del grupo control se observó una expresión basal de TSLP restringida a los queratinocitos de la epidermis y a los mastocitos de la dermis (Figura 5B), mientras que en las muestras del grupo con fibrosis por bleomicina se observó una expresión más generalizada por otros tipos celulares como células mononucleares y fibroblastos, además de un aumento global asociado a un incremento en la densidad de los mastocitos y al aumento del número de capas celulares epidérmicas (Figura 5C). La expresión de TSLP por los mastocitos se confirmó

morfológicamente mediante la tinción de cortes seriados consecutivos, con azul de toluidina (Figura 6A-B).

La especificidad de la inmunodetección de TSLP fue confirmada realizando una tinción con suero no inmune (Figura 5A) y mediante experimentos de bloqueo del anticuerpo preincubado con el péptido TSLP (Figura 5D-E).

Para confirmar cuantitativamente el aumento en la expresión de TSLP en la piel fibrótica, se analizó mediante qPCR la expresión de su ARNm, observándose un aumento estadísticamente significativo en el grupo de ratones tratados con bleomicina ($p=0,0006$) (Figura 5F).

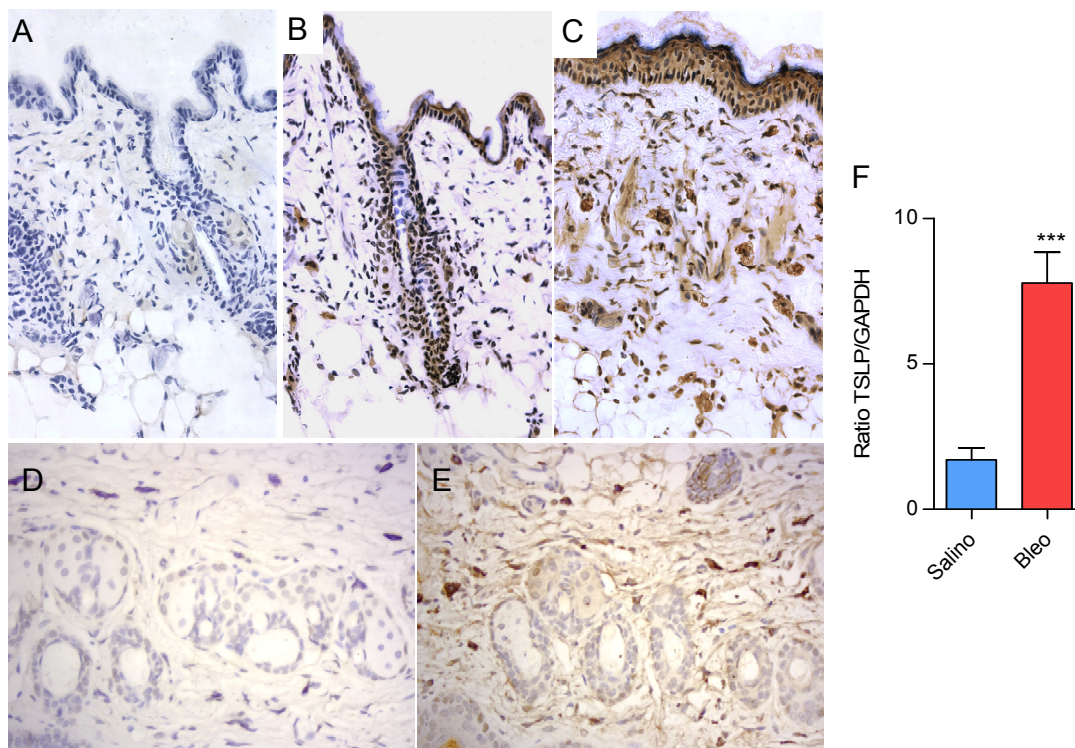


Figura 5. Análisis IHC y cuantitativo de la expresión de TSLP en la piel en el modelo de fibrosis por bleomicina. Tinción IHC con anti-TSLP en la piel de los ratones. Control negativo del anticuerpo secundario (A), muestra de piel del grupo control (B) y sección de piel del grupo tratado con bleomicina (C). Imágenes de un área rica en células cebadas teñidas con el anticuerpo anti-TSLP preincubado con 40 μ g/ml del péptido TSLP (D) o sin péptido (E). El análisis cuantitativo del ARNm de TSLP mediante qPCR muestra diferencias significativas entre los dos grupos (F), *** $p<0,001$.

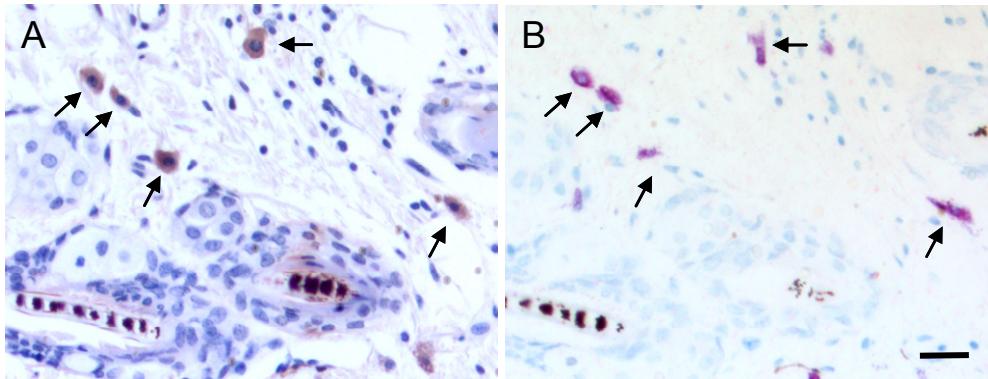


Figura 6. Expresión de TSLP en células cebadas en la piel. Análisis de secciones consecutivas de piel teñidas con el anticuerpo anti-TSLP (A) o con azul de toluidina (B). Las flechas muestran colocalización de la expresión de TSLP y la tinción metacromásica de las células cebadas. Barra 50 μ m.

3 EXPRESIÓN DE TSLP EN TEJIDOS FIBRÓTICOS HUMANOS

Para evaluar la expresión de TSLP en enfermedades fibróticas humanas, se realizaron estudios IHC en biopsias procedentes de piel de pacientes con ES, tejido pulmonar de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (NIU) y controles sanos.

Como control positivo se utilizó timo humano, donde se observó expresión de TSLP en los corpúsculos de Hassall (Figura 7A), mientras que no se detectó expresión de TSLP en las muestras de piel de controles sanos (Figura 7B) como se había descrito previamente [288]. En la piel de pacientes con ES se observó expresión de TSLP en 14 de las 18 muestras analizadas (78%) (Figura 7C-D), localizándose en los queratinocitos de la epidermis y en células de la dermis incluyendo fibroblastos, células cebadas y células mononucleares. Al igual que en los ratones, los controles de la tinción con suero no inmune (Figura 7E) o bloqueando el anticuerpo con el péptido de TSLP confirmaron la especificidad de la inmunodetección de TSLP (Figura 8A-B).

Por otro lado, en los estudios IHC realizados en pulmón normal se observó expresión de TSLP en algunas células cebadas (Figura 9A). En las secciones procedentes de tejidos con fibrosis pulmonar, se observó un incremento en la expresión de TSLP asociado a un aumento de la densidad de células cebadas, a la expresión en células epiteliales y, aunque más débil, en fibroblastos (Figura 9B-D).

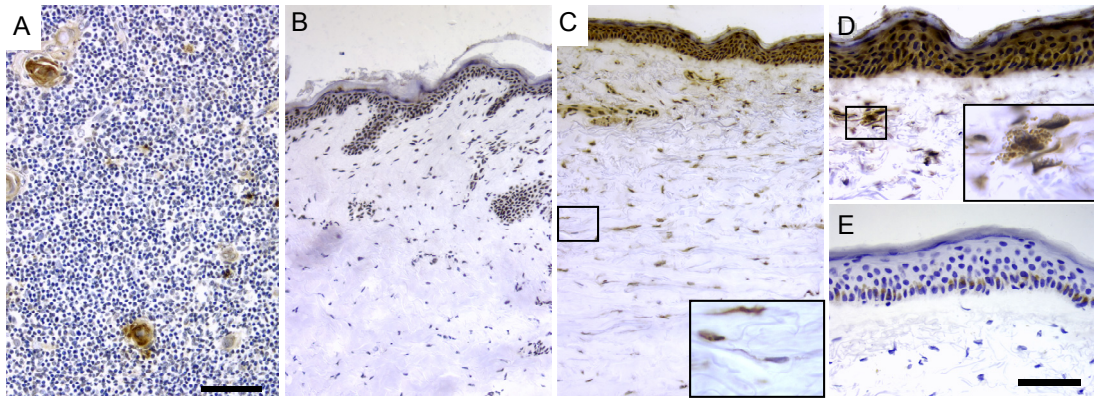


Figura 7. Expresión de TSLP en tejidos de pacientes con ES. Control positivo de la IHC con anti-TSLP en una muestra de timo humano (A). Detección de TSLP en piel normal (B) o con ES (C-E). Aumento de la epidermis en ES, teñida con el anticuerpo anti-TSLP (D) y control negativo del anticuerpo secundario (E). Detalle de una célula cebada (D) y fibroblastos marcados (ampliación en C). Barra 100 μm (A-C) y 50 μm (D-E).

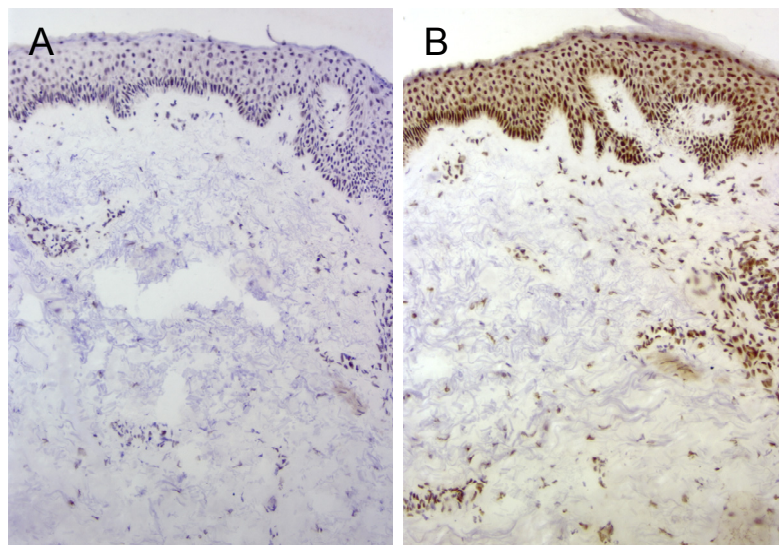


Figura 8. Neutralización de TSLP en tejidos de ES. Estudio IHC con anticuerpo anti-TSLP preincubado con 40 $\mu\text{g/ml}$ del péptido de TSLP (A) o sin péptido (B) en piel de un paciente con ES.

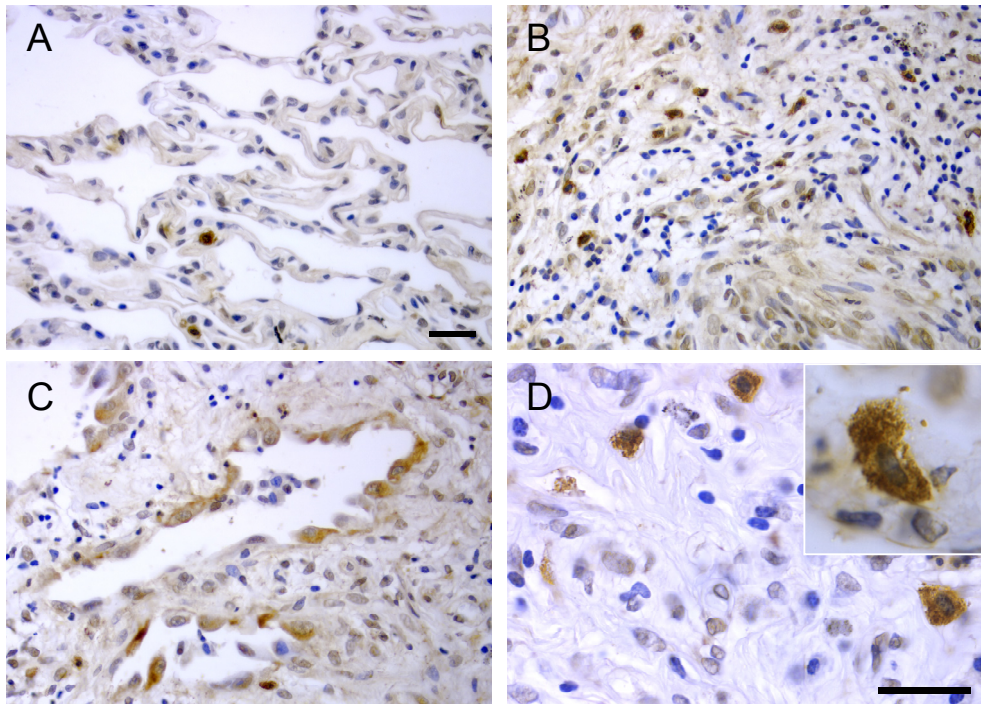


Figura 9. Estudio IHC de la expresión de TSLP en tejidos de fibrosis pulmonar primaria (NIU). Pulmón sano (A) y pulmón fibrótico (B-D). Detalle de la expresión epitelial de TSLP (C) y de mastocitos (D) en muestras de pacientes con fibrosis pulmonar. Barra 50 μ m.

4 REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TSLP EN FIBROBLASTOS DÉRMICOS

4.1 Regulación de la expresión de TSLP mediada por TLRs

Para identificar potenciales factores inductores de expresión de TSLP en la fibrosis, y basándonos en estudios previos que han mostrado una participación de las respuestas mediadas por los TLRs en la regulación de la expresión de TSLP, así como su participación en los procesos fibróticos [299, 302], se realizaron ensayos para analizar si la activación de los TLRs podría inducir la expresión génica de TSLP. Para ello se estimularon fibroblastos dérmicos humanos y murinos con los agonistas de TLR-2, TLR-3 y TLR-4 (Pam3Cys-SK KKK, Poly(I:C) y LPS respectivamente) incluyendo bleomicina como potencial agonista de TLR-2 [368-369].

En los cultivos de fibroblastos dérmicos humanos, la estimulación con el agonista de TLR-3, Poly(I:C), provocó un incremento significativo de la expresión de ARNm de

TSLP ($8,4\pm 5,4$, $p=0,008$), mientras que no se modificó de forma significativa al estimular con los agonistas de TLR-2 o TLR-4 ni con bleomicina (Figura 10A).

En los cultivos de fibroblastos murinos, la estimulación con el agonista de TLR-2 y el agonista de TLR-3 indujeron un aumento de la expresión de ARNm de TSLP ($17,81\pm 7,7$ y $30,95\pm 1,5$ respectivamente, $p<0,05$). La estimulación con el agonista de TLR-4 provocó un ligero incremento en la expresión de ARNm TSLP aunque no de forma significativa. No se observaron cambios en la expresión de TSLP al estimular con bleomicina (Figura 10B).

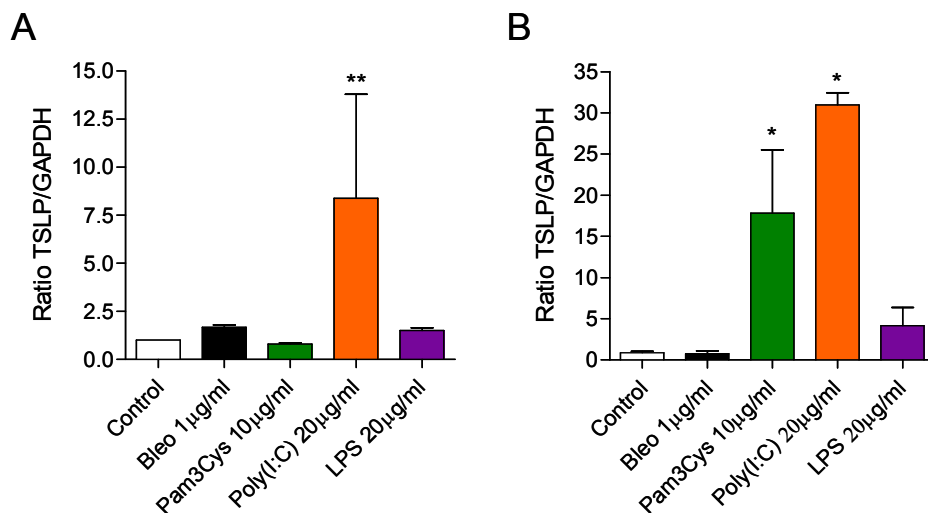


Figura 10. Expresión de ARNm de TSLP en cultivos de fibroblastos estimulados con agonistas de TLRs. Fibroblastos dérmicos humanos (A) y murinos (B) se incubaron durante 18h con bleomicina o con los diferentes agonistas de TLRs como se indicó anteriormente. El ratio de ARNm de TSLP/GAPDH se analizó mediante qPCR (media±ES). Las gráficas son representativas de cinco experimentos independientes en fibroblastos dérmicos humanos y tres experimentos independientes en fibroblastos dérmicos de ratón (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

Estudios previos en LES han mostrado que los inmunocomplejos circulantes (autoanticuerpo-autoantígeno) son capaces de activar TLRs induciendo respuestas celulares defensivas, como la producción de IFN- α . Para analizar si la presencia de algún componente presente en el plasma de pacientes con ES podría participar en la regulación de TSLP, se analizó la concentración de TSLP en sobrenadantes de fibroblastos dérmicos humanos estimulados con plasma de individuos sanos ($n=4$) o de pacientes con ES con anticuerpos Scl-70 ($n=5$, Scl70+) y sin anticuerpos Scl-70 ($n=5$, Scl70-) durante 24 horas. Los datos obtenidos mediante ELISA no mostraron

diferencias en la expresión de la proteína TSLP por los fibroblastos entre los tres grupos (Figura 11).

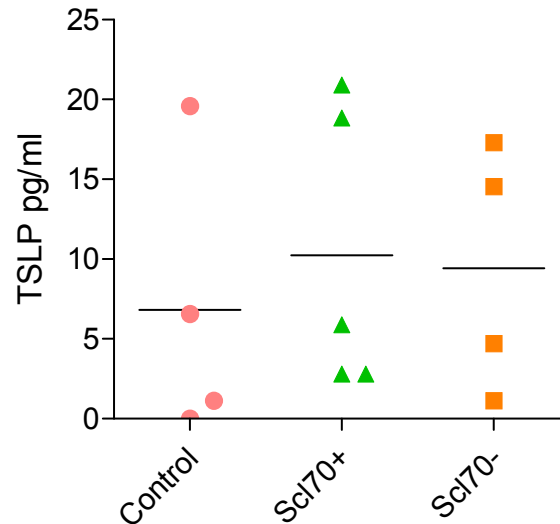


Figura 11. Expresión de TSLP en cultivos de fibroblastos. Cuantificación de TSLP en sobrenadantes de fibroblastos dérmicos en presencia de plasma de individuos sanos o pacientes con ES con anticuerpos Scl70 (Scl70+) o sin anticuerpos (Scl70-) durante 24 horas.

4.2 Regulación de la expresión de TSLP en fibroblastos dérmicos por TGF- β

Para analizar si la expresión de TSLP está regulada por TGF- β , se llevaron a cabo ensayos de estimulación de fibroblastos dérmicos humanos con TGF- β durante 24 horas. Mediante qPCR se estudió la expresión de ARNm de TSLP y de procolágeno α 1(I) como control de activación transcripcional por TGF- β . Mientras que la expresión de procolágeno se vio aumentada 2,5 veces en las células estimuladas con TGF- β comparadas con células sin estimular (control), no se encontraron cambios en la expresión del ARNm de TSLP (Figura 12).

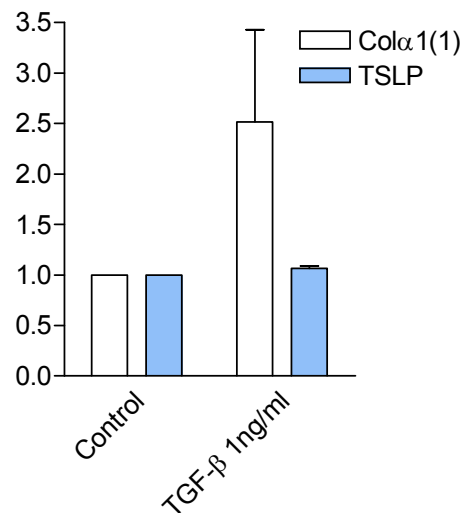


Figura 12. Estudio de la regulación de TSLP por TGF-β. Análisis de la expresión de ARNm de procolágeno α 1(I) y TSLP en cultivos de fibroblastos dérmicos estimulados con TGF- β durante 24 horas. La gráfica es representativa de tres experimentos independientes.

5 ANÁLISIS DEL PAPEL DE TSLP EN LA REGULACIÓN DEL COLÁGENO

Aunque estudios previos [288] no han detectado expresión de TSLPR en fibroblastos humanos, para descartar completamente un potencial efecto directo de TSLP sobre los mismos, se analizó la expresión de ARNm de procolágeno en fibroblastos dérmicos humanos estimulados con TSLP, TGF- β o ambas citoquinas a distintas concentraciones durante 24 horas. El análisis mediante qPCR mostró un aumento en la expresión de ARNm de procolágeno α 1(I) en los fibroblastos estimulados sólo con TGF- β , mientras que las diferentes concentraciones de TSLP utilizadas no provocaron ningún cambio significativo. Asimismo, los fibroblastos estimulados con ambas citoquinas no mostraron diferencias en la expresión de ARNm de procolágeno α 1(I) (Figura 13), descartando una implicación de TSLP en la expresión de colágeno en la fibrosis.

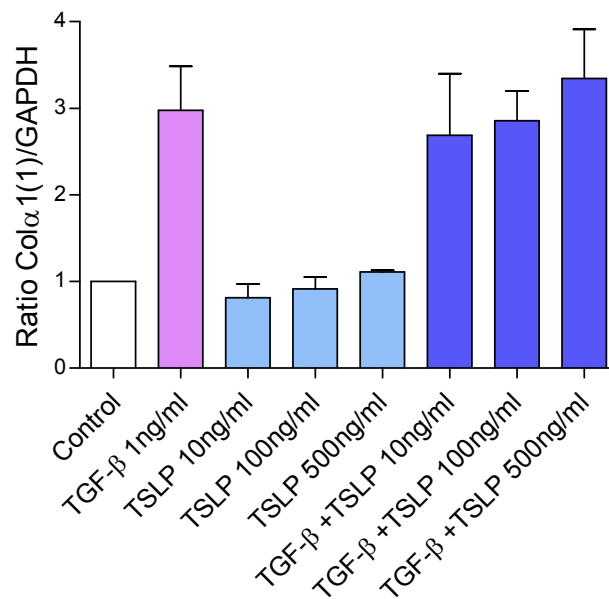


Figura 13. Estudio de la regulación de colágeno mediada por TSLP. Análisis de la expresión de colágeno en cultivos estimulados con TGF-β, TSLP o ambas citoquinas durante 24 horas. La gráfica es representativa de dos experimentos independientes.

6 MODELO DE FIBROSIS INDUCIDA POR BLEOMICINA EN RATONES DEFICIENTES PARA EL RECEPTOR DE TSLP

6.1 Fibrosis por bleomicina en ratones TSLPR^{-/-}

Para analizar la relevancia de TSLP en el desarrollo de la fibrosis dérmica se compararon las respuestas fibróticas en los ratones TSLPR^{-/-} (KO) y WT en el modelo de fibrosis inducido por bleomicina.

En ambos grupos se observó un incremento de la fibrosis dérmica (Figura 14A) y del área de colágeno en la piel tras las inyecciones de bleomicina al compararlos con el grupo control (inyección de suero salino). La cuantificación del área de colágeno mostró un incremento estadísticamente significativo entre el grupo WT inyectado con bleomicina y el grupo control ($p < 0,0001$), similar a lo que se observó en los ensayos realizados en la cepa de ratones C3H. El área fibrótica se redujo significativamente en el grupo de ratones KO comparado con el grupo WT ($p = 0,002$) (Figura 14B).

El análisis del contenido en hidroxiprolina mostró un incremento estadísticamente significativo en el grupo de ratones WT inyectados con bleomicina frente al grupo de ratones control ($p = 0,004$). En los ratones KO se observó una reducción estadísticamente

significativa del contenido en hidroxiprolina comparados con los ratones WT inyectados con bleomicina ($p=0,039$) (Figura 14C).

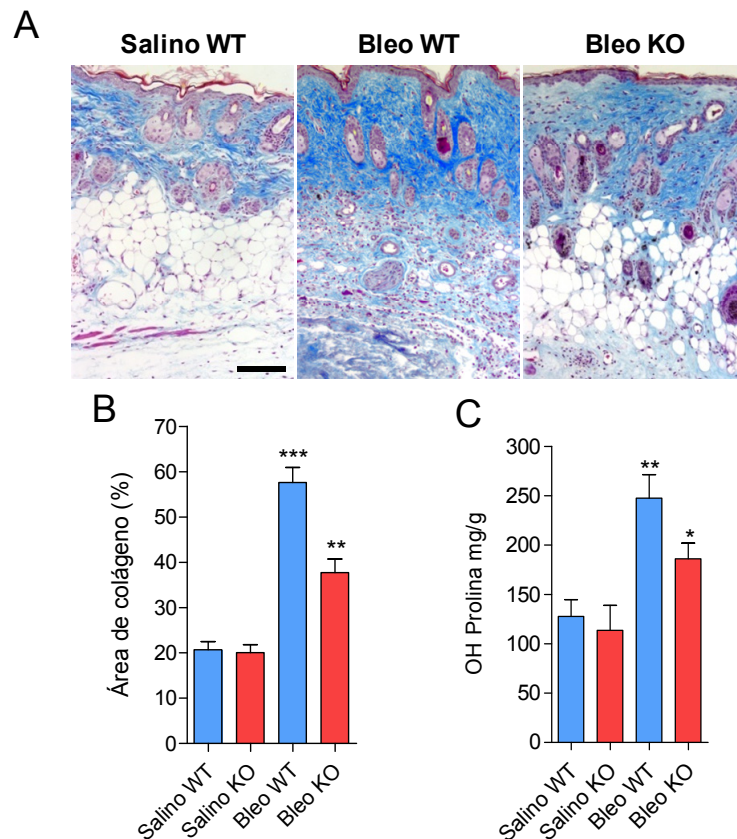


Figura 14. Modelo de fibrosis inducida por bleomicina en ratones $TSLPR^{-/-}$. Análisis del área de colágeno de la piel (A, B); *** $p<0,001$ Bleo WT vs salino WT y ** $p<0,01$ Bleo KO vs Bleo WT. Análisis del contenido de colágeno medido como contenido en hidroxiprolina por tejido en peso seco (C); ** $p<0,01$ Bleo WT vs Salino WT y * $p<0,05$ Bleo KO vs Bleo WT. Los datos son representativos de tres experimentos independientes con 10 ratones por grupo. Barra 100 μm .

6.2 Análisis de la expresión local de citoquinas en los ratones $TSLPR^{-/-}$

A partir de los resultados obtenidos en el modelo de fibrosis mediada por bleomicina en los ratones $TSLPR^{-/-}$, se analizó si la disminución de la fibrosis estaba asociada con una modificación de los niveles de expresión de citoquinas implicadas en respuestas Th1, Th2 o Th17. Para ello se determinaron los cambios de expresión de ARNm de IL-13, IL-17, IL-4 e IFN- γ en las muestras de piel de ratón.

El análisis de la expresión de ARNm de IL-13 mediante qPCR mostró un incremento significativo entre el grupo de ratones WT tratados con bleomicina y el grupo control

($p=0,006$). En los ratones KO se observó una disminución estadísticamente significativa de la expresión de ARNm de IL-13 comparado con los WT inyectados con bleomicina ($p=0,033$).

Los niveles de expresión de ARNm de IL-17 se incrementaron significativamente entre los ratones WT tratados con bleomicina y el grupo control ($p=0,0008$), y se observó una disminución significativa en los ratones KO comparados con los WT inyectados con bleomicina ($p=0,026$). No se observaron cambios significativos en la expresión de ARNm de IL-4 e IFN- γ en ninguno de los tres grupos de ratones (Figura 15).

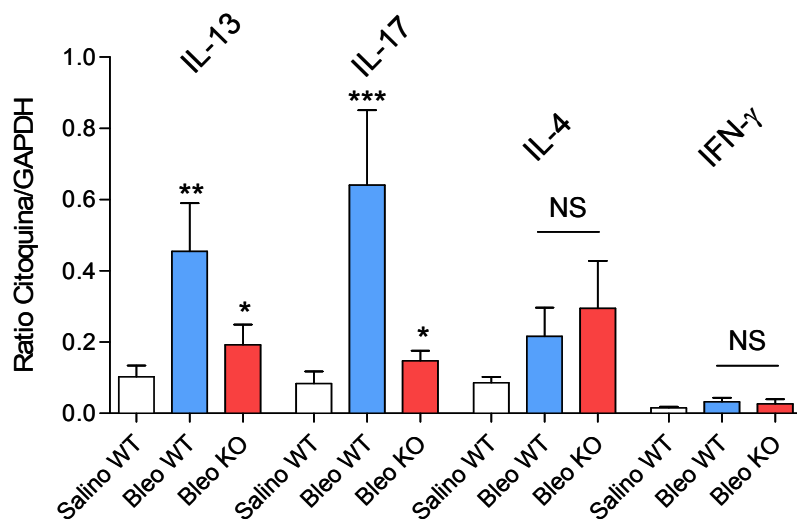


Figura 15. Expresión de citoquinas en las lesiones fibróticas en ratones WT y KO. Cuantificación de la expresión de ARNm de citoquinas IL-13 (** $p<0,01$ Bleo WT vs Salino y * $p<0,05$ Bleo KO vs Bleo WT), IL-17 (***) $p<0,001$ Bleo WT vs Salino y * $p<0,05$ Bleo KO vs Bleo WT), IL-4 e IFN- γ en ratones inyectados con bleomicina (WT y KO) comparados con el grupo control (salino). Los datos son representativos de tres experimentos independientes con 10 ratones por grupo.

6.3 Determinación IHC de la expresión de IL-13 e IL-17 en la piel fibrótica.

Para confirmar los cambios observados en la expresión dérmica de ARNm de IL-13 e IL-17, se realizaron análisis IHC en la piel de los ratones.

La IHC con el anticuerpo anti-IL-13 demostró un aumento de la densidad de células mononucleares IL-13 positivas en la dermis en los ratones del grupo WT inyectados con bleomicina ($p=0,009$) comparado con los ratones del grupo control. En el grupo de ratones KO, la bleomicina indujo un aumento significativamente menor en la densidad de células IL-13 positivas comparado con los ratones WT ($p=0,008$) (Figura 16A-B).

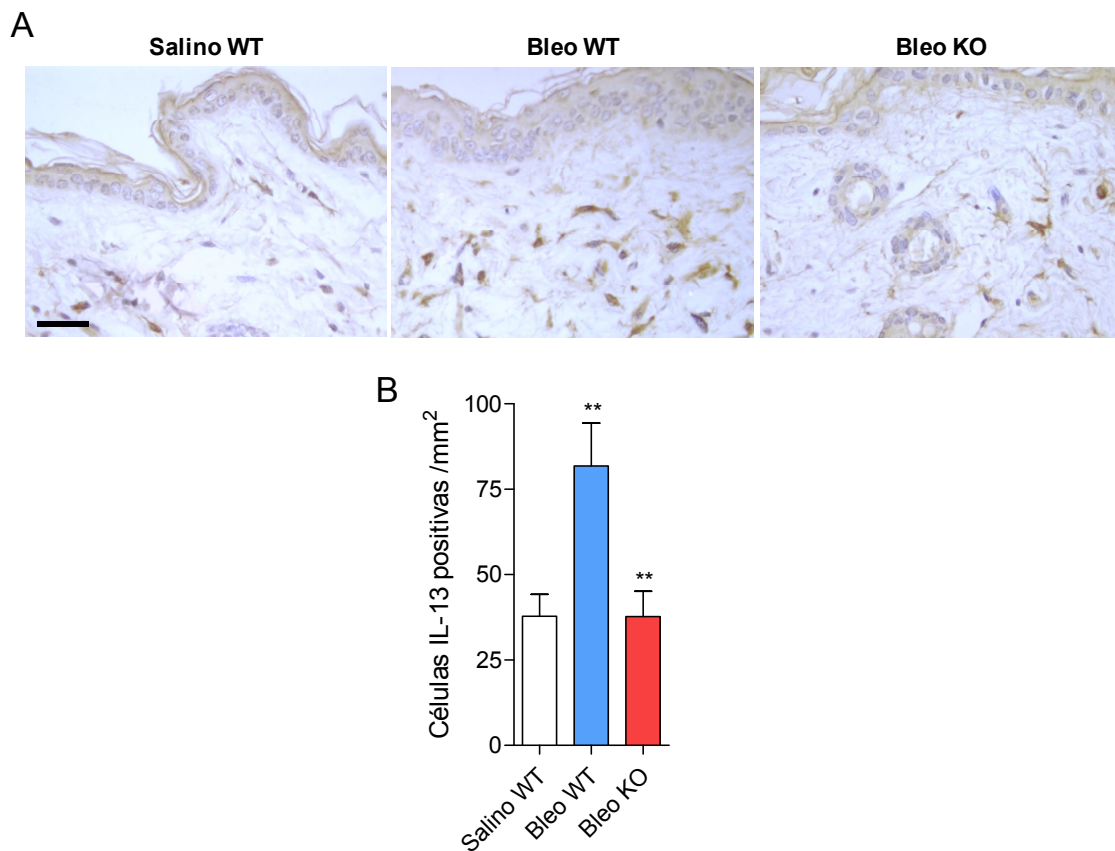


Figura 16. Expresión de IL-13 en muestras de piel de ratón. Análisis IHC de la expresión de IL-13 en secciones de piel de ratones WT y KO: Imágenes representativas de la IHC con el anticuerpo anti-IL-13 (A). Número de células positivas por área en los diferentes grupos (B); ** $p<0,01$ Bleo WT vs Salino y Bleo KO vs Bleo WT. Los datos son representativos de tres experimentos independientes con 10 ratones por grupo. Barra 25 μ m.

Estudios previos realizados en pacientes con ES han detectado células IL-13 positivas en piel que han sido identificadas como macrófagos [370]. Además, en diferentes trabajos con el modelo animal de fibrosis inducida por bleomicina se ha confirmado el papel de las células del sistema innato en la producción de IL-13 [212-213], sugiriendo que células como macrófagos o DCs son la fuente principal de IL-13 en la fibrosis. Para comprobar si los macrófagos de la dermis eran las células productoras de IL-13 en el modelo de bleomicina, se realizó un doble marcaje con el anticuerpo anti-IL-13 y el anticuerpo MAC-2, un marcador de macrófagos. Se detectó colocalización entre los dos marcadores, confirmando que las células que expresaban IL-13 eran mayoritariamente macrófagos (Figura 17).

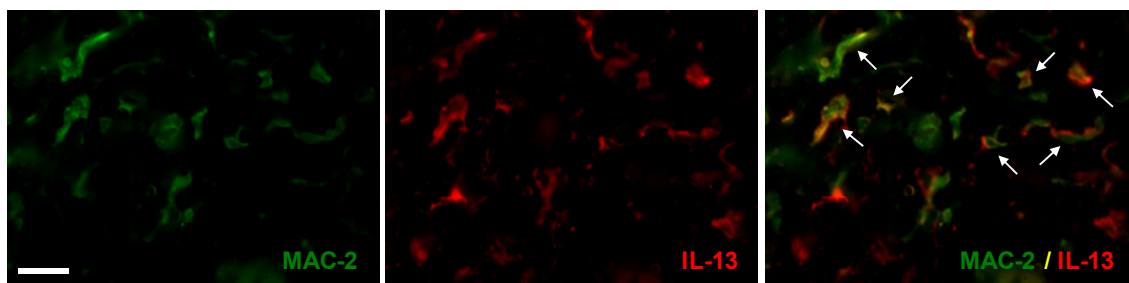


Figura 17. Identificación de células productoras de IL-13 en piel de ratón. Doble marcaje por inmunofluorescencia de macrófagos (MAC-2, verde) e IL-13 (rojo). Las flechas señalan células dobles positivas MAC-2⁺/IL-13⁺. Barra 12.5 μ m.

Por otro lado, IL-17 no se detectó mediante IHC en la piel de ratones inyectados con suero salino o bleomicina (Figura 18C-D), aunque sí se observó expresión de la proteína en el bazo de ratón utilizado como control positivo tal y como se muestra en la figura 18 A y B.

En los homogenados de piel, los niveles de IL-17A determinados mediante ELISA fueron menores a 1pg/mg en todos los grupos (Figura 18E), indicando un bajo nivel de expresión dérmica de la proteína de IL-17 en este modelo.

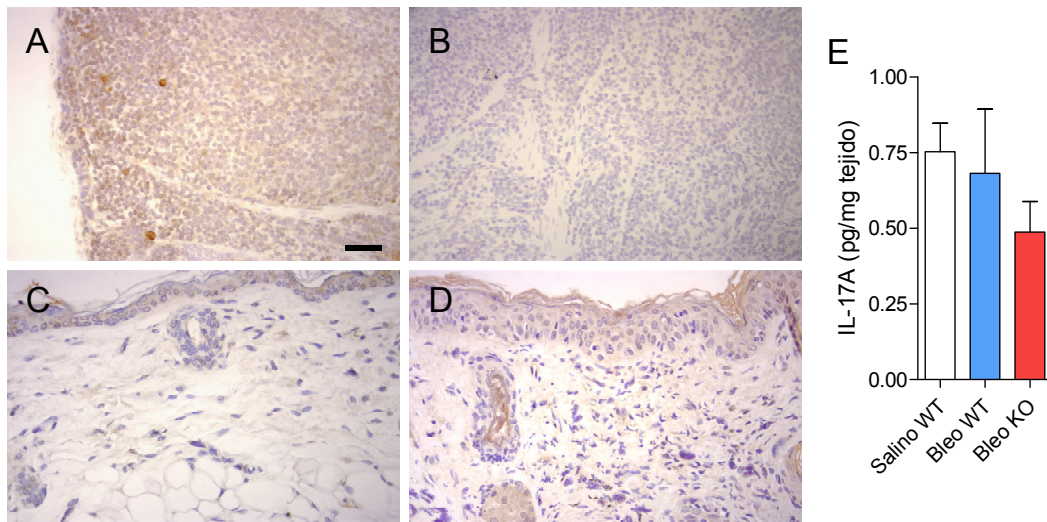


Figura 18. Expresión de IL-17 en muestras de piel de ratones. Análisis IHC de la expresión de IL-17 en la piel de ratones y en tejidos controles: Tinción del bazo de ratón (control positivo) con anticuerpo anti-IL-17 (A). Control negativo del anticuerpo secundario (B). Muestra de piel del grupo control (C) o inyectada con bleomicina (D). Análisis mediante ELISA de la concentración de IL-17A en tejido pulverizado (E). Los datos son representativos de tres experimentos independientes con 10 ratones por grupo. Barra 50 μ m.

6.4 Análisis de las poblaciones celulares T en ratones TSLPR^{-/-}

Para valorar otros posibles cambios sistémicos en la expresión de citoquinas por células T en este modelo en ratones deficientes en el receptor de TSLP se analizaron las diferentes poblaciones de linfocitos T CD4 (Th1, Th2 y Th17) en células de ganglios linfáticos inguinales.

El número de células totales de los ganglios, analizadas mediante citometría de flujo, disminuyó significativamente ($p < 0,001$) en ambos grupos de ratones con fibrosis al compararlos con los ratones del grupo control (Figura 19A). En cambio el porcentaje de células T CD4⁺ y los niveles de expresión de las diferentes citoquinas (IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- γ) fueron comparables entre los diferentes grupos (Figura 19B-F), descartando cambios sistémicos en la polarización de células T en este modelo.

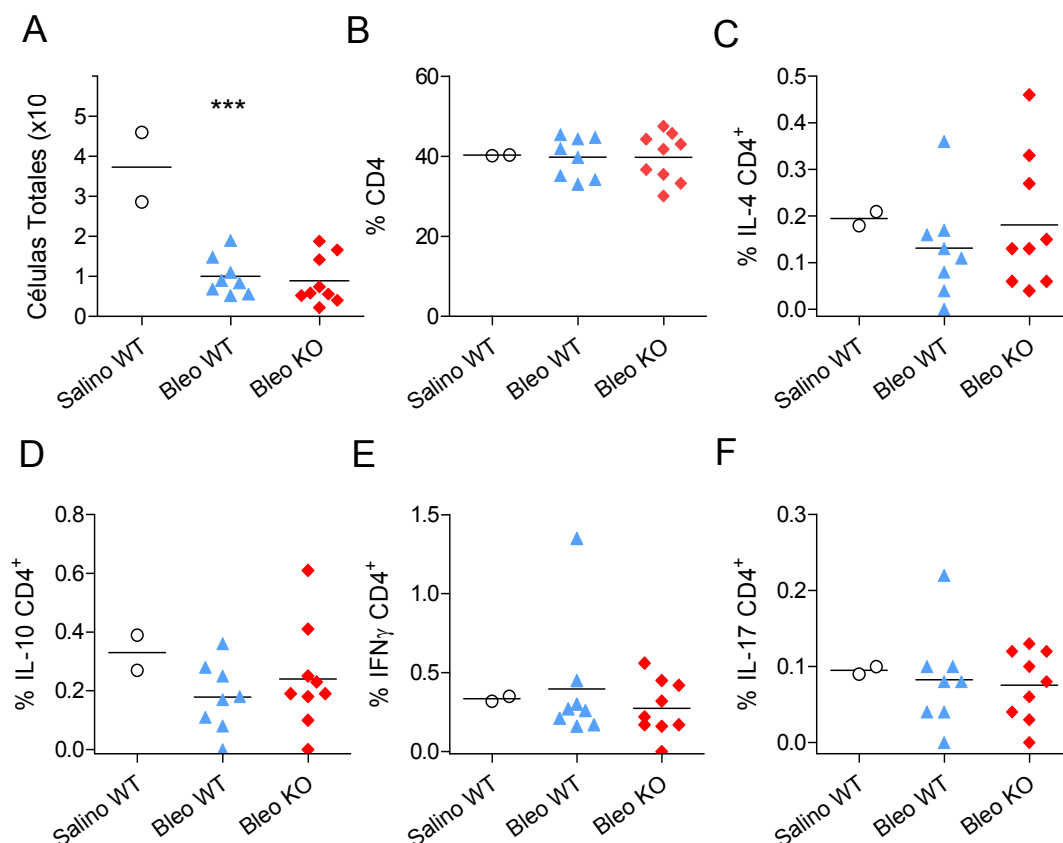


Figura 19. Suspensiones celulares de ganglio linfático inguinal en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina analizadas por citometría de flujo. Número de células totales en los ganglios inguinales (A); *** $p < 0,001$. Porcentaje de células CD4⁺ totales respecto al número de células de los ganglios inguinales (B). Porcentaje de células CD4⁺ productoras de las citoquinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- γ (C-F).

7 EFECTO DE LA APLICACIÓN TÓPICA DE VITAMINA D EN EL MODELO DE FIBROSIS INDUCIDA POR BLEOMICINA

7.1 Efecto de la vitamina D en el modelo de bleomicina

Estudios previos han mostrado una potente inducción de la expresión de TSLP y de las citoquinas Th2 tras la aplicación de forma tópica de vitamina D o de su análogo no calcémico calcipotriol en la piel de los ratones [318, 364]. Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de TSLP inducida por vitamina D en el modelo de fibrosis por bleomicina, se aplicó calcipotriol (Bleo + VitD) o crema vehículo (Bleo) a los ratones diariamente en la misma área de inyección de la bleomicina durante 21 días.

La aplicación de calcipotriol indujo una intensa inflamación y descamación de la piel, así como un abundante infiltrado inflamatorio de la dermis (Figura 20A) tal y como se ha descrito en estudios previos [318]. Mediante la tinción tricrómica de Masson se observó que el incremento en el área de colágeno inducido por bleomicina fue similar en el grupo de ratones tratado con la crema vehículo y en los tratados con el análogo calcipotriol ($p=0,491$). El incremento en el contenido en hidroxiprolina inducido por bleomicina tampoco fue diferente entre los dos grupos ($p=0,137$) (Figura 20B-C).

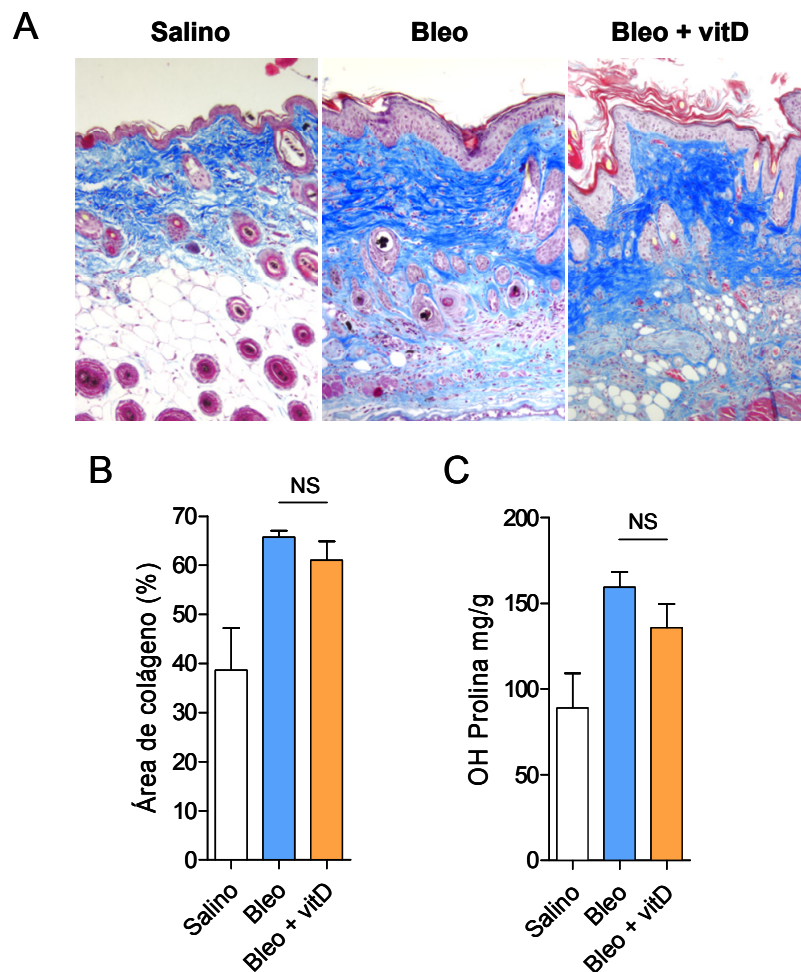


Figura 20. Efecto de la aplicación tópica de calcipotriol en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina. Tinción Masson y cuantificación del área de colágeno teñida (A, B); $p>0,05$ Bleo vs Bleo + VitD. Análisis del contenido de hidroxiprolina (C); $p>0,05$ Bleo vs Bleo + VitD. Los datos son representativos de dos experimentos independientes con 10 ratones por grupo.

7.2 Análisis de la expresión de citoquinas tras la aplicación tópica de calcipotriol

A continuación se analizó la expresión de ARNm mediante qPCR de las distintas citoquinas en la piel de los ratones para ver la expresión local de los diferentes parámetros de inflamación.

Los resultados obtenidos revelaron un incremento significativo del ARNm de TSLP de los ratones inyectados con bleomicina y tratados con calcipotriol ($p=0,008$) comparado con los ratones tratados con la crema vehículo (Figura 21A).

El análisis de la expresión de ARNm de IL-13 reveló un aumento moderado que no alcanzó la significación estadística entre los grupos de ratones inyectados con bleomicina y tratados tópicamente con la crema vehículo o calcipotriol ($p=0,091$). De la misma forma se observó una disminución moderada de la expresión de ARNm de IL-17 en los ratones tratados con calcipotriol ($p=0,360$) comparado con el grupo tratado con la crema vehículo. Los niveles de expresión de ARNm de IL-4 e IFN- γ tampoco fueron diferentes entre los distintos grupos ($p=0,838$ y $p=0,396$ respectivamente) (Figura 21B).

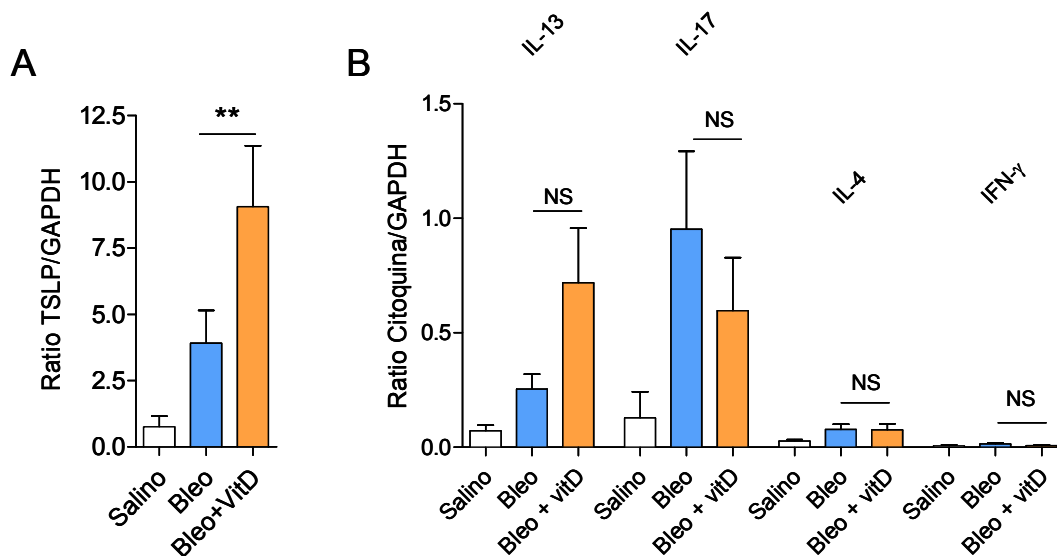


Figura 21. Estudio de la expresión de citoquinas tras la aplicación de calcipotriol en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina. Cuantificación de la expresión de ARNm de TSLP en los diferentes grupos (A); $**p<0.01$ Bleo + VitD vs Bleo. Análisis de la expresión de ARNm de IL-13 ($p>0,05$ Bleo + VitD vs Bleo), IL-17 ($p>0,05$ Bleo + VitD vs Bleo), IL-4 e IFN- γ ($p>0,05$ Bleo + VitD vs Bleo) (B). Los datos son representativos de dos experimentos independientes con 10 ratones por grupo.

VI. DISCUSIÓN

1 TSLP EN LAS LESIONES FIBRÓTICAS DÉRMICAS Y PULMONARES

La implicación más importante de TSLP en patología es su participación en la inflamación alérgica mediada por citoquinas Th2. Su expresión y función han sido confirmadas en las enfermedades alérgicas humanas y en sus modelos animales [288, 305, 312, 371]. TSLP desempeña un papel central en la patogenia de la atopía, donde contribuye al desarrollo de las lesiones cutáneas y a la progresión de la inflamación y fibrosis de la vía aérea. La activación de los TLRs y las citoquinas Th2 son los dos factores mejor conocidos capaces de inducir su expresión en células residentes epiteliales o del tejido conectivo de diferentes tejidos [301-302, 372]. En el contexto de la atopía, TSLP se expresa en queratinocitos, células epiteliales bronquiales y mastocitos residentes en la piel o la vía aérea [288, 292, 302-303, 373-374]. En las fases tardías de la inflamación atópica existe un componente de fibrosis tanto en la vía aérea como en la piel, y en algunos modelos experimentales de atopía, TSLP promueve directamente la fibrosis [305, 372]. La administración exógena de TSLP provoca inflamación y fibrosis asociadas a un aumento en la expresión de citoquinas Th2 [320].

En el presente estudio hemos identificado que un aumento en la expresión de TSLP es un factor común a diferentes condiciones fibróticas no alérgicas como la ES y la fibrosis pulmonar idiopática. Este aumento se reproduce en el modelo experimental de fibrosis dérmica inducida por bleomicina, facilitando el análisis de su función. El aumento de la expresión de TSLP en la ES obedece a la contribución de diferentes elementos celulares. Un factor que contribuye a este aumento en el modelo animal es la hiperplasia de los queratinocitos, un proceso específico de la fibrosis por bleomicina que no se observa en la ES humana donde en todo caso aparece una atrofia epidérmica. Sin embargo, en la ES también se observa un incremento de la expresión epidérmica de TSLP, similar al observado en la piel atópica. Las alteraciones del componente epidérmico en la ES son poco conocidas, y sólo recientemente se ha propuesto su posible alteración y contribución a la patogenia de la ES [375]. En otros procesos relacionados como el proceso de cicatrización, la interacción de la dermis-epidermis a través de factores solubles parece regular la expresión de proteínas de MEC que contribuyen a la reparación normal o patológica del tejido conectivo dérmico. Esta observación en la epidermis esclerodérmica sugiere que TSLP podría participar en la interacción epitelio-estroma en la fibrosis.

Otro factor celular potencialmente relevante en la patogenia de la ES es el incremento en el número y la degranulación de los mastocitos, un proceso que es también común a otras enfermedades fibrosantes humanas [156, 365-367, 376-377]. Los mastocitos, además de ser células con receptores y capacidad de respuesta a TSLP, son una fuente importante de esta citoquina en las enfermedades alérgicas y parasitarias [378-380]. Nuestros resultados confirman un aumento en la densidad de los mastocitos que expresan TSLP, tanto en pacientes con ES como en el modelo animal e indican que entre los posibles factores solubles que producen estas células en la fibrosis dérmica y pulmonar se encuentra TSLP.

Los fibroblastos constituyen las principales células efectoras de la fibrosis pero también participan en la síntesis de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento con múltiples funciones reguladoras autocrinas y paracrinas. La expresión de TSLP se había observado previamente en células residentes epiteliales y en fibroblastos pulmonares y fibrocitos en lesiones atópicas humanas o en ratones [288, 301, 372]. Nuestros resultados demuestran que también los fibroblastos en piel esclerodérmica y en el modelo animal también expresan de forma incrementada TSLP.

En otros modelos, la expresión de TSLP puede ser inducida por componentes de bacterias y virus, o diferentes ligandos de TLRs [302], sugiriendo que TSLP podría tener un papel importante en la respuesta del sistema inmune innato tras la exposición a estímulos ambientales. El papel de los TLRs sobre la regulación de la expresión de TSLP ha sido ampliamente estudiado en diferentes tipos celulares, donde la estimulación con agonistas de TLRs inducen la expresión de TSLP, que es amplificada por la presencia de citoquinas pro-inflamatorias vía NF- κ B [299, 302-303].

Varios autores han identificado a TLR-2 como un receptor activado por la bleomicina, un producto bacteriano [368-369], sugiriendo que tal vez en el modelo animal de fibrosis por bleomicina la expresión de TSLP podría estar relacionada con la activación directa de este receptor. Sin embargo, nuestros datos han mostrado que aunque la estimulación de los fibroblastos con el agonista de TLR-2 Pam3Cys-SK4KKK induce la expresión de TSLP *in vitro*, la bleomicina no tiene un efecto similar, haciendo improbable por tanto un efecto directo de la bleomicina vía TLR-2.

Estudios previos realizados con células del epitelio aéreo han mostrado que su exposición a ARN de doble cadena induce la producción de mediadores pro-

inflamatorios, entre los que se encuentra TSLP, fundamentalmente a través de la activación de TLR-3 [302]. Asimismo, ensayos en fibroblastos sinoviales o de la vía aérea han señalado un aumento en la expresión de TSLP tras la activación de TLR-3, sugiriendo un papel de esta citoquina inducida por TLR-3 en la patogenia de diferentes enfermedades [381-382]. En nuestro estudio, este mecanismo parece posible, ya que la estimulación con el agonista de TLR-3 Poly(I:C) fue el estímulo más potente capaz de inducir la expresión de TSLP en fibroblastos dérmicos humanos y murinos.

La posible regulación o participación de los TLRs en la patogenia de la ES son poco conocidas. En la ES, se ha observado que el IFN de tipo I, un factor asociado a diferentes enfermedades autoinmunes, induce la expresión de TLR-3 y que su activación se asocia a un aumento en la transcripción de genes distales de la vía de TGF- β , como PAI-1 o COMP. Por ello se ha propuesto que el eje IFN- α /TLR-3 podría constituir una ruta pro-fibrótica en los fibroblastos de la ES [283, 285]. Varios estudios han demostrado que la estimulación de fibroblastos con Poly(I:C) se asocia a varios efectos pro-fibróticos como la síntesis de componentes de la MEC, la diferenciación de miofibroblastos [277] y la producción de ET-1 [282]. La inducción de TSLP mediada por TLR-3 y su expresión en las lesiones fibróticas, apuntan a que TSLP podría ser inducido por diferentes estímulos del sistema inmune innato y contribuir de esta forma a la activación de procesos inflamatorios y pro-fibróticos.

TGF- β es el factor molecular más importante implicado en la fibrosis como regulador transcripcional directo de la síntesis de colágeno y otras proteínas de la MEC en fibroblastos. En nuestro estudio la estimulación de fibroblastos con TGF- β no modificó los niveles de expresión de ARNm de TSLP, de manera que TSLP no parece un efecto distal de la activación de TGF- β en la fibrosis.

En otras enfermedades autoinmunes como el LES, varios estudios han señalado que la presencia en la circulación de inmunocomplejos que contienen ácidos nucleicos actúa como ligandos endógenos de los TLRs [265-267], estableciendo un sistema de realimentación del sistema inmune innato por la respuesta autoinmune adaptativa, que contribuiría a perpetuar la enfermedad autoinmune. En la ES, donde también existen autoanticuerpos frente a diferentes nucleoproteínas, exploramos una posible regulación de la expresión de TSLP tras la activación de TLRs por inmunocomplejos, sin encontrar

resultados positivos tras la exposición de los fibroblastos a plasma de pacientes con ES y controles sanos.

Por último, las citoquinas Th2 sobre todo en presencia de otras citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF- α , inducen la expresión de TSLP en células epiteliales [301], sugiriendo una realimentación positiva de la respuesta de citoquinas Th2 a través de TSLP. Aunque nuestros datos apoyan la participación de diversos tipos celulares y de la activación de TLR-3 en la producción de TSLP, no se puede descartar que las citoquinas Th2 en la ES puedan contribuir a inducir la expresión de TSLP que podría participar como un proceso secundario o amplificador no esencial en la generación de respuestas de citoquinas Th2.

2 TSLP EN EL DESARROLLO DE LA FIBROSIS

Los resultados más importantes del presente estudio son los que demuestran que la ausencia genética del receptor TSLPR reduce significativamente el desarrollo de la fibrosis en el modelo animal inducido por bleomicina, que representa un modelo no alérgico de fibrosis. Los estudios previos habían demostrado que la ausencia del receptor reduce la inflamación en el pulmón en un modelos experimentales de asma [315, 383] y dermatitis atópica [372, 384]. Nuestros datos en el modelo animal confirman la participación de TSLP en el proceso de fibrosis, donde la ausencia del receptor se asocia a una reducción significativa de la acumulación de colágeno evaluada histológica y bioquímicamente, y a cambios en el perfil de expresión de citoquinas en las lesiones dérmicas.

Los estudios previos de neutralización de TSLP o la delección genética de su receptor específico en el modelo animal de dermatitis atópica mediada por IL-13, han demostrado que la neutralización o la ausencia de TSLPR atenúan la fibrosis dérmica y disminuyen el infiltrado inflamatorio y el número de fibrocitos en la piel [372]. Los fibrocitos han sido implicados en la patogenia de diversas enfermedades fibrosantes, como el desarrollo de cicatrices hipertróficas, la dermatopatía fibrosante nefrogénica, lesiones ateroscleróticas y enfermedades pulmonares, donde contribuyen al remodelado de la MEC [385-387]. En el modelo de dermatitis atópica, los fibrocitos expresan el receptor específico de TSLP, por lo tanto la función fibrótica asociada a

TSLP puede estar mediada por la estimulación directa de los fibrocitos [372]. Además, la citoquina Th2 IL-13 favorece la diferenciación de los fibrocitos [91] y potencia los efectos pro-fibróticos de TSLP sobre los fibrocitos *in vitro* [372].

Nuestros estudios realizados en fibroblastos dérmicos expuestos a TSLP descartan una implicación directa de la citoquina en la regulación de la expresión de colágeno generalizable a los fibroblastos dérmicos. La presencia de un aumento en el número de fibrocitos circulantes en pacientes con ES con la enfermedad pulmonar intersticial [388-389] ha sugerido que estas células también podrían participar en la progresión de la ES, pero no se ha demostrado su presencia en lesiones fibróticas. En modelos animales de fibrosis dérmica, bien mediada por Ang II o bien por bleomicina, sí se ha demostrado la presencia de fibrocitos en las lesiones de la piel [390-391]. Ese aspecto requiere estudios específicos, por lo que en este momento no podemos descartar completamente efectos pro-fibróticos directos de TSLP en la ES humana y en el modelo animal de fibrosis por bleomicina. No obstante nuestros datos apuntan más bien a un mecanismo indirecto en la participación de TSLP en la fibrosis, relacionado con su función reguladora de la expresión de citoquinas pro-fibróticas asociadas a respuestas de tipo Th2.

Como se ha mencionado, TSLP ejerce un papel regulador de la polarización de células Th2 en enfermedades inflamatorias y parasitarias [305, 312-313]. TSLP induce la activación de las DCs locales, que migrarían a los nódulos linfáticos donde mediante la interacción OX40/OX40L, activarían a las células T CD4⁺ promoviendo su diferenciación a células Th2 de tipo inflamatorio productoras de IL-4, IL-5 e IL-13 [288]. Por otra parte, no sólo las células T CD4⁺, sino otros tipos celulares como células NKT o mastocitos producen IL-4 e IL-13 en respuesta a TSLP [288, 305, 307, 392]. Por tanto, tanto respuestas T como elementos celulares del sistema inmune innato podrían contribuir a la síntesis de las citoquinas denominadas Th2 en las enfermedades fibrosantes.

En otros modelos y en la ES humana es posible que las células T participen como células efectoras Th2 en la patogenia de la fibrosis [110, 201-202, 212, 216-217, 248]. Boin *et al.* caracterizaron a las células T presentes en la circulación de pacientes con ES según la expresión de receptores de quimioquinas CCR5, asociado a células Th1, y CRTH2, asociado a Th2, demostrando un predominio de receptores de quimioquinas

asociados a células Th2 en sangre periférica [217]. También se ha demostrado la presencia de células T CD4⁺CD8⁺ en la ES con elevados niveles de expresión de IL-4 [216].

En el modelo animal, la presencia local de citoquinas pro-inflamatorias Th2 también ha sido demostrada. La inyección de bleomicina induce un infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos, macrófagos o mastocitos, que activarían a los fibroblastos residentes [156] resultando en un incremento en la producción de la MEC y en la expresión de citoquinas Th2 en la zona de la lesión [337, 339]. En nuestro estudio no observamos cambios en la polarización de las células T en los ganglios linfáticos de los ratones deficientes en el receptor de TSLP en respuesta a la bleomicina, apuntando a cambios en la respuesta local más que cambios Th2 sistémicos como sugieren algunos estudios en la ES.

Diferentes ensayos con ratones SCID han demostrado que la inducción de fibrosis por bleomicina es independiente de células T [346-347]. Esta observación podría ser también relevante en la piel esclerodérmica humana, donde las células T no son un componente predominante [184]. Recientemente Higashi-Kuwata y col. han demostrado la presencia de un elevado número de macrófagos de tipo M2 intersticiales y perivasculares en la dermis de pacientes con ES, apoyando la participación de los macrófagos con un perfil pro-fibrótico en la patogenia de la enfermedad [393]. En estudios previos también se han demostrado altos niveles de expresión de IL-13 en los macrófagos alveolares de pacientes con fibrosis pulmonar [242]. Recientemente se ha confirmado la función de TSLP en la diferenciación y activación de macrófagos de tipo M2 en un modelo animal de asma donde producen las quimioquinas TARC, MDC o eotaxina-2, que contribuyen a las respuestas de tipo Th2 [394]. Nuestros resultados en el modelo animal revelan que son los macrófagos los responsables del aumento de la expresión de la citoquina IL-13 y ésta sería la población sensible a la ausencia de TSLPR, apoyando un modelo en el que TSLP activaría la expresión de IL-13 en macrófagos que secundariamente ejercería efectos pro-fibróticos en los fibroblastos.

Independientemente de su origen celular, las funciones pro-fibróticas de las citoquinas Th2 han sido ampliamente estudiadas en relación con la ES y diferentes modelos animales [216, 225-231]. IL-4 se considera una potente citoquina pro-fibrótica por su capacidad de estimular la proliferación de fibroblastos dérmicos *in vitro* y la síntesis de

colágenos tipo I y III y fibronectina [220]. Indirectamente también puede favorecer la acumulación de la MEC, ya que induce la expresión de TIMP-2 a través de la ruta de las MAP quinasas [222]. Además IL-4 puede inducir la expresión de TGF- β 1 [230]. Sin embargo, y en contraste con algunos estudios previos [246, 337], nuestros datos no muestran cambios significativos en la expresión de IL-4 en el modelo de fibrosis inducida por bleomicina.

IL-13 también ha sido directamente implicada en la patogénesis de las enfermedades fibróticas [201] incluyendo la ES. Los estudios en el modelo animal de fibrosis por bleomicina con ratones deficientes en IL-13 o en el factor de transcripción T-bet, han demostrado un papel importante de IL-13 en la progresión de la fibrosis [212-213, 247]. IL-13 tiene efectos pro-fibróticos y pro-inflamatorios sobre diferentes tipos celulares. Ensayos *in vitro* han demostrado que IL-13 es un potente estimulador de la proliferación de los fibroblastos e induce la producción de colágeno y la expresión de moléculas de adhesión como integrina-1 β o VCAM-1, que modifican la interacción entre fibroblastos y MEC [238]. También puede participar en la progresión de la fibrosis estimulando la producción de TGF- β por los macrófagos [239] y reduciendo los niveles de expresión de MMPs, que disminuiría la degradación de la MEC favoreciendo su acumulación en la fibrosis. Por último, como se ha señalado, IL-13 promueve la diferenciación de los fibrocitos [91].

En nuestro estudio los cambios más importantes en el perfil de citoquinas en la piel en respuesta a la bleomicina implican a IL-13. Nuestros datos indican que TSLP modifica la expresión de IL-13 en el modelo de fibrosis, ya que en ausencia de TSLPR se observa una disminución de la expresión de esta citoquina en las lesiones dérmicas. La regulación de IL-13 por TSLP puede ser un factor suficientemente relevante ya que la inhibición de la señalización de IL-13 es suficiente para reducir la producción de TGF- β y la fibrosis en modelos animales de fibrosis [395].

Además de las citoquinas Th2, algunos estudios recientes apuntan a un posible componente Th17 en la patogenia de la ES humana [215, 218, 286] así como en el modelo de fibrosis por bleomicina, donde también podría favorecer la expresión de TGF- β [256]. Se ha demostrado que IL-17 puede activar la proliferación de los fibroblastos dérmicos tanto de pacientes con ES como de controles sanos *in vitro*, pero carece de efectos directos sobre la síntesis de colágeno en estas células [253]. IL-17

también puede inducir la expresión de citoquinas inflamatorias como IL-6 e IL-8 en fibroblastos [255]. Se ha observado un efecto de TSLP, en combinación con agonistas de TLR-3, sobre la polarización de las células Th17 [396] y su participación en la inflamación mediada por Th17 en un modelo animal de artritis autoinmune [397]. En nuestro estudio, aunque hemos encontrado cambios en la expresión de ARNm de IL-17 en respuesta a la bleomicina, que se ven reducidos en el ratón deficiente en TSLPR, la expresión de proteína IL-17 parece muy reducida en este modelo.

3 PAPEL DE LA VITAMINA D EN EL MODELO DE FIBROSIS POR BLEOMICINA

La deficiencia de vitamina D es un factor ambiental emergente en las enfermedades autoinmunes en general, incluida la ES [398-401], y la biología de la vitamina D tiene importantes implicaciones fisiopatológicas tanto en la inmunomodulación como en la respuesta fibrótica.

Los efectos biológicos de la vitamina D están mediados a través de la unión a su receptor VDR, que además de regular el metabolismo del calcio puede influir en procesos generales como el crecimiento celular o en la inmunomodulación [402-403]. VDR se expresa en células presentadoras de antígeno (macrófagos y DCs), así como en linfocitos activados, sugiriendo posibles funciones de la vitamina D en la regulación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas [403-404]. En particular, la vitamina D inhibe la actividad pro-inflamatoria de las células Th1 y la producción de IL-2, TNF- α e IFN- γ y también reduce las respuestas Th17. Por el contrario, promueve las respuestas Th2 induciendo la expresión de IL-4, IL-5 e IL-10 [405-406]. Estos efectos se han demostrado en enfermedades inflamatorias de la piel como la psoriasis, donde la aplicación tópica de análogos de la vitamina D invierte el perfil de citoquinas Th1 y Th17 hacia citoquinas Th2 resultando una mejoría de las lesiones psoriásicas [407-408].

Por otra parte, diferentes estudios realizados en modelos experimentales y fibroblastos humanos con vitamina D han mostrado efectos anti-proliferativos y anti-fibróticos que podrían ser beneficiosos en la ES. Estos efectos están asociados a una disminución de la expresión de α -SMA, reducción de la producción de TGF- β y niveles de colágeno y fibronectina y proliferación de fibroblastos. Además la vitamina D induce un aumento

de la expresión de MMPs y PAI-1 así como del factor de crecimiento de hepatocitos, que antagonizaría los efectos pro-fibróticos de TGF- β [409-415].

Debido a sus efecto anti-fibróticos y potencialmente moduladores de la autoinmunidad, el suplemento de vitamina D se ha propuesto como una estrategia potencialmente beneficiosa en la reducción de la gravedad o actividad de la ES. Sin embargo esto no se ha demostrado y no existen estudios sobre la terapia local con análogos de vitamina D sobre las lesiones cutáneas [416-418].

Ensayos realizados en animales han demostrado que la aplicación local de vitamina D induce una respuesta inflamatoria local similar a la observada en la dermatitis atópica [318, 364]. En este modelo se ha confirmado también que la aplicación tópica de análogos de la vitamina D induce potentemente la expresión de TSLP, así como la producción secundaria de las citoquinas Th2 IL-4 e IL-13 [318, 364, 408].

Nuestros resultados en el modelo animal de fibrosis confirman que la aplicación tópica de calcipotriol, el análogo no calcémico de la vitamina D, provoca irritación de la piel e infiltración de células inflamatorias en la dermis asociados a un aumento de la expresión de TSLP y citoquinas Th2 IL-4 e IL-13. En nuestro modelo, observamos una potente sobreinducción de TSLP y cambios sobre el perfil de citoquinas, más modestos que los observados en piel sana, pero del mismo signo [318, 364]. La aplicación de calcipotriol en este modelo provoca un aumento moderado de la expresión de IL-13, mientras que no modifica los niveles de expresión de IL-4. También observamos una reducción moderada del ARNm de IL-17 tras la aplicación de calcipotriol, pero no encontramos cambios en la expresión de la citoquina Th1 IFN- γ en la piel.

El efecto final de la aplicación de vitamina D no resultó en una modificación de la fibrosis en ningún sentido, sugiriendo que el calcipotriol ejercer efectos complejos y posiblemente de diferente signo que requieren estudios adicionales. En cualquier caso, este estudio no apoya el uso terapéutico directo de los derivados de la vitamina D en la ES.

VII. CONCLUSIONES

1. TSLP se sobreexpresa de manera consistente y por múltiples tipos celulares en diferentes formas de fibrosis no alérgica: piel esclerodérmica, fibrosis pulmonar y en el modelo experimental de fibrosis dérmica por bleomicina.
2. La activación de TLR-3 fue el único factor capaz de inducir la expresión de TSLP en fibroblastos dérmicos humanos en cultivo, apoyando hipótesis previas que relacionan éste receptor con la patogenia de la ES.
3. TSLP no ejerce un efecto pro-fibrótico directo sobre los fibroblastos dérmicos humanos en cultivo, en contraste con el efecto descrito en fibrocitos murinos.
4. La deficiencia genética del receptor específico de TSLP atenúa la expresión local de IL-13 en macrófagos dérmicos y disminuye la respuesta fibrótica en la esclerodermia inducida por bleomicina.
5. La aplicación tópica del análogo de la vitamina D calcipotriol en el modelo experimental de esclerodermia produce una súperinducción de la expresión de TSLP pero no modifica el desarrollo de la fibrosis.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, *et al.* *Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis.* J Rheumatol, 1988. **15**(2): p 202-5.
2. Silver RM. *Clinical aspects of localized and systemic scleroderma.* Curr Opin Rheumatol, 1991. **3**(6): p 973-8.
3. LeRoy EC and Medsger TA, Jr. *Criteria for the classification of early systemic sclerosis.* J Rheumatol, 2001. **28**(7): p 1573-6.
4. Ranque B and Mouthon L. *Geoepidemiology of systemic sclerosis.* Autoimmun Rev, 2010. **9**(5): p A311-8.
5. Roberts-Thomson PJ, Jones M, Hakendorf P, *et al.* *Scleroderma in South Australia: epidemiological observations of possible pathogenic significance.* Intern Med J, 2001. **31**(4): p 220-9.
6. Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J, *et al.* *Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(8): p 2246-55.
7. Chiffrot H, Fautrel B, Sordet C, *et al.* *Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review.* Semin Arthritis Rheum, 2008. **37**(4): p 223-35.
8. Arias-Nunez MC, Llorca J, Vazquez-Rodriguez TR, *et al.* *Systemic sclerosis in northwestern Spain: a 19-year epidemiologic study.* Medicine (Baltimore), 2008. **87**(5): p 272-80.
9. Tamaki T, Mori S, and Takehara K. *Epidemiological study of patients with systemic sclerosis in Tokyo.* Arch Dermatol Res, 1991. **283**(6): p 366-71.
10. Arnett FC, Howard RF, Tan F, *et al.* *Increased prevalence of systemic sclerosis in a Native American tribe in Oklahoma. Association with an Amerindian HLA haplotype.* Arthritis Rheum, 1996. **39**(8): p 1362-70.
11. Coral-Alvarado P, Pardo AL, Castano-Rodriguez N, *et al.* *Systemic sclerosis: a world wide global analysis.* Clin Rheumatol, 2009. **28**(7): p 757-65.
12. Allanore Y, Wipff J, Kahan A, *et al.* *Genetic basis for systemic sclerosis.* Joint Bone Spine, 2007. **74**(6): p 577-83.
13. Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, *et al.* *Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p 1359-62.
14. Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr., and Wright TM. *Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(7): p 1956-63.
15. Agarwal SK and Reveille JD. *The genetics of scleroderma (systemic sclerosis).* Curr Opin Rheumatol, 2010. **22**(2): p 133-8.
16. Arnett FC, Gourh P, Shete S, *et al.* *Major histocompatibility complex (MHC) class II alleles, haplotypes and epitopes which confer susceptibility or protection in systemic sclerosis: analyses in 1300 Caucasian, African-American and Hispanic cases and 1000 controls.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(5): p 822-7.
17. Dieude P, Guedj M, Wipff J, *et al.* *STAT4 is a genetic risk factor for systemic sclerosis having additive effects with IRF5 on disease susceptibility and related pulmonary fibrosis.* Arthritis Rheum, 2009. **60**(8): p 2472-9.
18. Martin JE, Bossini-Castillo L, and Martin J. *Unraveling the genetic component of systemic sclerosis.* Hum Genet, 2012. **131**(7): p 1023-37.
19. Radstake TR, Gorlova O, Rueda B, *et al.* *Genome-wide association study of systemic sclerosis identifies CD247 as a new susceptibility locus.* Nat Genet, 2010. **42**(5): p 426-9.

20. Rueda B, Broen J, Simeon C, *et al.* *The STAT4 gene influences the genetic predisposition to systemic sclerosis phenotype.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(11): p 2071-7.
21. Diaz-Gallo LM, Gourh P, Broen J, *et al.* *Analysis of the influence of PTPN22 gene polymorphisms in systemic sclerosis.* Ann Rheum Dis, 2011. **70**(3): p 454-62.
22. Dieude P, Dawidowicz K, Guedj M, *et al.* *Phenotype-haplotype correlation of IRF5 in systemic sclerosis: role of 2 haplotypes in disease severity.* J Rheumatol, 2010. **37**(5): p 987-92.
23. Rueda B, Gourh P, Broen J, *et al.* *BANK1 functional variants are associated with susceptibility to diffuse systemic sclerosis in Caucasians.* Ann Rheum Dis, 2010. **69**(4): p 700-5.
24. Gregersen PK and Olsson LM. *Recent advances in the genetics of autoimmune disease.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p 363-91.
25. Dieude P, Boileau C, and Allanore Y. *Immunogenetics of systemic sclerosis.* Autoimmun Rev, 2011. **10**(5): p 282-90.
26. Romano E, Manetti M, Guiducci S, *et al.* *The genetics of systemic sclerosis: an update.* Clin Exp Rheumatol, 2011. **29**(2 Suppl 65): p S75-86.
27. Nietert PJ and Silver RM. *Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors.* Curr Opin Rheumatol, 2000. **12**(6): p 520-6.
28. Janowsky EC, Kupper LL, and Hulka BS. *Meta-analyses of the relation between silicone breast implants and the risk of connective-tissue diseases.* N Engl J Med, 2000. **342**(11): p 781-90.
29. Lei W, Luo Y, Yan K, *et al.* *Abnormal DNA methylation in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis, and dermatomyositis.* Scand J Rheumatol, 2009. **38**(5): p 369-74.
30. Uz E, Loubiere LS, Gadi VK, *et al.* *Skewed X-chromosome inactivation in scleroderma.* Clin Rev Allergy Immunol, 2008. **34**(3): p 352-5.
31. Wang Y, Fan PS, and Kahaleh B. *Association between enhanced type I collagen expression and epigenetic repression of the FLII gene in scleroderma fibroblasts.* Arthritis Rheum, 2006. **54**(7): p 2271-9.
32. Liu G, Friggeri A, Yang Y, *et al.* *miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis.* J Exp Med, 2010. **207**(8): p 1589-97.
33. Chung AC, Huang XR, Meng X, *et al.* *miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis.* J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(8): p 1317-25.
34. Kato M, Putta S, Wang M, *et al.* *TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN.* Nat Cell Biol, 2009. **11**(7): p 881-9.
35. Ogawa T, Iizuka M, Sekiya Y, *et al.* *Suppression of type I collagen production by microRNA-29b in cultured human stellate cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **391**(1): p 316-21.
36. Guiducci S, Giacomelli R, and Cerinic MM. *Vascular complications of scleroderma.* Autoimmun Rev, 2007. **6**(8): p 520-3.
37. Fleming JN and Schwartz SM. *The pathology of scleroderma vascular disease.* Rheum Dis Clin North Am, 2008. **34**(1): p 41-55; vi.
38. Bowling JC and Dowd PM. *Raynaud's disease.* Lancet, 2003. **361**(9374): p 2078-80.
39. Kahaleh MB. *Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma.* Curr Opin Rheumatol, 2004. **16**(6): p 718-22.

40. Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, *et al.* *Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma.* J Clin Invest, 1996. **98**(3): p 785-92.
41. Kalogerou A, Gelou E, Mountantonakis S, *et al.* *Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis.* Ann Rheum Dis, 2005. **64**(8): p 1233-5.
42. Pandey JP and LeRoy EC. *Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis.* Arthritis Rheum, 1998. **41**(1): p 10-5.
43. Kahaleh B. *Vascular disease in scleroderma: mechanisms of vascular injury.* Rheum Dis Clin North Am, 2008. **34**(1): p 57-71; vi.
44. Kahaleh B. *The microvascular endothelium in scleroderma.* Rheumatology (Oxford), 2008. **47 Suppl 5**: p v14-5.
45. Cerinic MM, Valentini G, Sorano GG, *et al.* *Blood coagulation, fibrinolysis, and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis.* Semin Arthritis Rheum, 2003. **32**(5): p 285-95.
46. Distler O, Del Rosso A, Giacomelli R, *et al.* *Angiogenic and angiostatic factors in systemic sclerosis: increased levels of vascular endothelial growth factor are a feature of the earliest disease stages and are associated with the absence of fingertip ulcers.* Arthritis Res, 2002. **4**(6): p R11.
47. Distler O, Distler JH, Scheid A, *et al.* *Uncontrolled expression of vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis.* Circ Res, 2004. **95**(1): p 109-16.
48. Davies CA, Jeziorska M, Freemont AJ, *et al.* *The differential expression of VEGF, VEGFR-2, and GLUT-1 proteins in disease subtypes of systemic sclerosis.* Hum Pathol, 2006. **37**(2): p 190-7.
49. Hummers LK, Hall A, Wigley FM, *et al.* *Abnormalities in the regulators of angiogenesis in patients with scleroderma.* J Rheumatol, 2009. **36**(3): p 576-82.
50. Michalska-Jakubus M, Kowal-Bielecka O, Chodorowska G, *et al.* *Angiopoietins-1 and -2 are differentially expressed in the sera of patients with systemic sclerosis: high angiopoietin-2 levels are associated with greater severity and higher activity of the disease.* Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(4): p 746-55.
51. Giusti B, Serrati S, Margheri F, *et al.* *The antiangiogenic tissue kallikrein pattern of endothelial cells in systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(11): p 3618-28.
52. Koch AE and Distler O. *Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis.* Arthritis Res Ther, 2007. **9 Suppl 2**: p S3.
53. Mulligan-Kehoe MJ, Drinane MC, Mollmark J, *et al.* *Antiangiogenic plasma activity in patients with systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(10): p 3448-58.
54. Han CI, Campbell GR, and Campbell JH. *Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation.* J Vasc Res, 2001. **38**(2): p 113-9.
55. Tanaka K, Sata M, Hirata Y, *et al.* *Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries.* Circ Res, 2003. **93**(8): p 783-90.

56. Avouac J, Juin F, Wipff J, *et al.* *Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: association with disease severity.* Ann Rheum Dis, 2008. **67**(10): p 1455-60.
57. Cipriani P, Guiducci S, Miniati I, *et al.* *Impairment of endothelial cell differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells: new insight into the pathogenesis of systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(6): p 1994-2004.
58. Vancheeswaran R, Azam A, Black C, *et al.* *Localization of endothelin-1 and its binding sites in scleroderma skin.* J Rheumatol, 1994. **21**(7): p 1268-76.
59. Cambrey AD, Harrison NK, Dawes KE, *et al.* *Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **11**(4): p 439-45.
60. Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, *et al.* *Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1.* J Invest Dermatol, 2001. **116**(3): p 417-25.
61. Maxwell PH and Ratcliffe PJ. *Oxygen sensors and angiogenesis.* Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(1): p 29-37.
62. Kelly BD, Hackett SF, Hirota K, *et al.* *Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1.* Circ Res, 2003. **93**(11): p 1074-81.
63. Distler JH, Jungel A, Pileckyte M, *et al.* *Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(12): p 4203-15.
64. Sambo P, Baroni SS, Luchetti M, *et al.* *Oxidative stress in scleroderma: maintenance of scleroderma fibroblast phenotype by the constitutive up-regulation of reactive oxygen species generation through the NADPH oxidase complex pathway.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(11): p 2653-64.
65. Murrell GA, Francis MJ, and Bromley L. *Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals.* Biochem J, 1990. **265**(3): p 659-65.
66. Falanga V, Martin TA, Takagi H, *et al.* *Low oxygen tension increases mRNA levels of alpha 1 (I) procollagen in human dermal fibroblasts.* J Cell Physiol, 1993. **157**(2): p 408-12.
67. Galindo M, Santiago B, Rivero M, *et al.* *Chemokine expression by systemic sclerosis fibroblasts: abnormal regulation of monocyte chemoattractant protein 1 expression.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p 1382-6.
68. Distler O, Pap T, Kowal-Bielecka O, *et al.* *Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in systemic sclerosis: role of platelet-derived growth factor and effects on monocyte chemotaxis and collagen synthesis.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(11): p 2665-78.
69. Carr MW, Roth SJ, Luther E, *et al.* *Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p 3652-6.
70. Distler JH, Jungel A, Caretto D, *et al.* *Monocyte chemoattractant protein 1 released from glycosaminoglycans mediates its profibrotic effects in systemic sclerosis via the release of interleukin-4 from T cells.* Arthritis Rheum, 2006. **54**(1): p 214-25.

71. Casciola-Rosen L, Wigley F, and Rosen A. *Scleroderma autoantigens are uniquely fragmented by metal-catalyzed oxidation reactions: implications for pathogenesis*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p 71-9.
72. Denton CP, Black CM, and Abraham DJ. *Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(3): p 134-44.
73. Leroy EC. *Connective tissue synthesis by scleroderma skin fibroblasts in cell culture*. J Exp Med, 1972. **135**(6): p 1351-62.
74. LeRoy EC. *Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast*. J Clin Invest, 1974. **54**(4): p 880-9.
75. Hitraya EG and Jimenez SA. *Transcriptional activation of the alpha 1(I) procollagen gene in systemic sclerosis dermal fibroblasts. Role of intronic sequences*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(8): p 1347-54.
76. Jimenez SA, Hitraya E, and Varga J. *Pathogenesis of scleroderma*. Collagen. Rheum Dis Clin North Am, 1996. **22**(4): p 647-74.
77. Abraham DJ, Eckes B, Rajkumar V, et al. *New developments in fibroblast and myofibroblast biology: implications for fibrosis and scleroderma*. Curr Rheumatol Rep, 2007. **9**(2): p 136-43.
78. Santiago B, Galindo M, Rivero M, et al. *Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(7): p 1667-76.
79. Jelaska A, Arakawa M, Broketa G, et al. *Heterogeneity of collagen synthesis in normal and systemic sclerosis skin fibroblasts. Increased proportion of high collagen-producing cells in systemic sclerosis fibroblasts*. Arthritis Rheum, 1996. **39**(8): p 1338-46.
80. Jelaska A and Korn JH. *Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(10): p 2230-9.
81. Yamakage A, Kikuchi K, Smith EA, et al. *Selective upregulation of platelet-derived growth factor alpha receptors by transforming growth factor beta in scleroderma fibroblasts*. J Exp Med, 1992. **175**(5): p 1227-34.
82. Kissin EY, Merkel PA, and Lafyatis R. *Myofibroblasts and hyalinized collagen as markers of skin disease in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(11): p 3655-60.
83. Rajkumar VS, Howell K, Csiszar K, et al. *Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(5): p R1113-23.
84. Farina G, Lemaire R, Pancari P, et al. *Cartilage oligomeric matrix protein expression in systemic sclerosis reveals heterogeneity of dermal fibroblast responses to transforming growth factor beta*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(3): p 435-41.
85. Desmouliere A, Chaponnier C, and Gabbiani G. *Tissue repair, contraction, and the myofibroblast*. Wound Repair Regen, 2005. **13**(1): p 7-12.
86. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, et al. *The myofibroblast: one function, multiple origins*. Am J Pathol, 2007. **170**(6): p 1807-16.
87. Yamagishi S and Imaizumi T. *Pericyte biology and diseases*. Int J Tissue React, 2005. **27**(3): p 125-35.

88. Rajkumar VS, Sundberg C, Abraham DJ, *et al.* *Activation of microvascular pericytes in autoimmune Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 1999. **42**(5): p 930-41.
89. Hirschi KK and D'Amore PA. *Pericytes in the microvasculature.* Cardiovasc Res, 1996. **32**(4): p 687-98.
90. Abe R, Donnelly SC, Peng T, *et al.* *Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites.* J Immunol, 2001. **166**(12): p 7556-62.
91. Shao DD, Suresh R, Vakil V, *et al.* *Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation.* J Leukoc Biol, 2008. **83**(6): p 1323-33.
92. Chesney J, Bacher M, Bender A, *et al.* *The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p 6307-12.
93. Massague J. *The transforming growth factor-beta family.* Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p 597-641.
94. Roberts AB, Flanders KC, Heine UI, *et al.* *Transforming growth factor-beta: multifunctional regulator of differentiation and development.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1990. **327**(1239): p 145-54.
95. Varga J and Pasche B. *Transforming growth factor beta as a therapeutic target in systemic sclerosis.* Nat Rev Rheumatol, 2009. **5**(4): p 200-6.
96. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, *et al.* *Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(12): p 4167-71.
97. Blobe GC, Schiemann WP, and Lodish HF. *Role of transforming growth factor beta in human disease.* N Engl J Med, 2000. **342**(18): p 1350-8.
98. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, *et al.* *Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts.* J Cell Biol, 1993. **122**(1): p 103-11.
99. Annes JP, Chen Y, Munger JS, *et al.* *Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1.* J Cell Biol, 2004. **165**(5): p 723-34.
100. Kawakami T, Ihn H, Xu W, *et al.* *Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype.* J Invest Dermatol, 1998. **110**(1): p 47-51.
101. Leask A and Abraham DJ. *TGF-beta signaling and the fibrotic response.* FASEB J, 2004. **18**(7): p 816-27.
102. Varga J. *Scleroderma and Smads: dysfunctional Smad family dynamics culminating in fibrosis.* Arthritis Rheum, 2002. **46**(7): p 1703-13.
103. Mori Y, Chen SJ, and Varga J. *Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts.* Arthritis Rheum, 2003. **48**(7): p 1964-78.
104. Ishida W, Mori Y, Lakos G, *et al.* *Intracellular TGF-beta receptor blockade abrogates Smad-dependent fibroblast activation in vitro and in vivo.* J Invest Dermatol, 2006. **126**(8): p 1733-44.
105. Massague J. *TGF-beta signal transduction.* Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p 753-91.
106. Derynck R and Zhang YE. *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.* Nature, 2003. **425**(6958): p 577-84.

107. Moustakas A and Heldin CH. *Non-Smad TGF-beta signals*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 16): p 3573-84.
108. Chung L, Fiorentino DF, Benbarak MJ, *et al*. *Molecular framework for response to imatinib mesylate in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(2): p 584-91.
109. Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, *et al*. *Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p 36803-10.
110. Varga J and Abraham D. *Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p 557-67.
111. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, *et al*. *Constitutive phosphorylation of focal adhesion kinase is involved in the myofibroblast differentiation of scleroderma fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(5): p 886-92.
112. Jun JB, Kuechle M, Min J, *et al*. *Scleroderma fibroblasts demonstrate enhanced activation of Akt (protein kinase B) in situ*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(2): p 298-303.
113. Ihn H, Yamane K, and Tamaki K. *Increased phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase p38 in scleroderma fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2005. **125**(2): p 247-55.
114. Sato M, Shegogue D, Gore EA, *et al*. *Role of p38 MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(4): p 704-11.
115. Clouthier DE, Comerford SA, and Hammer RE. *Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and a lipodystrophy-like syndrome in PEPCK-TGF-beta1 transgenic mice*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p 2697-713.
116. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, *et al*. *The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis*. Cell, 1999. **96**(3): p 319-28.
117. Ito Y, Sarkar P, Mi Q, *et al*. *Overexpression of Smad2 reveals its concerted action with Smad4 in regulating TGF-beta-mediated epidermal homeostasis*. Dev Biol, 2001. **236**(1): p 181-94.
118. Lakos G, Takagawa S, Chen SJ, *et al*. *Targeted disruption of TGF-beta/Smad3 signaling modulates skin fibrosis in a mouse model of scleroderma*. Am J Pathol, 2004. **165**(1): p 203-17.
119. Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, *et al*. *Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(5): p 410-21.
120. Kasper M, Reimann T, Hempel U, *et al*. *Loss of caveolin expression in type I pneumocytes as an indicator of subcellular alterations during lung fibrogenesis*. Histochem Cell Biol, 1998. **109**(1): p 41-8.
121. Drab M, Verkade P, Elger M, *et al*. *Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice*. Science, 2001. **293**(5539): p 2449-52.
122. Razani B, Zhang XL, Bitzer M, *et al*. *Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(9): p 6727-38.
123. Del Galdo F, Sotgia F, de Almeida CJ, *et al*. *Decreased expression of caveolin 1 in patients with systemic sclerosis: crucial role in the pathogenesis of tissue fibrosis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(9): p 2854-65.

124. Rajkumar VS, Shiwen X, Bostrom M, *et al.* *Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing.* *Am J Pathol*, 2006. **169**(6): p 2254-65.
125. Gay S, Jones RE, Jr., Huang GQ, *et al.* *Immunohistologic demonstration of platelet-derived growth factor (PDGF) and sis-oncogene expression in scleroderma.* *J Invest Dermatol*, 1989. **92**(2): p 301-3.
126. Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, *et al.* *Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis.* *N Engl J Med*, 2006. **354**(25): p 2667-76.
127. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, *et al.* *Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor: a link to fibrosis in scleroderma and a pathway for novel therapeutic targets.* *Autoimmun Rev*, 2007. **7**(2): p 121-6.
128. Denton CP and Abraham DJ. *Transforming growth factor-beta and connective tissue growth factor: key cytokines in scleroderma pathogenesis.* *Curr Opin Rheumatol*, 2001. **13**(6): p 505-11.
129. Abraham D. *Connective tissue growth factor: growth factor, matricellular organizer, fibrotic biomarker or molecular target for anti-fibrotic therapy in SSc?* *Rheumatology (Oxford)*, 2008. **47 Suppl 5**: p v8-9.
130. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, *et al.* *Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair.* *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(6): p 637-45.
131. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, *et al.* *Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor.* *J Invest Dermatol*, 1996. **107**(3): p 404-11.
132. Takehara K. *Hypothesis: pathogenesis of systemic sclerosis.* *J Rheumatol*, 2003. **30**(4): p 755-9.
133. Chujo S, Shirasaki F, Kondo-Miyazaki M, *et al.* *Role of connective tissue growth factor and its interaction with basic fibroblast growth factor and macrophage chemoattractant protein-1 in skin fibrosis.* *J Cell Physiol*, 2009. **220**(1): p 189-95.
134. de Winter P, Leoni P, and Abraham D. *Connective tissue growth factor: structure-function relationships of a mosaic, multifunctional protein.* *Growth Factors*, 2008. **26**(2): p 80-91.
135. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, *et al.* *Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis.* *J Rheumatol*, 2000. **27**(1): p 149-54.
136. Ponticos M, Holmes AM, Shi-wen X, *et al.* *Pivotal role of connective tissue growth factor in lung fibrosis: MAPK-dependent transcriptional activation of type I collagen.* *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(7): p 2142-55.
137. Liu S, Shi-wen X, Abraham DJ, *et al.* *CCN2 is required for bleomycin-induced skin fibrosis in mice.* *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(1): p 239-46.
138. Abraham D and Distler O. *How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis.* *Arthritis Res Ther*, 2007. **9 Suppl 2**: p S2.
139. Krieg T, Abraham D, and Lafyatis R. *Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions.* *Arthritis Res Ther*, 2007. **9 Suppl 2**: p S4.
140. Wendel M, Petzold A, Koslowski R, *et al.* *Localization of endothelin receptors in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat.* *Histochem Cell Biol*, 2004. **122**(5): p 507-17.

141. Mutsaers SE, Foster ML, Chambers RC, *et al.* *Increased endothelin-1 and its localization during the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(5): p 611-9.
142. Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, *et al.* *Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice.* Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(1): p 19-26.
143. Park SH, Saleh D, Giaid A, *et al.* *Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist.* Am J Respir Crit Care Med, 1997. **156**(2 Pt 1): p 600-8.
144. Dinarello CA. *Interleukin-1.* Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(4): p 253-65.
145. Hussein MR, Hassan HI, Hofny ER, *et al.* *Alterations of mononuclear inflammatory cells, CD4/CD8+ T cells, interleukin 1beta, and tumour necrosis factor alpha in the bronchoalveolar lavage fluid, peripheral blood, and skin of patients with systemic sclerosis.* J Clin Pathol, 2005. **58**(2): p 178-84.
146. Szegedi A, Czirjak L, Unkeless JC, *et al.* *Serum cytokine and anti-Fc gamma R autoantibody measurements in patients with systemic sclerosis.* Acta Derm Venereol, 1996. **76**(1): p 21-3.
147. Kawaguchi Y, Hara M, and Wright TM. *Endogenous IL-1alpha from systemic sclerosis fibroblasts induces IL-6 and PDGF-A.* J Clin Invest, 1999. **103**(9): p 1253-60.
148. Kawaguchi Y, McCarthy SA, Watkins SC, *et al.* *Autocrine activation by interleukin 1alpha induces the fibrogenic phenotype of systemic sclerosis fibroblasts.* J Rheumatol, 2004. **31**(10): p 1946-54.
149. Heino J and Heinson T. *Interleukin-1 beta prevents the stimulatory effect of transforming growth factor-beta on collagen gene expression in human skin fibroblasts.* Biochem J, 1990. **271**(3): p 827-30.
150. Honda A, Abe R, Makino T, *et al.* *Interleukin-1beta and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in dermal fibroblasts mediate UVA-induced matrix metalloproteinase-1 expression.* J Dermatol Sci, 2008. **49**(1): p 63-72.
151. Hibi M, Nakajima K, and Hirano T. *IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system.* J Mol Med (Berl), 1996. **74**(1): p 1-12.
152. Matsushita T, Hasegawa M, Hamaguchi Y, *et al.* *Longitudinal analysis of serum cytokine concentrations in systemic sclerosis: association of interleukin 12 elevation with spontaneous regression of skin sclerosis.* J Rheumatol, 2006. **33**(2): p 275-84.
153. Sato S, Hasegawa M, and Takehara K. *Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis.* J Dermatol Sci, 2001. **27**(2): p 140-6.
154. Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, *et al.* *In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. Their role in early and late disease.* Pathobiology, 1993. **61**(5-6): p 239-46.
155. Deleuran B and Abraham DJ. *Possible implication of the effector CD4+ T-cell subpopulation TH17 in the pathogenesis of systemic scleroderma.* Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. **3**(12): p 682-3.
156. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, *et al.* *Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma.* J Invest Dermatol, 1999. **112**(4): p 456-62.

157. Kitaba S, Murota H, Terao M, *et al.* *Blockade of interleukin-6 receptor alleviates disease in mouse model of scleroderma.* Am J Pathol, 2012. **180**(1): p 165-76.
158. Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, *et al.* *Immunization with DNA topoisomerase I and Freund's complete adjuvant induces skin and lung fibrosis and autoimmunity via interleukin-6 signaling.* Arthritis Rheum, 2011. **63**(11): p 3575-85.
159. Nusse R. *Wnt signaling in disease and in development.* Cell Res, 2005. **15**(1): p 28-32.
160. MacDonald BT, Tamai K, and He X. *Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases.* Dev Cell, 2009. **17**(1): p 9-26.
161. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, *et al.* *The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease.* Blood, 2009. **113**(3): p 517-25.
162. Gardner H, Shearstone JR, Bandaru R, *et al.* *Gene profiling of scleroderma skin reveals robust signatures of disease that are imperfectly reflected in the transcript profiles of explanted fibroblasts.* Arthritis Rheum, 2006. **54**(6): p 1961-73.
163. Lemaire R, Farina G, Bayle J, *et al.* *Antagonistic effect of the extracellular matrix signaling protein CCN3 on TGF-beta- and Wnt-mediated fibrillinogenesis in systemic sclerosis and Marfan syndrome.* J Invest Dermatol, 2010. **130**(6): p 1514-23.
164. Beyer C, Schramm A, Akhmetshina A, *et al.* *beta-catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis.* Ann Rheum Dis, 2012. **71**(5): p 761-7.
165. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, *et al.* *Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis.* Nat Commun, 2012. **3**: p 735.
166. Galis ZS and Khatri JJ. *Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly.* Circ Res, 2002. **90**(3): p 251-62.
167. Yan C and Boyd DD. *Regulation of matrix metalloproteinase gene expression.* J Cell Physiol, 2007. **211**(1): p 19-26.
168. Fanjul-Fernandez M, Folgueras AR, Cabrera S, *et al.* *Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models.* Biochim Biophys Acta, 2010. **1803**(1): p 3-19.
169. Jones CB, Sane DC, and Herrington DM. *Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome.* Cardiovasc Res, 2003. **59**(4): p 812-23.
170. Nagase H, Visse R, and Murphy G. *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs.* Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p 562-73.
171. Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, *et al.* *Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives.* Clin Chem Lab Med, 2004. **42**(2): p 121-31.
172. Murawaki Y, Ikuta Y, and Kawasaki H. *Clinical usefulness of serum tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 assay in patients with chronic liver disease in comparison with serum TIMP-1.* Clin Chim Acta, 1999. **281**(1-2): p 109-20.
173. Parsons SL, Watson SA, Brown PD, *et al.* *Matrix metalloproteinases.* Br J Surg, 1997. **84**(2): p 160-6.
174. Scherer RL, McIntyre JO, and Matrisian LM. *Imaging matrix metalloproteinases in cancer.* Cancer Metastasis Rev, 2008. **27**(4): p 679-90.

175. Young-Min SA, Beeton C, Laughton R, *et al.* Serum TIMP-1, TIMP-2, and MMP-1 in patients with systemic sclerosis, primary Raynaud's phenomenon, and in normal controls. *Ann Rheum Dis*, 2001. **60**(9): p 846-51.
176. Kuroda K and Shinkai H. Gene expression of types I and III collagen, decorin, matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in skin fibroblasts from patients with systemic sclerosis. *Arch Dermatol Res*, 1997. **289**(10): p 567-72.
177. Nishijima C, Hayakawa I, Matsushita T, *et al.* Autoantibody against matrix metalloproteinase-3 in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*, 2004. **138**(2): p 357-63.
178. Kahari VM, Larjava H, and Uitto J. Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem*, 1991. **266**(16): p 10608-15.
179. Bassols A and Massague J. Transforming growth factor beta regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem*, 1988. **263**(6): p 3039-45.
180. Steen VD. Autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum*, 2005. **35**(1): p 35-42.
181. Sato S, Hayakawa I, Hasegawa M, *et al.* Function blocking autoantibodies against matrix metalloproteinase-1 in patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*, 2003. **120**(4): p 542-7.
182. Fujimoto M, Hamaguchi Y, Yazawa N, *et al.* Autoantibodies to a collagen-specific molecular chaperone, heat-shock protein 47, in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol*, 2004. **138**(3): p 534-9.
183. Tan FK, Arnett FC, Reveille JD, *et al.* Autoantibodies to fibrillin 1 in systemic sclerosis: ethnic differences in antigen recognition and lack of correlation with specific clinical features or HLA alleles. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(11): p 2464-71.
184. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, *et al.* Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(21): p 12319-24.
185. Lafyatis R, O'Hara C, Feghali-Bostwick CA, *et al.* B cell infiltration in systemic sclerosis-associated interstitial lung disease. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(9): p 3167-8.
186. Sato S, Fujimoto M, Hasegawa M, *et al.* Altered blood B lymphocyte homeostasis in systemic sclerosis: expanded naive B cells and diminished but activated memory B cells. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(6): p 1918-27.
187. Bosello S, De Luca G, Tolusso B, *et al.* B cells in systemic sclerosis: a possible target for therapy. *Autoimmun Rev*, 2011. **10**(10): p 624-30.
188. Gu YS, Kong J, Cheema GS, *et al.* The immunobiology of systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum*, 2008. **38**(2): p 132-60.
189. Stanford SM, Mustelin TM, and Bottini N. Lymphoid tyrosine phosphatase and autoimmunity: human genetics rediscovers tyrosine phosphatases. *Semin Immunopathol*, 2010. **32**(2): p 127-36.
190. Manku H, Graham DS, and Vyse TJ. Association of the co-stimulator OX40L with systemic lupus erythematosus. *J Mol Med (Berl)*, 2009. **87**(3): p 229-34.
191. Gough MJ and Weinberg AD. OX40 (CD134) and OX40L. *Adv Exp Med Biol*, 2009. **647**: p 94-107.

192. Eisenbarth SC, Piggott DA, and Bottomly K. *The master regulators of allergic inflammation: dendritic cells in Th2 sensitization*. *Curr Opin Immunol*, 2003. **15**(6): p 620-6.
193. Ohshima Y, Yang LP, Uchiyama T, *et al*. *OX40 costimulation enhances interleukin-4 (IL-4) expression at priming and promotes the differentiation of naive human CD4(+) T cells into high IL-4-producing effectors*. *Blood*, 1998. **92**(9): p 3338-45.
194. Bossini-Castillo L, Broen JC, Simeon CP, *et al*. *A replication study confirms the association of TNFSF4 (OX40L) polymorphisms with systemic sclerosis in a large European cohort*. *Ann Rheum Dis*, 2011. **70**(4): p 638-41.
195. Gourh P, Arnett FC, Tan FK, *et al*. *Association of TNFSF4 (OX40L) polymorphisms with susceptibility to systemic sclerosis*. *Ann Rheum Dis*, 2010. **69**(3): p 550-5.
196. Dieude P, Guedj M, Wipff J, *et al*. *Association between the IRF5 rs2004640 functional polymorphism and systemic sclerosis: a new perspective for pulmonary fibrosis*. *Arthritis Rheum*, 2009. **60**(1): p 225-33.
197. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, *et al*. *Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma*. *J Pathol*, 1992. **166**(3): p 255-63.
198. Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, *et al*. *Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis*. *Am J Pathol*, 1997. **151**(6): p 1751-8.
199. Giacomelli R, Matucci-Cerinic M, Cipriani P, *et al*. *Circulating Vdelta1+ T cells are activated and accumulate in the skin of systemic sclerosis patients*. *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(2): p 327-34.
200. Fiocco U, Rosada M, Cozzi L, *et al*. *Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity*. *Ann Rheum Dis*, 1993. **52**(4): p 272-7.
201. Wynn TA. *Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(8): p 583-94.
202. Wynn TA. *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p 199-210.
203. Baroni GS, D'Ambrosio L, Curto P, *et al*. *Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in rat liver fibrosis*. *Hepatology*, 1996. **23**(5): p 1189-99.
204. Oldroyd SD, Thomas GL, Gabbiani G, *et al*. *Interferon-gamma inhibits experimental renal fibrosis*. *Kidney Int*, 1999. **56**(6): p 2116-27.
205. Boehm U, Klamp T, Groot M, *et al*. *Cellular responses to interferon-gamma*. *Annu Rev Immunol*, 1997. **15**: p 749-95.
206. Jimenez SA, Freundlich B, and Rosenbloom J. *Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons*. *J Clin Invest*, 1984. **74**(3): p 1112-6.
207. Ghosh AK, Yuan W, Mori Y, *et al*. *Antagonistic regulation of type I collagen gene expression by interferon-gamma and transforming growth factor-beta. Integration at the level of p300/CBP transcriptional coactivators*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(14): p 11041-8.
208. Pannu J and Trojanowska M. *Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma*. *Curr Opin Rheumatol*, 2004. **16**(6): p 739-45.

209. Varga J. *Recombinant cytokine treatment for scleroderma. Can the antifibrotic potential of interferon-gamma be realized clinically?* Arch Dermatol, 1997. **133**(5): p 637-42.
210. Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, *et al.* *IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(1): p L92-7.
211. Tsuji-Yamada J, Nakazawa M, Takahashi K, *et al.* *Effect of IL-12 encoding plasmid administration on tight-skin mouse.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(3): p 707-12.
212. Aliprantis AO, Wang J, Fathman JW, *et al.* *Transcription factor T-bet regulates skin sclerosis through its function in innate immunity and via IL-13.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(8): p 2827-30.
213. Lakos G, Melichian D, Wu M, *et al.* *Increased bleomycin-induced skin fibrosis in mice lacking the Th1-specific transcription factor T-bet.* Pathobiology, 2006. **73**(5): p 224-37.
214. Bossini-Castillo L, Martin JE, Broen J, *et al.* *A GWAS follow-up study reveals the association of the IL12RB2 gene with systemic sclerosis in Caucasian populations.* Hum Mol Genet, 2012. **21**(4): p 926-33.
215. Radstake TR, van Bon L, Broen J, *et al.* *The pronounced Th17 profile in systemic sclerosis (SSc) together with intracellular expression of TGFbeta and IFNgamma distinguishes SSc phenotypes.* PLoS One, 2009. **4**(6): p e5903.
216. Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, *et al.* *Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(10): p 3459-67.
217. Boin F, De Fanis U, Bartlett SJ, *et al.* *T cell polarization identifies distinct clinical phenotypes in scleroderma lung disease.* Arthritis Rheum, 2008. **58**(4): p 1165-74.
218. Truchetet ME, Brembilla NC, Montanari E, *et al.* *Increased frequency of circulating Th22 in addition to Th17 and Th2 lymphocytes in systemic sclerosis: association with interstitial lung disease.* Arthritis Res Ther, 2011. **13**(5): p R166.
219. Brown MA and Hural J. *Functions of IL-4 and control of its expression.* Crit Rev Immunol, 1997. **17**(1): p 1-32.
220. Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, *et al.* *Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4.* J Clin Invest, 1992. **90**(4): p 1479-85.
221. Makhluif HA, Stepniakowska J, Hoffman S, *et al.* *IL-4 upregulates tenascin synthesis in scleroderma and healthy skin fibroblasts.* J Invest Dermatol, 1996. **107**(6): p 856-9.
222. Ihn H, Yamane K, Asano Y, *et al.* *IL-4 up-regulates the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in dermal fibroblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase dependent pathway.* J Immunol, 2002. **168**(4): p 1895-902.
223. Elovic AE, Ohyama H, Sauty A, *et al.* *IL-4-dependent regulation of TGF-alpha and TGF-beta1 expression in human eosinophils.* J Immunol, 1998. **160**(12): p 6121-7.
224. Seder RA, Marth T, Sieve MC, *et al.* *Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production.* J Immunol, 1998. **160**(12): p 5719-28.

225. Needleman BW, Wigley FM, and Stair RW. *Interleukin-1, interleukin-2, interleukin-4, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in sera from patients with scleroderma*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(1): p 67-72.
226. Salmon-Ehr V, Serpieri H, Nawrocki B, *et al*. *Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis*. *Arch Dermatol*, 1996. **132**(7): p 802-6.
227. Emura M, Nagai S, Takeuchi M, *et al*. *In vitro production of B cell growth factor and B cell differentiation factor by peripheral blood mononuclear cells and bronchoalveolar lavage T lymphocytes from patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. *Clin Exp Immunol*, 1990. **82**(1): p 133-9.
228. Wallace WA, Ramage EA, Lamb D, *et al*. *A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA)*. *Clin Exp Immunol*, 1995. **101**(3): p 436-41.
229. Booth M, Mwatha JK, Joseph S, *et al*. *Periportal fibrosis in human Schistosoma mansoni infection is associated with low IL-10, low IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender*. *J Immunol*, 2004. **172**(2): p 1295-303.
230. Kodera T, McGaha TL, Phelps R, *et al*. *Disrupting the IL-4 gene rescues mice homozygous for the tight-skin mutation from embryonic death and diminishes TGF-beta production by fibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(6): p 3800-5.
231. Ong C, Wong C, Roberts CR, *et al*. *Anti-IL-4 treatment prevents dermal collagen deposition in the tight-skin mouse model of scleroderma*. *Eur J Immunol*, 1998. **28**(9): p 2619-29.
232. King C, Davies J, Mueller R, *et al*. *TGF-beta1 alters APC preference, polarizing islet antigen responses toward a Th2 phenotype*. *Immunity*, 1998. **8**(5): p 601-13.
233. Rishikof DC, Ricupero DA, Kuang PP, *et al*. *Interleukin-4 regulates connective tissue growth factor expression in human lung fibroblasts*. *J Cell Biochem*, 2002. **85**(3): p 496-504.
234. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, *et al*. *Interleukin-13: central mediator of allergic asthma*. *Science*, 1998. **282**(5397): p 2258-61.
235. Grunig G, Warnock M, Wakil AE, *et al*. *Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma*. *Science*, 1998. **282**(5397): p 2261-3.
236. Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, *et al*. *Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis*. *J Rheumatol*, 1997. **24**(2): p 328-32.
237. Aversa G, Punnonen J, Cocks BG, *et al*. *An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors*. *J Exp Med*, 1993. **178**(6): p 2213-8.
238. Doucet C, Brouty-Boye D, Pottin-Clemenceau C, *et al*. *IL-4 and IL-13 specifically increase adhesion molecule and inflammatory cytokine expression in human lung fibroblasts*. *Int Immunol*, 1998. **10**(10): p 1421-33.
239. Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, *et al*. *Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1)*. *J Exp Med*, 2001. **194**(6): p 809-21.

240. Lanone S, Zheng T, Zhu Z, *et al.* *Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling.* J Clin Invest, 2002. **110**(4): p 463-74.
241. Zhu Z, Ma B, Zheng T, *et al.* *IL-13-induced chemokine responses in the lung: role of CCR2 in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling.* J Immunol, 2002. **168**(6): p 2953-62.
242. Hancock A, Armstrong L, Gama R, *et al.* *Production of interleukin 13 by alveolar macrophages from normal and fibrotic lung.* Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **18**(1): p 60-5.
243. Granel B, Chevillard C, Allanore Y, *et al.* *Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis.* Immunogenetics, 2006. **58**(8): p 693-9.
244. Granel B, Allanore Y, Chevillard C, *et al.* *IL13RA2 gene polymorphisms are associated with systemic sclerosis.* J Rheumatol, 2006. **33**(10): p 2015-9.
245. Vercelli D. *Genetics of IL-13 and functional relevance of IL-13 variants.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2002. **2**(5): p 389-93.
246. Matsushita M, Yamamoto T, and Nishioka K. *Upregulation of interleukin-13 and its receptor in a murine model of bleomycin-induced scleroderma.* Int Arch Allergy Immunol, 2004. **135**(4): p 348-56.
247. Kolodsick JE, Toews GB, Jakubzick C, *et al.* *Protection from fluorescein isothiocyanate-induced fibrosis in IL-13-deficient, but not IL-4-deficient, mice results from impaired collagen synthesis by fibroblasts.* J Immunol, 2004. **172**(7): p 4068-76.
248. Atamas SP, Yurovsky VV, Wise R, *et al.* *Production of type 2 cytokines by CD8+ lung cells is associated with greater decline in pulmonary function in patients with systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 1999. **42**(6): p 1168-78.
249. Fuschiotti P, Medsger TA, Jr., and Morel PA. *Effector CD8+ T cells in systemic sclerosis patients produce abnormally high levels of interleukin-13 associated with increased skin fibrosis.* Arthritis Rheum, 2009. **60**(4): p 1119-28.
250. Korn T, Bettelli E, Oukka M, *et al.* *IL-17 and Th17 Cells.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p 485-517.
251. Ouyang W, Kolls JK, and Zheng Y. *The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation.* Immunity, 2008. **28**(4): p 454-67.
252. Kolls JK and Linden A. *Interleukin-17 family members and inflammation.* Immunity, 2004. **21**(4): p 467-76.
253. Kurasawa K, Hirose K, Sano H, *et al.* *Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis.* Arthritis Rheum, 2000. **43**(11): p 2455-63.
254. Murata M, Fujimoto M, Matsushita T, *et al.* *Clinical association of serum interleukin-17 levels in systemic sclerosis: is systemic sclerosis a Th17 disease?* J Dermatol Sci, 2008. **50**(3): p 240-2.
255. Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, *et al.* *T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines.* J Exp Med, 1996. **183**(6): p 2593-603.
256. Wilson MS, Madala SK, Ramalingam TR, *et al.* *Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent.* J Exp Med, 2010. **207**(3): p 535-52.
257. Akira S and Takeda K. *Toll-like receptor signalling.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p 499-511.
258. Akira S, Uematsu S, and Takeuchi O. *Pathogen recognition and innate immunity.* Cell, 2006. **124**(4): p 783-801.

259. Honda K, Yanai H, Mizutani T, *et al.* *Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(43): p 15416-21.
260. Negishi H, Fujita Y, Yanai H, *et al.* *Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(41): p 15136-41.
261. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, *et al.* *Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors.* Nature, 2005. **434**(7030): p 243-9.
262. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, *et al.* *Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway.* Science, 2003. **301**(5633): p 640-3.
263. Yamamoto M, Sato S, Mori K, *et al.* *Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling.* J Immunol, 2002. **169**(12): p 6668-72.
264. Drexler SK and Foxwell BM. *The role of toll-like receptors in chronic inflammation.* Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(4): p 506-18.
265. Lafyatis R and Marshak-Rothstein A. *Toll-like receptors and innate immune responses in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Res Ther, 2007. **9**(6): p 222.
266. Marshak-Rothstein A. *Toll-like receptors in systemic autoimmune disease.* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p 823-35.
267. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, *et al.* *Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors.* Nature, 2002. **416**(6881): p 603-7.
268. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, *et al.* *Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p 2610-5.
269. Crow MK, Kirou KA, and Wohlgemuth J. *Microarray analysis of interferon-regulated genes in SLE.* Autoimmunity, 2003. **36**(8): p 481-90.
270. Kirou KA, Lee C, George S, *et al.* *Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2004. **50**(12): p 3958-67.
271. Nikpour M, Dempsey AA, Urowitz MB, *et al.* *Association of a gene expression profile from whole blood with disease activity in systemic lupus erythaematosus.* Ann Rheum Dis, 2008. **67**(8): p 1069-75.
272. Bos CL, van Baarsen LG, Timmer TC, *et al.* *Molecular subtypes of systemic sclerosis in association with anti-centromere antibodies and digital ulcers.* Genes Immun, 2009. **10**(3): p 210-8.
273. Tan FK, Zhou X, Mayes MD, *et al.* *Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients.* Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(6): p 694-702.
274. York MR, Nagai T, Mangini AJ, *et al.* *A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(3): p 1010-20.
275. Kim D, Peck A, Santer D, *et al.* *Induction of interferon-alpha by scleroderma sera containing autoantibodies to topoisomerase I: association of higher*

- interferon-alpha activity with lung fibrosis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(7): p 2163-73.
276. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, *et al*. *TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis*. Nat Med, 2007. **13**(11): p 1324-32.
277. Sugiura H, Ichikawa T, Koarai A, *et al*. *Activation of Toll-like receptor 3 augments myofibroblast differentiation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009. **40**(6): p 654-62.
278. Meneghin A, Choi ES, Evanoff HL, *et al*. *TLR9 is expressed in idiopathic interstitial pneumonia and its activation promotes in vitro myofibroblast differentiation*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(5): p 979-92.
279. Loos T, Dekeyzer L, Struyf S, *et al*. *TLR ligands and cytokines induce CXCR3 ligands in endothelial cells: enhanced CXCL9 in autoimmune arthritis*. Lab Invest, 2006. **86**(9): p 902-16.
280. Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, *et al*. *Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and longstanding arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(12): p 3684-92.
281. 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**(6): p 1626-36.
282. Brentano F, Schorr O, Gay RE, *et al*. *RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p 2656-65.
283. Farina GA, York MR, Di Marzio M, *et al*. *Poly(I:C) drives type I IFN- and TGFbeta-mediated inflammation and dermal fibrosis simulating altered gene expression in systemic sclerosis*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(11): p 2583-93.
284. Farina G, York M, Collins C, *et al*. *dsRNA activation of endothelin-1 and markers of vascular activation in endothelial cells and fibroblasts*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(3): p 544-50.
285. Agarwal SK, Wu M, Livingston CK, *et al*. *Toll-like receptor 3 upregulation by type I interferon in healthy and scleroderma dermal fibroblasts*. Arthritis Res Ther, 2011. **13**(1): p R3.
286. van Bon L, Popa C, Huijbens R, *et al*. *Distinct evolution of TLR-mediated dendritic cell cytokine secretion in patients with limited and diffuse cutaneous systemic sclerosis*. Ann Rheum Dis, 2010. **69**(8): p 1539-47.
287. Fineschi S, Goffin L, Rezzonico R, *et al*. *Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(12): p 3913-23.
288. Soumelis V, Reche PA, Kanzler H, *et al*. *Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p 673-80.
289. Friend SL, Hosier S, Nelson A, *et al*. *A thymic stromal cell line supports in vitro development of surface IgM+ B cells and produces a novel growth factor affecting B and T lineage cells*. Exp Hematol, 1994. **22**(3): p 321-8.
290. Sims JE, Williams DE, Morrissey PJ, *et al*. *Molecular cloning and biological characterization of a novel murine lymphoid growth factor*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p 671-80.
291. Ray RJ, Furlonger C, Williams DE, *et al*. *Characterization of thymic stromal-derived lymphopoietin (TSLP) in murine B cell development in vitro*. Eur J Immunol, 1996. **26**(1): p 10-6.

292. Ziegler SF and Liu YJ. *Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function*. Nat Immunol, 2006. **7**(7): p 709-14.
293. Leonard WJ. *TSLP: finally in the limelight*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p 605-7.
294. Park LS, Martin U, Garka K, et al. *Cloning of the murine thymic stromal lymphopoietin (TSLP) receptor: Formation of a functional heteromeric complex requires interleukin 7 receptor*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p 659-70.
295. Isaksen DE, Baumann H, Trobridge PA, et al. *Requirement for stat5 in thymic stromal lymphopoietin-mediated signal transduction*. J Immunol, 1999. **163**(11): p 5971-7.
296. Rochman Y, Kashyap M, Robinson GW, et al. *Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(45): p 19455-60.
297. Liu YJ, Soumelis V, Watanabe N, et al. *TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p 193-219.
298. Reche PA, Soumelis V, Gorman DM, et al. *Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells*. J Immunol, 2001. **167**(1): p 336-43.
299. Lee HC and Ziegler SF. *Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p 914-9.
300. Zaph C, Troy AE, Taylor BC, et al. *Epithelial-cell-intrinsic IKK-beta expression regulates intestinal immune homeostasis*. Nature, 2007. **446**(7135): p 552-6.
301. Bogiatzi SI, Fernandez I, Bichet JC, et al. *Cutting Edge: Proinflammatory and Th2 cytokines synergize to induce thymic stromal lymphopoietin production by human skin keratinocytes*. J Immunol, 2007. **178**(6): p 3373-7.
302. Kato A, Favoreto S, Jr., Avila PC, et al. *TLR3- and Th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells*. J Immunol, 2007. **179**(2): p 1080-7.
303. Allakhverdi Z, Comeau MR, Jessup HK, et al. *Thymic stromal lymphopoietin is released by human epithelial cells in response to microbes, trauma, or inflammation and potently activates mast cells*. J Exp Med, 2007. **204**(2): p 253-8.
304. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, et al. *A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses*. Nat Immunol, 2008. **9**(3): p 310-8.
305. Ying S, O'Connor B, Ratoff J, et al. *Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in asthmatic airways and correlates with expression of Th2-attracting chemokines and disease severity*. J Immunol, 2005. **174**(12): p 8183-90.
306. Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, et al. *A role for thymic stromal lymphopoietin in CD4(+) T cell development*. J Exp Med, 2004. **200**(2): p 159-68.
307. Rochman I, Watanabe N, Arima K, et al. *Cutting edge: direct action of thymic stromal lymphopoietin on activated human CD4+ T cells*. J Immunol, 2007. **178**(11): p 6720-4.
308. Levin SD, Koelling RM, Friend SL, et al. *Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism*. J Immunol, 1999. **162**(2): p 677-83.
309. Gilliet M, Soumelis V, Watanabe N, et al. *Human dendritic cells activated by TSLP and CD40L induce proallergic cytotoxic T cells*. J Exp Med, 2003. **197**(8): p 1059-63.

310. Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, *et al.* *Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell homeostatic expansion.* *Nat Immunol*, 2004. **5**(4): p 426-34.
311. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, *et al.* *Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells.* *Nat Immunol*, 2005. **6**(5): p 507-14.
312. Liu YJ. *Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation.* *J Exp Med*, 2006. **203**(2): p 269-73.
313. Ramalingam TR, Pesce JT, Mentink-Kane MM, *et al.* *Regulation of helminth-induced Th2 responses by thymic stromal lymphopoietin.* *J Immunol*, 2009. **182**(10): p 6452-9.
314. Yoo J, Omori M, Gyarmati D, *et al.* *Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin.* *J Exp Med*, 2005. **202**(4): p 541-9.
315. Al-Shami A, Spolski R, Kelly J, *et al.* *A role for TSLP in the development of inflammation in an asthma model.* *J Exp Med*, 2005. **202**(6): p 829-39.
316. Zhou B, Comeau MR, De Smedt T, *et al.* *Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice.* *Nat Immunol*, 2005. **6**(10): p 1047-53.
317. Li M, Messaddeq N, Teletin M, *et al.* *Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(41): p 14795-800.
318. Li M, Hener P, Zhang Z, *et al.* *Topical vitamin D3 and low-calcemic analogs induce thymic stromal lymphopoietin in mouse keratinocytes and trigger an atopic dermatitis.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(31): p 11736-41.
319. Huang M, Sharma S, Zhu LX, *et al.* *IL-7 inhibits fibroblast TGF-beta production and signaling in pulmonary fibrosis.* *J Clin Invest*, 2002. **109**(7): p 931-7.
320. Jessup HK, Brewer AW, Omori M, *et al.* *Intradermal administration of thymic stromal lymphopoietin induces a T cell- and eosinophil-dependent systemic Th2 inflammatory response.* *J Immunol*, 2008. **181**(6): p 4311-9.
321. Siracusa LD, McGrath R, Ma Q, *et al.* *A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation.* *Genome Res*, 1996. **6**(4): p 300-13.
322. Christner PJ, Peters J, Hawkins D, *et al.* *The tight skin 2 mouse. An animal model of scleroderma displaying cutaneous fibrosis and mononuclear cell infiltration.* *Arthritis Rheum*, 1995. **38**(12): p 1791-8.
323. Eferl R, Hasselblatt P, Rath M, *et al.* *Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(30): p 10525-30.
324. Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, *et al.* *Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma.* *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(1): p 334-44.
325. Denton CP, Zheng B, Evans LA, *et al.* *Fibroblast-specific expression of a kinase-deficient type II transforming growth factor beta (TGFbeta) receptor leads to paradoxical activation of TGFbeta signaling pathways with fibrosis in transgenic mice.* *J Biol Chem*, 2003. **278**(27): p 25109-19.

326. Razani B, Engelman JA, Wang XB, *et al.* *Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities.* J Biol Chem, 2001. **276**(41): p 38121-38.
327. Jaffee BD and Claman HN. *Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems.* Cell Immunol, 1983. **77**(1): p 1-12.
328. Ruzek MC, Jha S, Ledbetter S, *et al.* *A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease.* Arthritis Rheum, 2004. **50**(4): p 1319-31.
329. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, *et al.* *New antibiotics, bleomycin A and B.* J Antibiot (Tokyo), 1966. **19**(5): p 200-9.
330. Lown JW and Sim SK. *The mechanism of the bleomycin-induced cleavage of DNA.* Biochem Biophys Res Commun, 1977. **77**(4): p 1150-7.
331. Muggia FM, Louie AC, and Sikic BI. *Pulmonary toxicity of antitumor agents.* Cancer Treat Rev, 1983. **10**(4): p 221-43.
332. Sleijfer S. *Bleomycin-induced pneumonitis.* Chest, 2001. **120**(2): p 617-24.
333. Finch WR, Rodnan GP, Buckingham RB, *et al.* *Bleomycin-induced scleroderma.* J Rheumatol, 1980. **7**(5): p 651-9.
334. Kerr LD and Spiera H. *Scleroderma in association with the use of bleomycin: a report of 3 cases.* J Rheumatol, 1992. **19**(2): p 294-6.
335. Adamson IY and Bowden DH. *The pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.* Am J Pathol, 1974. **77**(2): p 185-97.
336. Chandler DB. *Possible mechanisms of bleomycin-induced fibrosis.* Clin Chest Med, 1990. **11**(1): p 21-30.
337. Yamamoto T and Nishioka K. *Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective.* Exp Dermatol, 2005. **14**(2): p 81-95.
338. Oi M, Yamamoto T, and Nishioka K. *Increased expression of TGF-beta1 in the sclerotic skin in bleomycin-'susceptible' mouse strains.* J Med Dent Sci, 2004. **51**(1): p 7-17.
339. Takagawa S, Lakos G, Mori Y, *et al.* *Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma.* J Invest Dermatol, 2003. **121**(1): p 41-50.
340. Bhattacharyya S, Ghosh AK, Pannu J, *et al.* *Fibroblast expression of the coactivator p300 governs the intensity of profibrotic response to transforming growth factor beta.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(4): p 1248-58.
341. Mori Y, Hinchcliff M, Wu M, *et al.* *Connective tissue growth factor/CCN2-null mouse embryonic fibroblasts retain intact transforming growth factor-beta responsiveness.* Exp Cell Res, 2008. **314**(5): p 1094-104.
342. Chen SJ, Ning H, Ishida W, *et al.* *The early-immediate gene EGR-1 is induced by transforming growth factor-beta and mediates stimulation of collagen gene expression.* J Biol Chem, 2006. **281**(30): p 21183-97.
343. Bhattacharyya S, Wei J, Melichian DS, *et al.* *The transcriptional cofactor nab2 is induced by tgf-Beta and suppresses fibroblast activation: physiological roles and impaired expression in scleroderma.* PLoS One, 2009. **4**(10): p e7620.
344. Ferreira AM, Takagawa S, Fresco R, *et al.* *Diminished induction of skin fibrosis in mice with MCP-1 deficiency.* J Invest Dermatol, 2006. **126**(8): p 1900-8.
345. Kaplan MH. *STAT4: a critical regulator of inflammation in vivo.* Immunol Res, 2005. **31**(3): p 231-42.

346. Helene M, Lake-Bullock V, Zhu J, *et al.* *T cell independence of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.* J Leukoc Biol, 1999. **65**(2): p 187-95.
347. Yamamoto T and Nishioka K. *Animal model of sclerotic skin. IV: induction of dermal sclerosis by bleomycin is T cell independent.* J Invest Dermatol, 2001. **117**(4): p 999-1001.
348. Daoussis D, Liossis SN, Tsamandas AC, *et al.* *Experience with rituximab in scleroderma: results from a 1-year, proof-of-principle study.* Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(2): p 271-80.
349. Shima Y, Kuwahara Y, Murota H, *et al.* *The skin of patients with systemic sclerosis softened during the treatment with anti-IL-6 receptor antibody tocilizumab.* Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(12): p 2408-12.
350. White B, Moore WC, Wigley FM, *et al.* *Cyclophosphamide is associated with pulmonary function and survival benefit in patients with scleroderma and alveolitis.* Ann Intern Med, 2000. **132**(12): p 947-54.
351. Pope JE, Bellamy N, Seibold JR, *et al.* *A randomized, controlled trial of methotrexate versus placebo in early diffuse scleroderma.* Arthritis Rheum, 2001. **44**(6): p 1351-8.
352. Denton CP, Merkel PA, Furst DE, *et al.* *Recombinant human anti-transforming growth factor beta1 antibody therapy in systemic sclerosis: a multicenter, randomized, placebo-controlled phase I/II trial of CAT-192.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(1): p 323-33.
353. Santiago B, Gutierrez-Canas I, Dotor J, *et al.* *Topical application of a peptide inhibitor of transforming growth factor-beta1 ameliorates bleomycin-induced skin fibrosis.* J Invest Dermatol, 2005. **125**(3): p 450-5.
354. Beyer C, Distler JH, and Distler O. *Are tyrosine kinase inhibitors promising for the treatment of systemic sclerosis and other fibrotic diseases?* Swiss Med Wkly, 2010. **140**: p w13050.
355. Distler JH, Jungel A, Huber LC, *et al.* *Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis.* Arthritis Rheum, 2007. **56**(1): p 311-22.
356. Matucci-Cerinic M, Denton CP, Furst DE, *et al.* *Bosentan treatment of digital ulcers related to systemic sclerosis: results from the RAPIDS-2 randomised, double-blind, placebo-controlled trial.* Ann Rheum Dis, 2011. **70**(1): p 32-8.
357. Denton CP, Pope JE, Peter HH, *et al.* *Long-term effects of bosentan on quality of life, survival, safety and tolerability in pulmonary arterial hypertension related to connective tissue diseases.* Ann Rheum Dis, 2008. **67**(9): p 1222-8.
358. Kowal-Bielecka O, Landewe R, Avouac J, *et al.* *EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR).* Ann Rheum Dis, 2009. **68**(5): p 620-8.
359. Thompson AE and Pope JE. *Calcium channel blockers for primary Raynaud's phenomenon: a meta-analysis.* Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(2): p 145-50.
360. Wigley FM, Wise RA, Seibold JR, *et al.* *Intravenous iloprost infusion in patients with Raynaud phenomenon secondary to systemic sclerosis. A multicenter, placebo-controlled, double-blind study.* Ann Intern Med, 1994. **120**(3): p 199-206.
361. Kumar U, Gokhle SS, Sreenivas V, *et al.* *Prospective, open-label, uncontrolled pilot study to study safety and efficacy of sildenafil in systemic sclerosis-related pulmonary artery hypertension and cutaneous vascular complications.* Rheumatol Int, 2012. [Epub ahead of print].

362. Tashkin DP, Elashoff R, Clements PJ, *et al.* *Effects of 1-year treatment with cyclophosphamide on outcomes at 2 years in scleroderma lung disease.* Am J Respir Crit Care Med, 2007. **176**(10): p 1026-34.
363. Balbir-Gurman A and Braun-Moscovici Y. *Scleroderma - new aspects in pathogenesis and treatment.* Best Pract Res Clin Rheumatol, 2012. **26**(1): p 13-24.
364. Li M, Hener P, Zhang Z, *et al.* *Induction of thymic stromal lymphopoietin expression in keratinocytes is necessary for generating an atopic dermatitis upon application of the active vitamin D3 analogue MC903 on mouse skin.* J Invest Dermatol, 2009. **129**(2): p 498-502.
365. Everett ET, Pablos JL, Harley RA, *et al.* *The role of mast cells in the development of skin fibrosis in tight-skin mutant mice.* Comp Biochem Physiol A Physiol, 1995. **110**(2): p 159-65.
366. Yamamoto T, Takagawa S, and Nishioka K. *Mast cell-independent increase of type I collagen expression in experimental scleroderma induced by bleomycin.* Arch Dermatol Res, 2001. **293**(10): p 532-6.
367. Yamamoto T, Takahashi Y, Takagawa S, *et al.* *Animal model of sclerotic skin. II. Bleomycin induced scleroderma in genetically mast cell deficient WBB6F1-W/W(V) mice.* J Rheumatol, 1999. **26**(12): p 2628-34.
368. Razonable RR, Henault M, and Paya CV. *Stimulation of toll-like receptor 2 with bleomycin results in cellular activation and secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines.* Toxicol Appl Pharmacol, 2006. **210**(3): p 181-9.
369. Yang HZ, Cui B, Liu HZ, *et al.* *Targeting TLR2 attenuates pulmonary inflammation and fibrosis by reversion of suppressive immune microenvironment.* J Immunol, 2009. **182**(1): p 692-702.
370. Greenblatt MB, Sargent JL, Farina G, *et al.* *Interspecies comparison of human and murine scleroderma reveals IL-13 and CCL2 as disease subset-specific targets.* Am J Pathol, 2012. **180**(3): p 1080-94.
371. Ito T, Wang YH, Duramad O, *et al.* *TSLP-activated dendritic cells induce an inflammatory T helper type 2 cell response through OX40 ligand.* J Exp Med, 2005. **202**(9): p 1213-23.
372. Oh MH, Oh SY, Yu J, *et al.* *IL-13 induces skin fibrosis in atopic dermatitis by thymic stromal lymphopoietin.* J Immunol, 2011. **186**(12): p 7232-42.
373. Bloemen K, Verstraelen S, Van Den Heuvel R, *et al.* *The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung.* Immunol Lett, 2007. **113**(1): p 6-18.
374. Macfarlane AJ, Kon OM, Smith SJ, *et al.* *Basophils, eosinophils, and mast cells in atopic and nonatopic asthma and in late-phase allergic reactions in the lung and skin.* J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(1 Pt 1): p 99-107.
375. Aden N, Nuttall A, Shiwen X, *et al.* *Epithelial cells promote fibroblast activation via IL-1alpha in systemic sclerosis.* J Invest Dermatol, 2010. **130**(9): p 2191-200.
376. Hawkins RA, Claman HN, Clark RA, *et al.* *Increased dermal mast cell populations in progressive systemic sclerosis: a link in chronic fibrosis?* Ann Intern Med, 1985. **102**(2): p 182-6.
377. Kawanami O, Ferrans VJ, Fulmer JD, *et al.* *Ultrastructure of pulmonary mast cells in patients with fibrotic lung disorders.* Lab Invest, 1979. **40**(6): p 717-34.
378. Hepworth MR, Danilowicz-Luebert E, Rausch S, *et al.* *Mast cells orchestrate type 2 immunity to helminths through regulation of tissue-derived cytokines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(17): p 6644-9.

379. Miyata M, Hatsushika K, Ando T, *et al.* *Mast cell regulation of epithelial TSLP expression plays an important role in the development of allergic rhinitis.* Eur J Immunol, 2008. **38**(6): p 1487-92.
380. Schulman ES. *The role of mast cells in inflammatory responses in the lung.* Crit Rev Immunol, 1993. **13**(1): p 35-70.
381. Ozawa T, Koyama K, Ando T, *et al.* *Thymic stromal lymphopoietin secretion of synovial fibroblasts is positively and negatively regulated by Toll-like receptors/nuclear factor-kappaB pathway and interferon-gamma/dexamethasone.* Mod Rheumatol, 2007. **17**(6): p 459-63.
382. Yamada T, Saito H, Kimura Y, *et al.* *CpG-DNA suppresses poly(I:C)-induced TSLP production in human laryngeal arytenoid fibroblasts.* Cytokine, 2012. **57**(2): p 245-50.
383. Zhang Z, Hener P, Frossard N, *et al.* *Thymic stromal lymphopoietin overproduced by keratinocytes in mouse skin aggravates experimental asthma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(5): p 1536-41.
384. He R, Oyoshi MK, Garibyan L, *et al.* *TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(33): p 11875-80.
385. Bellini A and Mattoli S. *The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses.* Lab Invest, 2007. **87**(9): p 858-70.
386. Quan TE, Cowper SE, and Bucala R. *The role of circulating fibrocytes in fibrosis.* Curr Rheumatol Rep, 2006. **8**(2): p 145-50.
387. Quan TE, Cowper S, Wu SP, *et al.* *Circulating fibrocytes: collagen-secreting cells of the peripheral blood.* Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(4): p 598-606.
388. Gan Y, Reilkoff R, Peng X, *et al.* *Role of semaphorin 7a signaling in transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis and scleroderma-related interstitial lung disease.* Arthritis Rheum, 2011. **63**(8): p 2484-94.
389. Mathai SK, Gulati M, Peng X, *et al.* *Circulating monocytes from systemic sclerosis patients with interstitial lung disease show an enhanced profibrotic phenotype.* Lab Invest, 2010. **90**(6): p 812-23.
390. Stawski L, Han R, Bujor AM, *et al.* *Angiotensin II induces skin fibrosis: a novel mouse model of dermal fibrosis.* Arthritis Res Ther, 2012. **14**(4): p R194.
391. Katebi M, Fernandez P, Chan ES, *et al.* *Adenosine A2A receptor blockade or deletion diminishes fibrocyte accumulation in the skin in a murine model of scleroderma, bleomycin-induced fibrosis.* Inflammation, 2008. **31**(5): p 299-303.
392. Nagata Y, Kamijuku H, Taniguchi M, *et al.* *Differential role of thymic stromal lymphopoietin in the induction of airway hyperreactivity and Th2 immune response in antigen-induced asthma with respect to natural killer T cell function.* Int Arch Allergy Immunol, 2007. **144**(4): p 305-14.
393. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, *et al.* *Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis.* Arthritis Res Ther, 2010. **12**(4): p R128.
394. Han H, Headley MB, Xu W, *et al.* *Thymic stromal lymphopoietin amplifies the differentiation of alternatively activated macrophages.* J Immunol, 2013. **190**(3): p 904-12.
395. Fichtner-Feigl S, Strober W, Kawakami K, *et al.* *IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis.* Nat Med, 2006. **12**(1): p 99-106.

396. Tanaka J, Watanabe N, Kido M, *et al.* *Human TSLP and TLR3 ligands promote differentiation of Th17 cells with a central memory phenotype under Th2-polarizing conditions.* Clin Exp Allergy, 2009. **39**(1): p 89-100.
397. Hartgring SA, Willis CR, Dean CE, Jr., *et al.* *Critical proinflammatory role of thymic stromal lymphopoietin and its receptor in experimental autoimmune arthritis.* Arthritis Rheum, 2011. **63**(7): p 1878-87.
398. Vacca A, Cormier C, Piras M, *et al.* *Vitamin D deficiency and insufficiency in 2 independent cohorts of patients with systemic sclerosis.* J Rheumatol, 2009. **36**(9): p 1924-9.
399. Caramaschi P, Dalla Gassa A, Ruzzenente O, *et al.* *Very low levels of vitamin D in systemic sclerosis patients.* Clin Rheumatol, 2010. **29**(12): p 1419-25.
400. Ibn Yacoub Y, Amine B, Laatiris A, *et al.* *Bone density in Moroccan women with systemic scleroderma and its relationships with disease-related parameters and vitamin D status.* Rheumatol Int, 2012. **32**(10): p 3143-8.
401. Rios Fernandez R, Fernandez Roldan C, Callejas Rubio JL, *et al.* *Vitamin D deficiency in a cohort of patients with systemic scleroderma from the south of Spain.* J Rheumatol, 2010. **37**(6): p 1355; author reply 1356.
402. Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, *et al.* *Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review.* Autoimmun Rev, 2011. **10**(12): p 733-43.
403. Toubi E and Shoenfeld Y. *The role of vitamin D in regulating immune responses.* Isr Med Assoc J, 2010. **12**(3): p 174-5.
404. Pelajo CF, Lopez-Benitez JM, and Miller LC. *Vitamin D and autoimmune rheumatologic disorders.* Autoimmun Rev, 2010. **9**(7): p 507-10.
405. Lemire JM and Archer DC. *1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Clin Invest, 1991. **87**(3): p 1103-7.
406. Fernandes de Abreu DA, Eyles D, and Feron F. *Vitamin D, a neuro-immunomodulator: implications for neurodegenerative and autoimmune diseases.* Psychoneuroendocrinology, 2009. **34 Suppl 1**: p S265-77.
407. Hegyi Z, Zwicker S, Bureik D, *et al.* *Vitamin D analog calcipotriol suppresses the Th17 cytokine-induced proinflammatory S100 "alarmins" psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in psoriasis.* J Invest Dermatol, 2012. **132**(5): p 1416-24.
408. Sato-Deguchi E, Imafuku S, Chou B, *et al.* *Topical vitamin D(3) analogues induce thymic stromal lymphopoietin and cathelicidin in psoriatic skin lesions.* Br J Dermatol, 2012. **167**(1): p 77-84.
409. Boelsma E, Pavel S, and Ponec M. *Effects of calcitriol on fibroblasts derived from skin of scleroderma patients.* Dermatology, 1995. **191**(3): p 226-33.
410. Li Y, Spataro BC, Yang J, *et al.* *1,25-dihydroxyvitamin D inhibits renal interstitial myofibroblast activation by inducing hepatocyte growth factor expression.* Kidney Int, 2005. **68**(4): p 1500-10.
411. Ramirez AM, Wongtrakool C, Welch T, *et al.* *Vitamin D inhibition of pro-fibrotic effects of transforming growth factor beta1 in lung fibroblasts and epithelial cells.* J Steroid Biochem Mol Biol, 2010. **118**(3): p 142-50.
412. Slominski AT, Li W, Bhattacharya SK, *et al.* *Vitamin D analogs 17,20S(OH)2pD and 17,20R(OH)2pD are noncalcemic and exhibit antifibrotic activity.* J Invest Dermatol, 2011. **131**(5): p 1167-9.

413. Uchida M, Shima M, Chikazu D, *et al.* *Transcriptional induction of matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells.* J Bone Miner Res, 2001. **16**(2): p 221-30.
414. Zhang GY, Cheng T, Luan Q, *et al.* *Vitamin D: a novel therapeutic approach for keloid, an in vitro analysis.* Br J Dermatol, 2011. **164**(4): p 729-37.
415. Artaza JN and Norris KC. *Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells.* J Endocrinol, 2009. **200**(2): p 207-21.
416. Elst EF, Van Suijlekom-Smit LW, and Oranje AP. *Treatment of linear scleroderma with oral 1,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) in seven children.* Pediatr Dermatol, 1999. **16**(1): p 53-8.
417. Hulshof MM, Bouwes Bavinck JN, Bergman W, *et al.* *Double-blind, placebo-controlled study of oral calcitriol for the treatment of localized and systemic scleroderma.* J Am Acad Dermatol, 2000. **43**(6): p 1017-23.
418. Humbert PG, Dupond JL, Rochefort A, *et al.* *Localized scleroderma--response to 1,25-dihydroxyvitamin D3.* Clin Exp Dermatol, 1990. **15**(5): p 396-8.

**IX. ARTICULOS PUBLICADOS
RELACIONADOS CON LA TESIS**

EXTENDED REPORT

A profibrotic role for thymic stromal lymphopoietin in systemic sclerosis

Alicia Usategui,¹ Gabriel Criado,¹ Elena Izquierdo,¹ Manuel J Del Rey,¹ Patricia E Carreira,¹ Pablo Ortiz,² Warren J Leonard,³ José L Pablos¹

Handling editor Tore K Kvien

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202279>).

¹Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

²Servicio de Dermatología, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain

³Laboratory of Molecular Immunology and Immunology Center, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA

Correspondence to

Dr Jose L Pablos, Servicio de Reumatología, Hospital 12 de Octubre, Madrid 28041, Spain; jl.pablos@h12o.es

Received 29 June 2012

Revised 16 January 2013

Accepted 20 January 2013

ABSTRACT

Objective Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune disease characterised by progressive fibrosis. Although SSc shares pathogenetic features with other autoimmune diseases, the participation of profibrotic Th2 cytokines is unique to SSc, but the mechanisms of Th2 skewing are unknown. We have analysed the expression and function of thymic stromal lymphopoietin (TSLP), a central regulator of Th2-mediated allergic inflammation, in human SSc, primary lung fibrosis and in a mouse model of scleroderma.

Methods TSLP expression was analysed by immunohistochemistry in human SSc skin, primary lung fibrosis and mouse bleomycin-induced skin fibrosis, and by quantitative RT-PCR in mouse skin and cultured fibroblasts. The regulation of TSLP expression by specific toll-like receptors (TLR)-2, -3 and -4 agonists was analysed in human dermal fibroblast cultures. The role of TSLP in skin fibrosis and local cytokine expression was analysed in TSLP receptor (TSLPR)-deficient mice.

Results TSLP was overexpressed by epithelial cells, mast cells and fibroblasts in human SSc skin and lung fibrosis, and in the bleomycin model of scleroderma. In cultured human and mouse skin fibroblasts, TSLP expression was inducible by activation of TLR, particularly TLR3. In TSLPR-deficient mice, bleomycin-induced fibrosis was significantly reduced in parallel with significantly reduced local expression of IL-13.

Conclusions These data provide the first evidence of TSLP overexpression in SSc and other non-allergic fibrotic conditions, and demonstrate a profibrotic role that is potentially mediated by specific changes in the local cytokine milieu. Thus, modulating TSLP may have antifibrotic therapeutic implications.

INTRODUCTION

T-cell responses are central to the pathogenesis of systemic autoimmune inflammatory diseases. In this heterogeneous group of diseases, genetic susceptibility is mostly explained by allelic variation in multiple factors functionally related to antigen presentation and T-cell functions.^{1 2} Th1, Th2 and Th17 related cytokine responses may variably participate in autoimmune inflammatory diseases, but the differential factors that explain the predominance of a specific T-cell polarised phenotype in each specific disease are unclear. Systemic sclerosis (SSc) is unique among this group of diseases in that a relatively low level of inflammation is followed by an abnormal and persistent reparative response that leads to fibrosis and organ failure.^{3 4} Extensive studies from animal models, and human studies demonstrate that the

Th2 cytokines IL-4 and IL-13 promote fibrotic responses, whereas Th1 cytokines such as IFN- γ are antifibrotic.^{5 6} In SSc, some studies point to Th2 and Th17 skewing, but the underlying pathways and its pathogenetic relevance are unknown.⁷⁻¹¹ Dendritic cells (DC) from SSc patients show altered responses to toll-like receptors (TLR) activation *in vivo* suggesting that altered priming of DC *in vivo* might underlie Th2 and Th17 cell polarisation.¹²

Thymic stromal lymphopoietin (TSLP) is an epithelial cell-derived cytokine with the capacity to drive DC-mediated Th2 responses,^{13 14} as well as the ability to act directly on mouse and human CD4 and CD8 T-cells.¹⁵ Expression of TSLP has been found to be upregulated in keratinocytes of atopic dermatitis skin lesions and bronchial epithelial cells of asthmatic airways, where it plays a non-redundant role in Th2 mediated inflammation.^{14 16 17} TLR mediated responses may mediate TSLP upregulation by epithelial cells in this context.^{18 19} In addition, Th2 cytokines may provide an amplification loop by directly inducing TSLP expression in resident cells.^{19 20} This loop has been recently explored in IL-13 transgenic mice, a model of atopic dermatitis, where TSLP contributes to extracellular matrix (ECM) accumulation downstream of IL-13.²¹ TSLP is also involved in Th2 responses to parasitic infection where it plays a role in the acute but not in the chronic fibrotic phase of the disease.²² These observations point to TSLP as a common factor in Th2-mediated allergic and parasitic diseases, but its potential role in Th2 autoimmune fibrotic diseases is not known.

To analyse whether TSLP plays a role in the pathogenesis of primary immunomediated fibrotic conditions and its specific contribution to the development of fibrosis, we analysed the expression of TSLP in human SSc and lung fibrosis and its function in a mouse model of scleroderma.

METHODS

Patients

Skin biopsies were obtained from the involved skin of the forearms of 18 patients with diffuse SSc (mean disease duration 2.8 \pm 0.5 years). Lung fibrotic tissues from 18 patients with usual interstitial pneumonia (UIP) as diagnosed by CT scans and lung biopsy were also analysed. Control normal forearm skin samples were also obtained from seven unrelated healthy individuals during minor skin surgery. Normal lung specimens from the Hospital 12 de Octubre pathology files were also

To cite: Usategui A, Criado G, Izquierdo E, *et al.* *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2012-202279

OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS

- Del Rey MJ, **Usategui A**, Izquierdo E, Cañete JD, Blanco FJ, Criado G, Pablos JL. *Transcriptome analysis reveals specific changes in osteoarthritis synovial fibroblasts*. Ann Rheum Dis. 2012 Feb; 71(2):275-80.
- Santiago B, Izquierdo E, Rueda P, Del Rey MJ, Criado G, **Usategui A**, Arenzana-Seisdedos F, Pablos JL. *CXCL12 γ isoform is expressed on endothelial and dendritic cells in rheumatoid arthritis synovium and regulates T-cell activation*. Arthritis Rheum. 2012 Feb; 64(2):409-17.
- **Usategui A**, Del Rey MJ, Pablos JL. *Fibroblast abnormalities in the pathogenesis of systemic sclerosis*. Expert Rev Clin Immunol. 2011 Jul; 7(4):491-498.
- Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Del Rey MJ, **Usategui A**, Marsal S, Sanmartí R, Criado G, Pablos JL. *Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: Clinicopathological correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy*. Arthritis Rheum. 2011 Sep; 63(9):2575-83.
- Santiago B, Calonge E, Del Rey MJ, Gutierrez-Cañas I, Izquierdo E, **Usategui A**, Galindo M, Alcamí J, Pablos JL. *CXCL12 Gene Expression is Upregulated by Hypoxia and Growth Arrest but not by Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Synovial Fibroblasts*. Cytokine. 2011 Feb; 53(2):184-190.
- Del Rey MJ, Izquierdo E, **Usategui A**, Gonzalo E, Blanco FJ, Acquadro F, Pablos JL. *The transcriptional response to hypoxia of normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum. 2010 Dec; 62(12):3584-3594.
- Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Santiago B, **Usategui A**, Sanmantí R, Del Rey MJ, Pablos JL. *Immature blood vessels in rheumatoid synovium are selectively depleted in response to anti-TNF therapy*. PLoSOne. 2009 Dec; 4(12):E8131.
- Del Rey MJ, Izquierdo E, Caja S, **Usategui A**, Santiago B, Galindo M, Pablos JL. *Human inflammatory synovial fibroblasts induce enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis through a HIF1 α /VEGF mediated pathway in immunodeficient mice*. Arthritis Rheum. 2009 Oct; 60(10):2926-2934.

