

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



**CONTRIBUCIÓN DEL SINOVIOCITO FIBROBLÁSTICO A
LA RESPUESTA INMUNE ARTICULAR EN ARTITRIS
REUMATOIDE Y ARTROSIS : ESTUDIO DEL EFECTO
MODULADOR DE VIP**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Mar Carrión Caballo

Bajo la dirección de los doctores

Rosa Pérez Gomariz
Irene Gutiérrez Cañas

MADRID, 2013

Universidad Complutense de Madrid

**Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Biología Celular**



**Contribución del sinoviocito fibroblástico a la respuesta inmune
articular en artritis reumatoide y artrosis. Estudio del efecto
modulador de VIP.**

TESIS DOCTORAL

Mar Carrión Caballo

2013



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular

c/ José Antonio Novais, 2; 28040 Madrid

Tfno. 913944981 Fax 913944981

La Dra. **Rosa Pérez Gomariz**, Catedrática de Universidad y la Dra. **Irene Gutiérrez Cañas**, Profesora Contratada Doctora Interina del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que **Mar Carrión Caballo**, Licenciada en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid, el presente trabajo de investigación titulado: "Contribución del sinoviocito fibroblástico a la respuesta inmune articular en artritis reumatoide y artrosis. Estudio del efecto modulador de VIP", como Tesis Doctoral, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a 25 de abril de 2013

VºBº DIRECTORAS:

Rosa Pérez Gomariz

La interesada: Mar Carrión Caballo

Irene Gutiérrez Cañas

Agradecimientos

Mil veces he imaginado las primeras líneas de este texto. Las mismas veces que he ampliado la lista de nombres que debían aparecer, y ahora, llegado el momento, no sé cómo empezar, por dónde, ni por quién. No hay un guión para esto, ni unas normas a seguir, lo único que tengo claro es que debo a mucha gente el que hoy pueda estar escribiendo los “agradecimientos” de una Tesis que no hubiese sido posible sin su ayuda. Hace unas semanas leí una frase de José Luis Sampedro y sentí que lo decía todo: “Tenemos el deber de vivir la vida, de ser lo más en compañía de los demás, porque solos somos muy poca cosa”. Hoy, al pensar en todo el recorrido que me ha traído hasta aquí, estas palabras se han llenado de sentido y realidad.

Gracias a todo el grupo VIP/PACAP, o mejor dicho, a mi “familia científica”, porque sin vosotros no habría trabajos publicados, ni resultados, ni experimentos, ni conclusiones, porque sin vosotros, esta Tesis no existiría. Gracias por ser esa “familia” en la que “la persona es lo primero” y donde “todos tiran del carro” cuando a uno le fallan las fuerzas.

Rosa e Irene, siempre he pensado que ciertas palabras se desgastan de tanto utilizarlas, así que espero que mi “gracias” conserve todo su valor después de haber perdido la cuenta de las veces que os las he dado. Rosa, gracias por tu escucha, por tus cuidados y por la seguridad que me transmites, en lo personal y en lo profesional. Gracias, Irene, por tener siempre mil recursos ante un problema y la energía para solucionarlo. Vuestra dedicación, vuestro esfuerzo, vuestros consejos, han sido el motor de todo esto.

Yasmi, la tercera pieza del motor que hace que funcione, gracias por tu generosidad, por tu ayuda para descifrar el “lenguaje” de los resultados y por tus abrazos, que consiguen neutralizar todos los agobios. M^a Carmen, gracias por estar siempre pendiente de cómo me iban las cosas y por tener siempre palabras cariñosas y de ánimo. Javier, gracias por tu humor, porque haber bautizado a la sala donde escribía como “el paritorio”, fue muy acertado! Gracias también a Alicia, porque aunque hace tiempo que empezó su propio camino, fui su sombra en mi llegada al grupo y pude aprender mucho en poco tiempo. Selene y Rebeca, mis compañeras de travesía!! Unos cuantos años compartidos, tantas horas juntas que imaginar esto sin vosotras parece, simplemente, imposible. Por los buenos momentos y por los más difíciles, por las risas y los abrazos al final de un día duro, por estar siempre ahí, muchas gracias chicas! Iria, la familia se amplió contigo hace casi un año., has sido un soplo de aire fresco en esta última etapa, gracias por tu cariño!

David, Javi y Sara, para nosotras “los chicos” y “Sarita”, nuestros vecinos de puerta con puerta, gracias por el “apoyo logístico” que tantas veces nos dais y por haberme ofrecido vuestra ayuda estos días de tanto estrés, pero sobre todo, por vuestro buen humor y por esas sobremesas. Gracias a Agustín Zapata, porque sus comentarios hacen más entretenida la hora de la comida.

Gracias al Departamento de Biología Celular, porque una sonrisa a mitad del pasillo o una palabra de ánimo siempre ayuda. Gracias al grupo de Agustín González por socorrernos siempre que hemos tenido algún problemilla técnico; a Sandra por su sonrisa permanente y su compañía a la hora del café; a Teresa por tener siempre un gesto cariñoso y solucionar todo el papeleo; y especialmente, a Benjamín porque sus visitas por la tarde, su humor y su vitalidad, son una inyección de energía para continuar trabajando. Y aunque ya no se oiga su risa por los pasillos, gracias a Laura, por haber contagiado siempre esa alegría y también a Fernando, por sus palabras de ánimo. Gracias a los visitantes de “tierras lejanas”, a Desio por convertir la hora del café en todo un ritual; a Joana, por sobrevivir al invierno madrileño sin perder esa sonrisa caribeña y a Raúl, que aunque venga del Autónoma, nos resulta muy exótico en un grupo con tanta chica! Gracias al equipo del Hospital 12 de Octubre por “abrirnos las puertas” para todo lo que hemos necesitado. Gracias al “comodín de la llamada” de Cifra System, Alfonso y Jose nos han salvado de muchos momentos de pánico informático!

Y estos agradecimientos, los de la parte universitaria, quiero terminarlos dando las gracias a la persona sin la cual nunca hubiese subido al Departamento, sin la que nada de esto hubiese ocurrido. Gracias Elena, por acercarte a mí cuando llegué y no conocía a nadie, por haber compartido esos años de convivencia con Mire y conmigo, gracias!

Por supuesto, gracias a todos los que habéis conseguido que todo este esfuerzo sea más llevadero y que me haya sentido tan arropada. Gracias Selene, por todo lo que vivimos en Creta y por haber permanecido juntas, por ser tan buena amiga y por contar siempre con tu apoyo. Gracias JR, por poder entenderme con tan pocas palabras, por transmitirme todo ese cariño y confiar tanto en mí. Gracias Gloria, porque aunque ahora nos separen muchos kilómetros y hablemos muy poco, sigo sintiendo que estás muy cerca. Gracias a todos: Carmina, Mica, Emilio, Raúl, Arantxa, Aisa, porque las escapadas a Valencia y las risas con vosotros son la mejor terapia que existe. Gracias Santi, por haber sido ese hermano mayor que me ha protegido y ayudado tanto. Gracias Anabel, por nuestras "xarraetes" trascendentales. Gracias Dioní, por haber compartido tan buenos momentos alrededor de una mesa con buen vino o una cerveza fría. Gracias a todos los "amigos de Alfonso", por lo mucho que me río con vosotros y lo a gusto que estoy, por haber demostrado el valor más extenso de la amistad. El día de la Tesis que no falten los boquerones, por favor!

Gracias a mis tíos, Suren y Luisa, y a Pablo, mi primo, por todo lo que hemos compartido, por recibirme siempre con un abrazo de verdad, por enseñarme la amplitud del mundo en el que vivimos, por descubrirme Madrigal de la Vera. Gracias a mi tía Mari por darnos tanto cariño, por haber jugado tanto con nosotras y seguir mimándonos. Gracias al tío Rafa, por hacernos llegar todo el amor que nos tenía, sin haber podido estar con nosotras. Gracias al tío Bruno, por las señales marineras y por sus llamadas para ayudarme a decidir la carrera que quería estudiar. Gracias a mis tíos Toni y Manoli y a mis primos, Rubén y Ana, por los paseos al cole y las meriendas compartidas.

Vivir la vida, apostar por ella, reconstruirla, esforzarse por mejorarla...he crecido rodeada de ejemplos que me han demostrado que todo eso merece la pena cuando la vida también se disfruta y comparte. Por eso, quiero dar las gracias a mis "iaios", Rafa y Manolo, por su esfuerzo y su ilusión por progresar, por superar muchas dificultades y conseguir dejarlas atrás, pero sobre todo por habernos querido tanto y habernos transmitido tanto cariño. A su lado, mis "iaias", Carmen y Maruja, que nos han demostrado su amor siguiendo hacia delante. Gracias por mimarnos y por estar siempre pendientes de todo, gracias por vuestras llamadas (me alegran la tarde!) y vuestros abrazos (es lo que más me alimenta!).

Gracias a mis padres, Tomás y María, por su apoyo incondicional, gracias por quererme tanto y por decírmelo muchas veces, por hacerme sentir que siempre estáis a mi lado, por confiar en mí y darme más valor a mi esfuerzo que al resultado. Por habernos educado "para ser buenas personas" y ser el mejor ejemplo. A mi hermana, Mireia, gracias por tener siempre las palabras o el abrazo que necesito, por conocerme mejor que yo a mí misma y ayudarme a entenderme, por escucharme y no darme siempre la razón, por tirar de mí cuando me resistía a salir, por tu complicidad y por hacerme reír tanto.

Alfonso, ahora puedo agradecerte toda la paciencia que has tenido, todo lo que me has facilitado el camino, todas las veces que me has ayudado a ver las cosas de una manera más sencilla. Ahora puedo darte las gracias por ser tan buen compañero, por hacerme sentir que me quieres sin condiciones, por demostrarme que, muchas veces, una risa es la mejor solución, porque todo mi esfuerzo tenga sentido si puedo compartir mis metas contigo.

Resumir los "agradecimientos" de todos estos años en un par de páginas, es injusto. Hay demasiados nombres que no aparecen. Confío en que os sepáis reconocer en este último GRACIAS, que es para todos los que habéis compartido algún momento de este largo camino.

GRACIAS A TODOS!



Esta tesis se ha llevado a cabo gracias a los proyectos del Instituto de Salud Carlos III, PI08/0025 y PI12/00758 y al programa RETICS, RIER RD08/0075/0005 y RD12/0009/0002

Abreviaturas



AC	Adenilato ciclasa	FLG	Filagrina
ACPA	Anticuerpos anti-proteínas citrulinadas	FLS	Sinoviocito fibroblástico, sinoviocitos de tipo B, fibroblasto sinovial
ACTH	Hormona adrenocorticotropa	FR	Factor reumatoide
ADAMTS	Desintegrina y metaloproteinasa con dominios de trombospondina	GABA	Ácido gamma-aminobutírico
AIA	Artritis inducida por adyuvante	GDP	Guanosín difosfato
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo	GIP	Péptido inhibidor gástrico
AMPc	Adenosina 3q 5qmonofosfato cíclico	GIPs	proteínas de interacción con los GPCRs
AP-1	Proteína activadora 1	GIPLs	Fosfolípidos de glicoinositol
AR	Artritis reumatoide	GLP	Péptido relacionado con glucagón
ATP	Adenosín trifosfato	GRF	Factor liberador de la hormona de crecimiento
BAFF	Factor Activador de células B	GRH	Hormona liberadora de GH
CARD	Dominio de reclutamiento de caspasas	GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
CFTR	Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosos quística	GRK	Proteína quinasa de GPCR
CIA	Artritis inducida por colágeno	GTP	Guanosín trifosfato
COMP	Proteína oligomérica de la matriz del cartilago	HDAC	Enzimas de desacetilación de las histonas
COX-2	Ciclooxigenasa-2	HIF-1	Factor de transcripción inducible por hipoxia 1
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico	HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
CRF	Factor liberador de corticotropina	HLA	Antígeno leucocitario humano
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo	HMGB1	Grupo proteico de alta movilidad
CTLA-4	Antígeno asociado a linfocito T citolítico	HSPs	Proteínas de choque térmico
C5	Componente 5 del complemento	IC	Intracelular
DAG	Diacilglicerol	ICAM-1/CD54	Molécula de adhesión intercelular-1
DC	Célula dendrítica	IFN	Interferón
DMARDs	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad	IgG	Inmunoglobulina G
DNA	Ácido desoxirribonucleico	I B	Proteína inhibidora de NF- B
DNA CpG	Ácido desoxirribonucleico enmarcado en motivo CpG no metilado	IKK	Quinasa de I B
Dnmt1	Metiltransferasa 1 de DNA	IL	Interleucina
dsRNA	RNA de doble hebra	IL-1R	Rceptor de IL-1
DSS	Dextrano sulfato de sodio	iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
EC	Extracelular	IP ₃	Inositoltrifosfato
EC ₅₀	Concentración efectiva media	IP-10	Proteína inducible por IFN
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilos	IPS-1	Estimulador del promotor de IFN
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	IRAK	Quinasa asociada al receptor de IL-1
EMCV	Virus de la encefalomiocarditis	IRF	Factor regulador de IFN
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares	ISG	Genes inducibles por interferón
Fc	Fragmento cristalizante (de una inmunoglobulina)	ISRE	Regiones de respuesta al IFN
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	JAK	Janus-quinasa
		JNK	Quinasa N-terminal de cJun
		KLK7	Peptidasa relacionada con la calicreína 7

KO	Knockout	pDCs	Células dendríticas plasmacitoides
KRT1	Queratina1	PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
LAM	Lipoarabinomannan	PGE ₂	Prostaglandina E2
LFA-1	Antígeno-1 asociado a la función de los leucocitos	PGN	Peptidoglicano
LES	Lupus eritematoso sistémico	PHA	Fitohemaglutinina
LPS	Lipopolisacárido	PHI	Péptido histidina-isoleucina
LTA	Ácido lipoteicoico	PHM	Péptido histidina-metionina
LT _i	Células T inductoras de tejido linfoide	PIAS	Proteína inhibidora de STAT activadas
LRR	Repeticiones ricas en leucina	PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
MAPK	Proteínas quinasa activadas por mitógenos	PKA	Proteína quinasa A
MAPKK	Quinasa de la MAPK	PKC	Proteína quinasa C
MAPKKK	Quinasa de la quinasa de MAPK	PLC	Fosfolipasa C
M-CSF	Factor estimulador de colonias monocito-macrófago	PLD	Fosfolipasa D
MDA5	Gen asociado a la diferenciación de melanoma 5	PMA	Acetato de forbol miristato
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad	poly (I-C)	Ácido poliinosínico- policitidílico
MIP-1 / CCL3	Proteína inflamatoria de macrófagos 1	PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares
MIP-3 / CCL20	Proteína inflamatoria de macrófagos 3	PTEN	Gen homólogo de la fosfatasa y tensina
MLS	Sinoviocitos macrofágicos, sinoviocitos de tipo A	PTP	Proteína tirosina fosfatasa
MMP	Metaloproteinasa de matriz	PTPN22	Proteína tirosina fosfatasa N22
MMP1	Metaloproteinasa 1, colagenasa 1, colagenasa intersticial	RAMPs	Proteínas modificadoras de la actividad del receptor
MMP3	Metaloproteinasa 3, estromelina 1	RANK	Receptor activador de NF- B
MMP9	Metaloproteinasa 9, gelatinasa B	RANKL	Ligando de unión a RANK
MMP13	Metaloproteinasa 13, colagenasa 3	RD	Dominio represor
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero	RIG-I	Gen inducible por ácido retinoico-I
MT-MMP	Metaloproteinasa asociada a la membrana	RLRs	Receptores de tipo RIG-I
MyD88	Factor de diferenciación mieloides 88	SAPK	Proteínas quinasas activadas por estrés
NF- B	Factor nuclear-kappa B	SARM	<i>Sterile alpha and Armadillo repeat molecule</i>
NK	Natural killer	SCID	Inmunodeficiencia severa combinada
NLRs	Receptores tipo NOD	SER	Sociedad Española de Reumatología
NOD	Dominio de unión a nucleótidos de oligomerización	SNC	Sistema nervioso central
NOD	Ratones diabéticos no obesos	SOCS	Supresor de la señalización de citocinas
OA	Artrosis, osteoartritis	RNA	Ácido ribonucleico
OPG	Osteoprotegerina	siRNA	Pequeñas moléculas de ARN de interferencia
PAC1	Receptor de PACAP	ssRNA	Ácido ribonucleico de hebra sencilla
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria	snRNP	Pequeñas partículas de ribonucleoproteínas nucleares
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos	STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
		TAB	Proteínas de unión a TAK1



TAK1	Quinasa activada por TGF	TRAM	Molécula adaptadora asociada a TRIF
TBK	Quinasa de unión a TANK	TRAP/Mal	Fosfatasa ácida resistente al tartrato
TCR	Receptor clonotípico de linfocito T	Treg	Células T reguladoras
TGF-	Factor de crecimiento transformante	TRIF	Adaptador inductor de IFN que contiene un dominio TIR
Th	Células T helper o T colaboradoras	TSE	Elemento regulador de la expresión específica de tejido
TICAM	TIR-domain containing adaptor molecule	UDPGD	Enzima uridina difosfogluosa deshidrogenasa
TIMP	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas	VCAM-1/ CD106	Molécula de adhesión celular vascular
TIR	Receptor Toll/IL-1	VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
TIRAP	Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR	VIP	Péptido intestinal vasoactivo
TLR	Receptor tipo Toll	VPAC1	Receptor para VIP y PACAP tipo I
TM	Transmembrana	VPAC2	Receptor para VIP y PACAP tipo II
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico	WNV	Virus West Nile
TNF	Factor de necrosis tumoral		
TNFR	Receptor de TNF		
TRAF	Factor asociado a TNFR		

Índice



1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedades reumáticas	1
1.2. La articulación sinovial	1
1.3. La artritis reumatoide (AR)	4
1.3.1. Orígenes, epidemiología, manifestaciones clínicas y etiología	4
1.3.2. Histofisiopatología.....	7
1.3.2.1. Infiltrado inflamatorio en la subíntima sinovial	7
1.3.2.2. Hiperplasia de la íntima sinovial	8
1.3.2.3. Angiogénesis	9
1.3.3. Componentes celulares implicados	10
1.3.3.1. Células del sistema inmune.....	10
1.3.3.1.1. Sistema inmune innato.....	11
1.3.3.1.2. Sistema inmune adaptativo	11
1.3.3.2. Células residentes	16
1.4. Sinoviocitos fibroblásticos en la AR	17
1.4.1. Características fenotípicas y funcionales.....	17
1.4.2. Factores y mecanismos de activación	19
1.4.2.1. Mediadores inflamatorios.....	20
1.4.2.2. Interacciones celulares	21
1.4.2.3. Receptores de reconocimiento de patrones moleculares.....	21
1.4.2.4. Productos de la destrucción de los tejidos articulares.....	21
1.4.3. El sinoviocito fibroblástico y la destrucción del cartílago	22
1.4.4. El sinoviocito fibroblástico y la destrucción del hueso	25
1.4.5. Interacciones celulares de los sinoviocitos fibroblásticos	27
1.4.5.1. Sinoviocitos fibroblásticos y macrófagos	27
1.4.5.2. Sinoviocitos fibroblásticos y células del infiltrado inflamatorio.....	28
1.4.5.2.1. Sinoviocitos fibroblásticos y células T	28
1.4.5.2.2. Sinoviocitos fibroblásticos y células B.....	30
1.5. La artrosis (OA).....	31
1.5.1. Epidemiología, etiología y manifestaciones clínicas.....	31
1.5.2. Histofisiopatología.....	32
1.5.3. Sinoviocito fibroblástico en la OA	33
1.6. Principales vías de señalización y factores de transcripción del sinoviocito fibroblástico en las enfermedades reumáticas	34
1.6.1. Vía de las MAPK.....	35
1.6.2. Vía del NF- κ B.....	38
1.6.3. Vía de JAK/STAT	38

1.6.4. Factores de transcripción AP-1.....	39
1.6.5. Factores de transcripción IRFs.....	40
1.7. Estrategias terapéuticas en el tratamiento de la AR y la OA.....	41
1.8. Péptido Intestinal Vasoactivo. Mediador neuroinmune.....	43
1.8.1. Neuroimmunomodulación.....	43
1.8.2. Péptido intestinal vasoactivo (VIP).....	44
1.8.2.1. Estructura bioquímica de VIP.....	48
1.8.2.2. El gen de VIP, su regulación y traducción.....	49
1.8.2.3. Receptores de VIP.....	51
1.8.2.3.1. Receptor VPAC1.....	52
1.8.2.3.2. Receptor VPAC2.....	53
1.8.2.3.3. Receptor PAC1.....	53
1.8.2.4. Vías de señalización de VIP.....	54
1.8.2.5. Agonistas y antagonistas de los receptores de VIP.....	57
1.8.2.6. VIP como agente terapéutico.....	58
1.8.2.6.1. Efecto de VIP en el modelo murino de artritis inducida por colágeno.....	59
1.8.2.6.2. Efecto de VIP en células de pacientes con AR.....	60
1.8.2.6.3. Limitaciones del uso terapéutico de VIP.....	61
1.9. Receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs).....	62
1.9.1. Receptores tipo Toll (TLRs).....	63
1.9.1.1. Estructura, ligandos y localización celular.....	64
1.9.1.2. Vías de señalización asociadas a TLRs.....	67
1.9.1.3. TLRs de reconocimiento de RNA: TLR3 y TLR7.....	69
1.9.1.4. TLRs, homeostasis y enfermedad.....	70
1.9.2. Receptores tipo RIG-I (RLRs).....	72
1.9.2.1. Estructura y ligandos.....	72
1.9.2.2. Vías de señalización asociadas a RLRs.....	74
1.10. La interleuquina IL-22.....	75
1.10.1. Características moleculares de la IL-22.....	76
1.10.2. Funciones biológicas de la IL-22.....	77
1.10.2.1. Papel de la IL-22 en la AR.....	77
1.11. Las alarminas S100A8 y S100A9.....	79
1.11.1. Características moleculares de S100A8 y S100A9.....	79
1.11.2. S100A8 y S100A9 en la AR y en la OA.....	79
2. OBJETIVOS.....	81
3. ARTÍCULOS.....	85



3.1. Artículo 1	87
3.2. Artículo 2	99
3.3. Artículo 3	111
3.4. Artículo 4	123
3.5. Revisión.....	139
4. DISCUSIÓN.....	159
5. CONCLUSIONES	177
6. ABSTRACT.....	181
7. BIBLIOGRAFÍA.....	189
8. OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS	225

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enfermedades reumáticas

Bajo la denominación de enfermedades reumáticas se incluye un conjunto de trastornos musculoesqueléticos heterogéneos en su origen y desarrollo, cuya progresión puede derivar en procesos sistémicos y afectar a diferentes órganos internos. La artritis reumatoide (AR) y la artrosis u osteoartritis (OA) se encuentran entre las más de 200 patologías que integran este amplio grupo de dolencias. Ambas enfermedades conllevan la destrucción de las estructuras articulares afectadas y, por consiguiente, la discapacidad funcional de las mismas (SER, 2008).

En el mundo industrializado, las enfermedades reumáticas presentan una alta prevalencia, que aumenta con la edad y es particularmente elevada en personas mayores de 75 años. El número global de afectados en Europa supera los 100 millones de habitantes. Concretamente, se estima que el 25% de la población española sufre alguna de las diferentes patologías musculoesqueléticas (Carmona *et al.*, 2001). Este tipo de desórdenes aparece en todos los grupos de edades y en ambos géneros, aunque el mayor número de los casos se diagnostica en mujeres que superan los 65 años.

Las enfermedades reumáticas suponen un gran coste social por su alta prevalencia, su tendencia a la cronicidad y la limitación funcional que con frecuencia ocasionan. Son la primera causa de incapacidad laboral en la población activa, siendo también responsables de un elevado número de casos de dependencia. Aunque se desconoce la etiología concreta de estas patologías, se han identificado algunos factores de riesgo, como son la edad avanzada, factores genéticos, exceso de peso corporal, el hábito de fumar y el desempeño de ocupaciones que supongan una sobrecarga de las articulaciones (Gauthy, 2007; EULAR, 2009).

1.2. La articulación sinovial

La **articulación diartrodial, sinovial** o **diartrosis** se define como el conjunto de estructuras que aproximan al menos dos huesos, unidos por ligamentos y tendones, cuyos extremos están recubiertos por cartílago articular (Figura 1). Las diartrosis se caracterizan por permitir el movimiento entre dos elementos esqueléticos que se encuentran separados por una cavidad articular delimitada por una **cápsula**, la cual envuelve a la articulación y le proporciona soporte estructural (Sobotta y Welsch, 2009).

Los extremos articulares de los huesos están recubiertos por **cartílago de tipo hialino**, cuyas características moleculares le confieren las propiedades biomecánicas, viscoelásticas y compresivas por las que es capaz de proteger a las superficies óseas e impedir su desgaste. Los **condrocitos** son las células residentes de este tejido conectivo y su función es sintetizar y secretar los componentes orgánicos de la matriz extracelular, básicamente constituida por colágeno, ácido hialurónico, proteoglicanos y glicoproteínas. Así, el cartílago articular hialino se compone de un número reducido de condrocitos, incluidos en una matriz extracelular de gran contenido en agua, formada por una compleja red de fibras de colágeno de tipo II, IX y X, y una elevada concentración de proteoglicanos, concretamente de agreganos. Este tejido carece de inervación y de vasos sanguíneos, de modo que los condrocitos se nutren por difusión a partir del líquido sinovial y de los pequeños vasos epifisarios (Ross *et al.*, 2007; Martel-Pelletier y Pelletier, 2010).

Subyacente al cartílago articular se encuentra el **hueso subcondral**, que incluye el inicio de la médula ósea y el frente de mineralización o zona de unión entre el cartílago calcificado y el no calcificado. Además de nutrir las zonas más profundas del cartílago, sirve como soporte y distribuye la carga que recibe el cartílago articular, absorbiendo la tensión de los impactos mecánicos. El tejido óseo está constituido por diversos tipos celulares específicos, entre los que se incluyen osteocitos, osteoblastos y osteoclastos, rodeados de una matriz formada fundamentalmente por colágeno de tipo I y otros componentes inorgánicos como proteoglicanos. El hueso está sometido a un proceso de remodelación continuo en el que se mantiene un equilibrio fisiológico entre la síntesis de matriz ósea, realizada por los osteoblastos, y la degradación de la misma, efectuada por los osteoclastos (Martel-Pelletier y Pelletier, 2010).

La **cápsula articular** de las diartrosis delimita el espacio articular, presentando estructuras que varían en función de la articulación considerada. En general, consta de una membrana fibrosa externa, formada por tejido conjuntivo denso, y de una membrana sinovial o cubierta interna, que reviste la cavidad y desarrolla pliegues y vellosidades. Esta cápsula es capaz de controlar el volumen y composición del **líquido sinovial** que rellena la cavidad articular (Sobotta y Welsch, 2009). Dicho **líquido sinovial**, de aspecto viscoso y compuesto por un dializado de plasma enriquecido en ácido hialrónico, nutre y lubrica las superficies del cartílago, manteniendo unas condiciones no adherentes que permiten el movimiento (Smith, 2011).

La **membrana sinovial** puede dividirse anatómica y funcionalmente en dos capas. En contacto con la cavidad articular, en posición superficial limitante, se encuentra una fina capa de 2 ó 3 células de espesor conocida como **íntima sinovial** (*lining*). En un nivel más profundo se localiza la capa **subíntima** o subsinovial (*sublining*), formada por tejido conectivo inervado y vascularizado (Smith, 2011).

La **capa íntima** de la membrana sinovial está constituida principalmente por dos tipos celulares de morfología y linaje distintos: los sinoviocitos macrofágicos o de tipo A (**MLS**, *macrophage-like synoviocyte*) y los sinoviocitos fibroblásticos o de tipo B (**FLS**, *fibroblast-like synoviocyte*). Dichas células sinoviales se estructuran en una capa muy fina mediante uniones celulares que, lejos de formar una barrera consistente, permiten la comunicación entre el espacio articular y la capa subíntima (Bartok y Firestein, 2010). De modo que la capa íntima sinovial presenta una estructura particular, ya que no constituye un epitelio y tampoco un endotelio, carece de una lámina basal propia y las células que la componen se organizan sin emplear estructuras específicas de adhesión como uniones fuertes o desmosomas (Chang *et al.*, 2010).

Los **MLS** son células de origen hematopoyético mielóide que presentan un fenotipo común al de los macrófagos residentes en otros tejidos conjuntivos y una potencial capacidad fagocítica evidenciada por las vacuolas que pueden apreciarse en su interior. Los sinoviocitos de tipo A son células diferenciadas, que se caracterizan por expresar CD11b, CD68, CD14, CD16 y antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) (Kennedy *et al.*, 2011).

Los **FLS** de la capa íntima sinovial son células mesenquimales con apariencia morfológica de fibroblastos, con los que comparten algunas características, como es la expresión de **colágeno de tipo IV y V**, **vimentina** y **CD90**. Cuentan con un retículo endoplásmico y un complejo de Golgi muy desarrollados, debido a una gran actividad secretora de proteínas de la matriz extracelular, como son

fibronectina, colágeno de tipo IV, laminina, proteoglicanos, fibrilina-1 y colágeno de tipo VI (Revell *et al.*, 1995). Entre las propiedades diferenciales que poseen, destaca la expresión de **cadherina-11**, una molécula de adhesión específica, mediadora de las uniones homeotípicas que dichas células establecen en la íntima (Valencia *et al.*, 2004). Además, cuentan con una elevada presencia de la enzima uridina difosfoglucoasa deshidrogenasa (**UDPGD**), situada en las primeras etapas de la ruta de síntesis del ácido hialurónico, producto que, junto a otras glicoproteínas, secretan al líquido sinovial. También en estas células se ha detectado la expresión de moléculas de adhesión vascular (**VCAM-1/CD106**, *vascular cell adhesion molecule*), moléculas de adhesión intracelular (**ICAM-1/CD54**, *intracellular adhesion molecule*), integrinas **4 1/VLA-4** y **CD55**. Cabe señalar que VCAM-1 no aparece en el resto de células mesenquimales y, aunque se desconoce su función particular, se postula su posible participación en la unión de células mononucleares al tejido sinovial o en el anclaje de los FLS a la matriz extracelular. No obstante, la presencia de algunas de las moléculas anteriormente señaladas, como VCAM-1, cadherina-11, UDPGD o CD55, puede variar en función del estado fisiopatológico, la exposición de los fibroblastos a citocinas o de la localización de éstos en la membrana sinovial, de modo que su utilidad como marcadores de dicho tipo celular es limitada (Edwards *et al.*, 1997; Hamann *et al.*, 1999; Wilkinson *et al.*, 1993). En este sentido, se ha comprobado que la expresión de la chaperona específica de colágeno **hsp47** es constitutiva en los FLS e independiente del estado de activación, habiéndose demostrado la utilidad de su detección inmunohistoquímica como marcador fibroblástico en estudios cuantitativos sobre tejido sinovial normal o patológico (Goodpaster *et al.*, 2008, Izquierdo *et al.*, 2011).

Subyacente a la capa íntima, existe una **red de capilares** que median la transferencia de agua, glucosa, electrolitos y otros solutos al líquido sinovial, así como un conjunto de pequeñas vénulas que se proyectan hacia la subíntima. La **subíntima** constituye una capa de tejido conectivo de aspecto menos definido que la íntima, y en ella se localizan arteriolas y vénulas de mayor tamaño junto a un plexo de vasos linfáticos que drenan el exceso de fluido en la cavidad articular, permitiendo regular la presión del líquido sinovial. En esta capa de la membrana sinovial, el contenido celular es reducido y básicamente se identifican FLS, células T (CD4⁺ y CD8⁺), macrófagos y un número reducido de células B, células plasmáticas, células dendríticas (DCs) y mastocitos (Smith *et al.*, 2011).

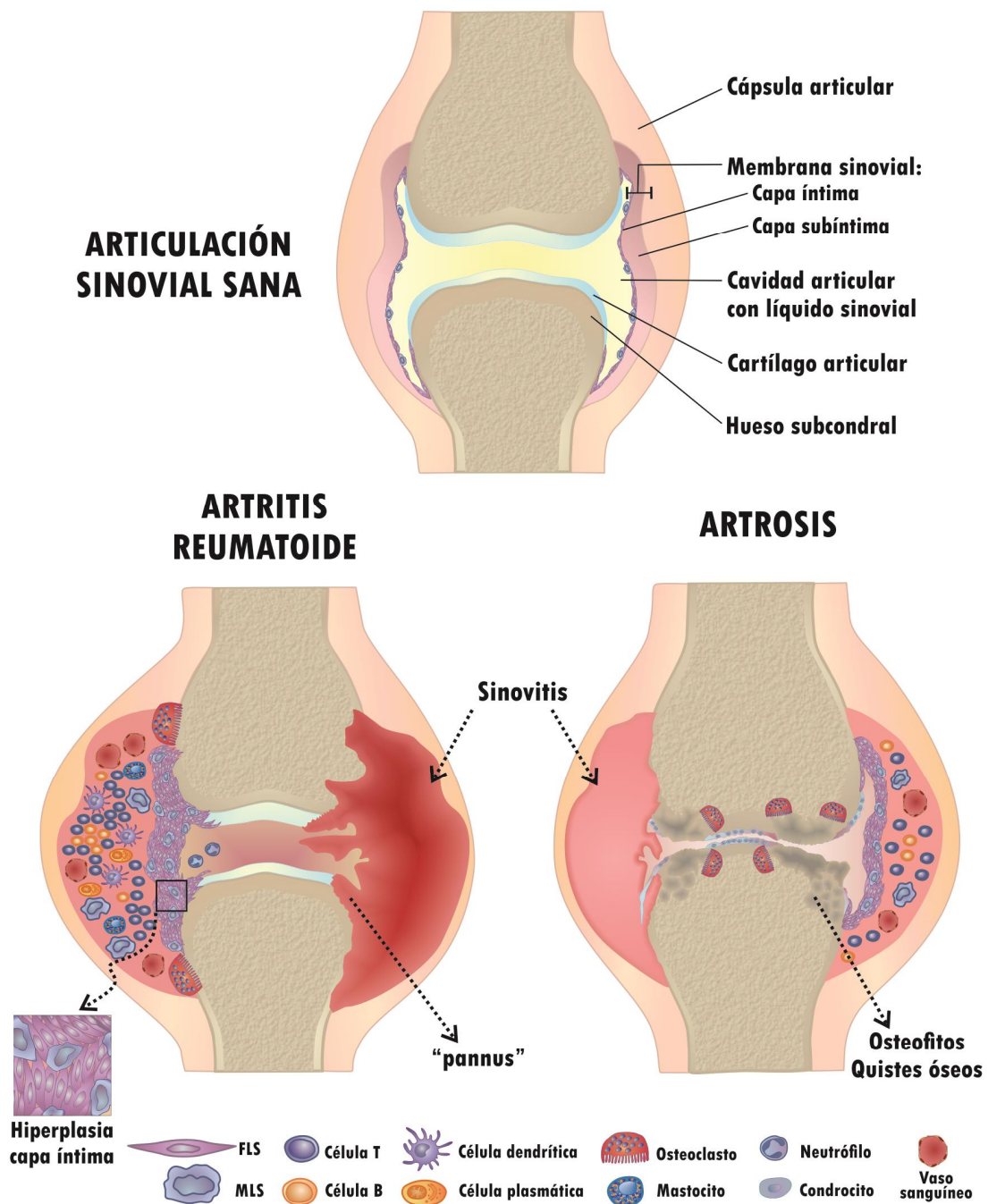


Figura 1. Esquema general de una articulación sinovial. Estructura y elementos celulares de una articulación sinovial sana y principales cambios observados en la artritis reumatoide y en la artrosis.

1.3. La artritis reumatoide (AR)

1.3.1. Orígenes, epidemiología, manifestaciones clínicas y etiología

La AR es una enfermedad **inflamatoria** crónica, sistémica y **autoinmune** que afecta principalmente a las **articulaciones sinoviales**, provocando su **deformidad** y **discapacidad** funcional (Noss y Brenner, 2008; Chang *et al.*, 2009). Datos paleopatológicos demuestran que, mientras patologías como la artritis anquilosante y la gota surgieron en Europa y el Norte de África,

las lesiones óseas características de la AR se describen, por vez primera, en las tribus nativas de América del Norte (Firestein, 2003). En la actualidad, la prevalencia de la AR en estas mismas regiones permanece extraordinariamente alta, llegando a un 5%. En Europa, su aparición data de comienzos del siglo XVII, siendo representada por primera vez en el arte holandés, en el lienzo *La familia de Jordaens en un jardín* del pintor Jacob Jordaens (año 1630). Aunque el primer caso fue publicado en 1676 por Sydenham, la enfermedad no fue identificada en su totalidad en ese momento. En 1859, Garrod la definió y denominó como *reumatoide*, para distinguirla de dos formas de artritis entonces bien conocidas, la fiebre reumática y la gota. A comienzos del siglo XX, la AR se diferenció de la artrosis, la cual fue definida como una artritis deformante. En 1957, Charles Short clasificaba definitivamente la AR y la distinguía de otras patologías reumáticas (Firestein, 2003).

En la actualidad se estima que, a nivel mundial, entre el 0,5 y el 1% de la población adulta padece AR, superando en **prevalencia** a otras enfermedades autoinmunes como la diabetes mellitus tipo 1 o la esclerosis múltiple (Reginster, 2002). Estudios epidemiológicos realizados en países industrializados indican que anualmente se registran entre 5 y 50 nuevos casos por cada 100.000 habitantes, siendo tres veces más frecuente su aparición en mujeres que en hombres. La prevalencia de la AR aumenta con la edad y es máxima en mujeres mayores de 65 años. Su pico de incidencia se encuentra entre la tercera y la quinta década de vida (Scott *et al.*, 2010; Sweeney y Firestein, 2004).

La AR se caracteriza por el desarrollo de una respuesta inflamatoria persistente localizada principalmente en la membrana sinovial de las articulaciones periféricas. El tejido sinovial reumatoide, además de encontrarse infiltrado por células inflamatorias, sufre una alteración de los elementos celulares que lo constituyen. Ambos eventos contribuyen al establecimiento de la inflamación crónica sinovial o **sinovitis** y al desarrollo del denominado **pannus**, un tejido patogénico que adquiere comportamiento pseudotumoral (Figura 1). El *pannus* se expande e invade el cartílago articular y el hueso subcondral adyacentes, provocando su destrucción, en un proceso mediado por la actividad de osteoclastos, condrocitos y FLS (Bartok y Firestein, 2010).

El desarrollo de la AR comienza lenta y progresivamente, alternándose periodos de exacerbación y remisión. Las molestias y limitaciones ocasionadas por esta enfermedad presentan gran variabilidad entre los pacientes, constituyendo una patología heterogénea en su sintomatología y de difícil diagnóstico en etapas tempranas (Scott *et al.*, 2010). Los **síntomas** iniciales son astenia, debilidad y/o dolores musculoesqueléticos generalizados. Las manifestaciones articulares aparecen en fases más avanzadas y suelen afectar de manera bilateral y simétrica a las articulaciones metacarpofalángicas, interfalángicas proximales y carpos, respetando las articulaciones interfalángicas distales. La afectación de las grandes articulaciones, cuando existe, suele ser más tardía. Los síntomas a nivel local son dolor y rigidez matutina, enrojecimiento, sensibilización y engrosamiento de la articulación, con anquilosis en los estadios más avanzados. A pesar de que la localización fundamental de las lesiones producidas por la AR son las articulaciones sinoviales, también se describen manifestaciones extra-articulares como fiebre, fatiga, anorexia y pérdida de peso. Además, la progresión de la enfermedad puede ocasionar lesiones granulomatosas o nódulos reumatoides, lesiones vasculares (vasculitis reumatoide raramente necrotizante) y, ocasionalmente, neuropatías (pérdida de sensibilidad por compresión de nervios sensoriales por el tejido inflamado) y

alteraciones en los órganos linfoides secundarios (linfadenopatías y esplenomegalias) (Smolen *et al.*, 2007).

Por otra parte, también es característica la presencia de **autoanticuerpos**, como son el factor reumatoide (**FR**) y los anticuerpos anti-péptidos citrulinados (**ACPA**). El FR reacciona con la fracción constante (Fc) de la inmunoglobulina G (IgG) y los ACPA son capaces de reconocer diferentes proteínas en forma citrulinada. La citrulinación es una transformación enzimática postraduccional que consiste en la conversión de los residuos de arginina a citrulina (Cantaert *et al.*, 2006). Aunque ambos anticuerpos pueden ser detectados con años de antelación respecto a otros signos clínicos, el FR no se considera específico de la AR, ya que el 5% de personas sanas presenta una prueba positiva y puede aparecer de manera transitoria tras una vacunación o una transfusión (Arend y Firestein, 2012; Aletaha *et al.*, 2010). No obstante, estudios clínicos en pacientes con AR han mostrado como la presencia de ACPA se asocia a un aumento del daño articular y del contenido en linfocitos del tejido sinovial que dificultan la de remisión de la enfermedad (van der Helm-van Mil *et al.*, 2005). De hecho, en función de la presencia de FR, ACPA o de los dos, pueden establecerse subgrupos de pacientes, habiéndose descrito una evolución de la enfermedad diferente entre ellos que, por tanto, sugiere un valor pronóstico para los mismos (van Oosterhout *et al.*, 2008).

En cuanto a la **etiología** de la AR, aunque sigue siendo desconocida, se le atribuye un origen multifactorial en el que intervienen factores ambientales y una predisposición genética individual (Firestein, 2003).

Son múltiples los genes que han sido implicados tanto en la **susceptibilidad** de padecer la AR como en la determinación de la **severidad** con la que se desarrolla. Los **genes de riesgo** asociados a la patología se encuentran principalmente relacionados con la inmunidad, concretamente con mecanismos de presentación antigénica y activación de células T. En este sentido, la principal asociación genética identificada en la AR es la establecida con determinados alelos del gen **HLA** (antígeno leucocitario humano) **de clase II DRB1**, concretamente con DR4 y DR1. Dichos alelos contienen una secuencia común de aminoácidos similares a *glutamina-leucina-arginina-alanina-alanina* (QKRAA) a la que se ha denominado **epítipo compartido**. Dicha secuencia está localizada en el dominio implicado en la presentación de los antígenos al receptor de las células T (TCR).

En los últimos años ha incrementado notablemente la identificación de loci genéticos asociados a la patología, correspondiendo principalmente a alteraciones en moléculas que intervienen en la respuesta inmune, como es la molécula de señalización de la proteína tirosina fosfatasa N22 (PTPN22), o un locus que incluye a TRAF1 y al componente 5 del complemento (C5) (Perricone *et al.*, 2011).

Al mismo tiempo, estudios desarrollados en gemelos idénticos revelan una concordancia de entre un 12 y un 16%. Este dato evidencia que en el desarrollo de la enfermedad también existe una participación de los denominados **factores ambientales**. Se han realizado análisis epidemiológicos con el objetivo de identificar aquellos elementos del entorno y hábitos de vida que puedan asociarse a la etiología y progresión de la enfermedad (Karlson y Deane, 2012). Aunque se ha apuntado que diferentes formas de estrés bronquial podrían contribuir al desencadenamiento de la AR, el **hábito de fumar** se perfila como el principal factor de riesgo (Källberg *et al.*, 2011; Hart *et al.*, 2012). De hecho, se ha descrito una asociación entre el hábito de fumar y la presencia de anticuerpos ACPA en

pacientes con AR, especialmente en aquellos individuos que presentan el epítipo compartido (Too *et al.*, 2012). No obstante, otras investigaciones señalan que no existe tal asociación, sino que el hábito de fumar incrementa la susceptibilidad a padecer la enfermedad en individuos portadores del epítipo compartido HLA-DBR1, independientemente de la existencia de autoanticuerpos (Bang *et al.*, 2010). Por otra parte, la aparición de la AR también se ha relacionado con diferentes **agentes infecciosos** y con sus productos. Aunque no se dispone de evidencias concluyentes, se ha sugerido la posible participación de diversos patógenos en el inicio de la enfermedad, como son el **virus** Epstein-Barr, el citomegalovirus o las proteínas de choque térmico (Goldstein *et al.*, 2012; Pierer *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2010; Espinoza y García-Valladares, 2012). Otros factores ambientales de riesgo citados en la bibliografía son los niveles de vitamina D, un nivel socioeconómico bajo o la ingesta de alcohol y de café, sin que existan datos suficientes para confirmar sus efectos en el desarrollo y evolución de la enfermedad (Liao *et al.*, 2009).

1.3.2. Histofisiopatología

La AR es una patología caracterizada por la aparición de una sinovitis crónica, simétrica y erosiva que afecta a las articulaciones periféricas de forma aditiva y progresiva, provocando el deterioro de su estructura funcional. Este proceso inflamatorio crónico conlleva una serie de alteraciones en la membrana sinovial que terminan en la formación del denominado *pannus* (Bartok y Firestein, 2010). A nivel **histológico**, dichas alteraciones dan lugar a cambios en las estructuras que forman el tejido sinovial, observándose la aparición de un infiltrado inflamatorio en la capa subíntima, un aumento en el número de capas celulares que forman la íntima y una elevada angiogénesis (Rooney *et al.*, 1988).

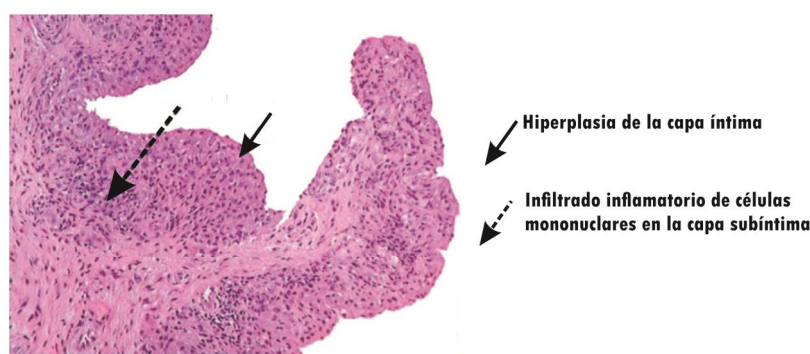


Figura 2. Apariencia histopatológica de la membrana sinovial en la AR. Micrografía obtenida de Firestein, 2003. Tinción hematoxilina-eosina de corte de tejido sinovial de paciente con diagnóstico de AR. Aumento: x200.

A continuación se analizarán más detalladamente estos tres rasgos histopatológicos que caracterizan a la membrana sinovial de una articulación afectada por la AR.

1.3.2.1. Infiltrado inflamatorio en la subíntima sinovial

Las células que se acumulan en la región subíntima son principalmente macrófagos y células T, aunque también aparecen, en menor número, células B, células plasmáticas, DCs y mastocitos. Por su parte, los **neutrófilos** son el tipo celular que predomina en el líquido sinovial.

Los **linfocitos T** representan entre el 30 y el 50% de las células del infiltrado sinovial. Aunque en su mayoría son células T de memoria CD4+ CD45RO+, también se detecta un número reducido de células T CD8+. Los **linfocitos B** constituyen el 5% de las células de la subíntima y su expansión clonal en la articulación sugiere la existencia de un proceso de maduración dirigida por antígeno. En la mayoría de los pacientes se detecta la producción local de autoanticuerpos como el FR, ACPA o dirigidos contra colágeno (Smeets *et al.*, 2003).

Las células del infiltrado inflamatorio se localizan generalmente en las zonas perivasculares o se distribuyen de forma difusa en la región de la subíntima, aunque también se ha observado que pueden encontrarse formando estructuras similares a la de los folículos linfoides. De hecho, aproximadamente en un 20-25% de las muestras de pacientes con AR que se analizan, se detectan agregados linfoides organizados alrededor de células dendríticas foliculares (Takemura *et al.*, 2001; Timmer *et al.*, 2007).

1.3.2.2. Hiperplasia de la íntima sinovial

En las articulaciones afectadas por la AR, la capa íntima de la sinovial sufre una expansión y deja de presentar un grosor de un par de células para alcanzar un espesor de entre 10 y 20 células. Aunque la hiperplasia de la íntima sinovial se ha correlacionado con la actividad de la enfermedad, describiéndose su disminución tras una terapia efectiva, cabe señalar que no representa una característica específica de la AR, ya que es similar a la observada en pacientes con OA en estadios avanzados (Athanasou *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 2001).

El importante **incremento en la celularidad** de esta capa es debido tanto a un aumento en el número de MLS como de FLS. Pese a que se desconocen los procesos exactos que originan la acumulación de ambos tipos celulares, algunos estudios indican que el aumento de los **MLS** puede deberse a la migración de nuevas células desde la médula ósea a través de la circulación (Schett y Firestein, 2010).

En cuanto a los **FLS**, no existe una hipótesis que integre todos los mecanismos que han sido involucrados en la expansión que experimentan en esta patología. En este sentido, se ha propuesto que sea el resultado del balance entre su tasa de proliferación y la resistencia que manifiestan a la apoptosis, al cual se uniría el reclutamiento de nuevos FLS desde otros orígenes. Estos procesos, a su vez, serían potenciados por el ambiente inflamatorio de la sinovial reumatoide (Mor *et al.*, 2005; Zvaifler, 2006).

Estudios *in vitro* demuestran que la **proliferación** de los FLS puede ser acelerada por diferentes estímulos, entre los que se incluyen **factores de crecimiento**, como el factor de crecimiento transformante (TGF- β) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); **citocinas**, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleucina IL-1 y **quimiocinas**, como CCL5/RANTES y CXCL12/SDF-1 (García-Vicuña *et al.*, 2004).

Por otra parte, dichas células presentan una **resistencia a la apoptosis** promovida por diferentes mecanismos. Entre éstos, se considera que tienen especial importancia las alteraciones que presenta el gen supresor de tumores **p53**. La proteína p53, también denominada *el guardián del genoma*, es inducida por daño celular y actúa paralizando el ciclo celular para dirigir a la célula hacia su apoptosis cuando el daño no puede ser reparado. En la capa íntima de la sinovial reumatoide se describe una expresión elevada de p53, posiblemente como consecuencia del aumento del estrés

oxidativo asociado a la inflamación (Salvador *et al.*, 2005; Tak *et al.*, 2000). Sin embargo, también se han detectado mutaciones somáticas en el gen de dicha proteína en los sinoviocitos de AR, principalmente en los de la capa íntima (Yamanishi *et al.*, 2005). Parece pues, que estas alteraciones conllevan una pérdida de su funcionalidad, permitiendo que las células con alteraciones en el DNA sigan dividiéndose en lugar de producirse su apoptosis.

Otros estudios han evaluado la expresión relativa de la familia de **proteínas Bcl-2** en la AR, ya que el balance de estas moléculas pro y anti-apoptóticas determina la susceptibilidad de las células para iniciar su apoptosis. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha detectado una mayor expresión de las moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1 en la sinovial de AR comparada con la de OA. Aunque en algunos casos se observa que la expresión de Bcl-2 se restringe a los agregados linfoides, donde podría estar protegiendo de la apoptosis a las células B y T sinoviales en lugar de a los sinoviocitos de la capa íntima (Dubikov y Kalinichenko, 2010; Liu *et al.*, 2005).

También se ha demostrado que el factor nuclear- B (**NF- B**), cuya activación es elevada en las células de la íntima en AR, constituye una fuerte señal de supervivencia celular, lo cual representa una conexión entre el proceso inflamatorio y la resistencia a la apoptosis (Simmonds y Foxwell, 2008). Además, en los FLS de esta capa se han detectado niveles muy bajos de expresión del gen supresor de tumores **PTEN** (gen homólogo de la fosfatasa y tensina), cuya ausencia relativa supone, en última instancia, un aumento de la activación de NF- B (Pap *et al.*, 2000).

Otro mecanismo de protección de los sinoviocitos frente a la apoptosis sería el mediado por la acción de la **sentrina-1**, capaz de inducir una modificación post-translacional en moléculas de señalización implicadas en la muerte celular programada. De hecho, se ha observado que la expresión de la sentrina-1 se encuentra elevada en la capa íntima de la sinovial reumatoide, especialmente en los lugares de invasión del cartílago (Franz *et al.*, 2000).

Sin embargo, el aumento en la proliferación y supervivencia de los FLS de la íntima no son suficientes para justificar el grado de hiperplasia observado en esta estructura. Así, se ha sugerido que exista un **reclutamiento adicional** de fibroblastos que provendrían de la región subíntima, de células mesenquimales circulantes o de precursores que migrarían desde la médula ósea a través de poros del hueso cortical (Zvaifler, 2006; Marinova-Mutafchieva *et al.*, 2002; Schett y Firestein, 2010). En este sentido, se sugiere que quimiocinas como CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1, CCL5 y CXCL1/GRO puedan intervenir facilitando dicho reclutamiento, ya que la migración de los FLS es estimulada *in vitro* por estas moléculas y se ha detectado su expresión en los tejidos sinoviales de AR (García-Vicuña *et al.*, 2004).

1.3.2.3. Angiogénesis

Al igual que en diversas formas de artritis crónica, en la AR se ha descrito un aumento anormal de la densidad vascular en el tejido sinovial de las articulaciones afectadas. En ellas, se detecta un incremento de biomarcadores de angiogénesis y de factores pro-angiogénicos que indican la existencia de una gran actividad de **neovascularización**, especialmente elevada en las fases iniciales.

En los procesos de angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos tiene lugar a partir de los ya existentes. Comienza con la estimulación de las células endoteliales de los capilares por **factores pro-angiogénicos**, como son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el FGF.

Dichas células consiguen migrar hasta el estroma perivascular, donde interactúan con las integrinas de la matriz y se diferencian hasta estabilizarse, reclutando pericitos y células del músculo liso (Szekanecz *et al.*, 2010).

Los FLS de la sinovial reumatoide, estimulados por las moléculas presentes en el ambiente articular, producen múltiples mediadores pro-angiogénicos implicados en el reclutamiento, proliferación y activación de las células endoteliales como son VEGF, CXCL8/IL-8 y CXCL12 (Szekanecz *et al.*, 2009). Por otra parte, la hiperplasia que experimenta dicha estructura implica la aparición de tejido de nueva formación, el cual requiere de una neovascularización para conseguir el mantenimiento de un nivel de oxígeno adecuado (Konisti *et al.*, 2012; Neumann *et al.*, 2010). Por tanto, las condiciones del ambiente sinovial reumatoide parecen propiciar una alteración en el equilibrio fisiológico entre los factores activadores e inhibidores de la angiogénesis, este hecho conlleva un incremento anormal del número de capilares con endotelio activado en la membrana sinovial (Müller-Ladner *et al.*, 2007).

Los vasos de nueva formación podrían facilitar el mantenimiento del proceso inflamatorio crónico sinovial, mediante el transporte de células inflamatorias o cubriendo las necesidades de nutrientes y oxígeno del *pannus*. Sin embargo, a pesar de la angiogénesis y del aumento de vascularización, al igual que ocurre en los tumores, en la sinovial reumatoide se mantiene un **ambiente hipóxico** severo, lo que sugiere un funcionamiento anómalo de dichos vasos de nueva formación (Szekanecz *et al.*, 2010; Konisti *et al.*, 2012).

1.3.3. Componentes celulares implicados

El avance en la investigación de los mecanismos patogénicos implicados en el desarrollo de la AR, ha revelado que existe una participación activa tanto del **sistema inmune** (innato y adaptativo) como de las **células residentes** en la membrana sinovial y en los tejidos contiguos afectados por el ambiente inflamatorio (hueso y cartílago). Las interacciones que se establecen entre los elementos inmunes e inflamatorios y los componentes celulares de la articulación, se presentan como un factor clave en la destrucción articular (Komatsu y Takayanagi, 2012).

En los siguientes apartados se abordarán los datos más significativos relativos a la participación de las células del sistema inmune y de las células de los tejidos articulares en los procesos patológicos con los que la AR se manifiesta. Finalmente, se analizará la compleja red de interacciones que se establece entre los elementos celulares que intervienen en la progresión de la enfermedad a nivel articular.

1.3.3.1. Células del sistema inmune

Existen diversas hipótesis acerca de la implicación del sistema inmune en la patogénesis de la AR. Sin embargo, la mayoría de las teorías propuestas no son excluyentes y los mecanismos planteados podrían combinarse, presentando una relevancia relativa a la fase de la enfermedad que se considere.

En la actualidad, parece claro que la evolución de la AR no depende únicamente de una **respuesta adaptativa autoinmune**, como había sido clásicamente asumido, sino que también está marcada por una alteración en la **respuesta inmune innata**. De modo que ambos tipos de inmunidad parecen contribuir al establecimiento y perpetuación de los procesos inflamatorios que promueven la

activación del comportamiento patogénico de las células sinoviales mediadoras de la destrucción articular. De hecho, en el desarrollo de la AR se describe la participación de células del sistema inmune innato como son macrófagos, DCs, neutrófilos y mastocitos, así como de las células B y T, pertenecientes a la inmunidad adaptativa (Boissier *et al.*, 2012).

En este contexto, las **citocinas** constituyen un elemento clave en la mediación de gran parte de los procesos inmunes asociados a la patología, tanto a nivel sistémico como en las articulaciones afectadas, donde su expresión y actividad se encuentran elevadas. Dichas moléculas permiten que la actividad del sistema inmune se integre con la de los procesos de inflamación y destrucción tisular (Brennan *et al.*, 2008). Así, el perfil de citocinas presentes en el ambiente articular reumatoide puede interpretarse como un indicador de los procesos patogénicos activos y de los elementos celulares potencialmente implicados. Se considera que **TNF** , **IL-6** e **IL-1** son tres citocinas clave en el proceso inflamatorio de la AR y, de hecho, existen terapias de uso actual dirigidas contra dichas citocinas, analizadas con más detalle posteriormente (McInnes y Schett, 2011).

1.3.3.1.1. Sistema inmune innato

La participación de elementos del sistema inmune innato en la AR queda patente al analizar el tejido sinovial de las articulaciones afectadas, detectándose un notable reclutamiento y activación de macrófagos, neutrófilos y mastocitos. También se ha descrito la presencia de **inmunocomplejos** en la superficie del cartílago articular y la intervención de diferentes receptores de patrones moleculares (**PRRs**, *pattern recognition receptors*) en lo que han sido considerados mecanismos potencialmente patogénicos, detallados posteriormente (Gierut *et al.*, 2010; Theofilopoulos *et al.*, 2010). Cabe señalar que incluso existen modelos animales que relacionan el inicio de la enfermedad con la activación del sistema inmune innato. Así, se ha observado que la artritis puede inducirse experimentalmente tras una estimulación de los macrófagos por DNA endógeno cuya eliminación no se habría realizado correctamente, o tras una inyección de componentes de la pared celular de estreptococos en la articulación (Kawane *et al.*, 2006; Sakaguchi y Sakaguchi, 2005).

Entre las células del sistema inmune innato implicadas en la AR destacan los **macrófagos**, considerados como los principales productores de las citocinas proinflamatorias TNF e IL-1 (Kennedy *et al.*, 2011). Su localización en la capa íntima de la membrana sinovial, junto a los FLS, permite el establecimiento de interacciones entre ambos tipos celulares que constituyen un sistema de activación recíproco y, debido a su relevancia en la patología, serán analizadas con mayor profundidad en apartados posteriores.

1.3.3.1.2. Sistema inmune adaptativo

La **inmunidad adaptativa** juega un papel crucial en el desarrollo de la AR, un proceso en el que los linfocitos T y B están claramente implicados.

Clásicamente se había sugerido que las **células B** ocupaban un lugar central en la progresión de la AR, por haber sido ésta una dolencia asociada a la presencia de autoanticuerpos, como son el FR y los ACPA. De hecho, fue la primera enfermedad considerada autoinmune al describirse que podría estar mediada por anticuerpos autoreactivos. En 1939, Waaler identificó por primera vez el **factor reumatoide** en la sangre de pacientes afectados por AR. Más tarde, en 1948, dicho factor fue redescubierto por Rose para que, finalmente, fuese Kunkel quien lo caracterizara como un anticuerpo

que se une a la porción Fc de las IgG. Sin embargo, aunque se ha comprobado que los autoanticuerpos son claramente responsables del desarrollo de la artritis en ciertos modelos animales, no se ha demostrado un efecto patógeno directo del FR y tampoco de los anticuerpos ACPA en humanos (Firestein, 2003). Así, en base a estos últimos datos, ha sido replanteado el papel patógeno directo que se había atribuido a las células B basado en su implicación en la producción de **autoanticuerpos**.

No obstante, la importancia de la intervención de las células B en la AR queda evidenciada por la eficacia terapéutica, en determinados pacientes, del agente biológico **Rituximab**. El Rituximab es un anticuerpo monoclonal quimérico dirigido frente a la molécula CD20 que las células B expresan durante su proceso de maduración celular (Leandro *et al.*, 2011). En este sentido, cabe señalar que las células B de la membrana sinovial, además de producir autoanticuerpos, son capaces de secretar citocinas y quimiocinas que intervienen en la activación de las DCs foliculares y contribuyen a la regulación de las interacciones entre células T y macrófagos y entre células T y células B. Además, también actúan como células presentadoras de antígeno, proporcionando señales coestimuladoras para la expansión y activación de las células T CD4+ (Nakken *et al.*, 2011). Por tanto, la amplitud de funciones que estas células son capaces de desarrollar, dificulta la identificación de los mecanismos concretos que justificarían el beneficio terapéutico de su depleción, ya que podrían ser diferentes los procesos patógenos en los que se encuentren implicadas.

En cuanto a la participación de las **células T** en el desarrollo de la AR, son múltiples las evidencias que han contribuido a atribuirles un papel destacado en la patología. De hecho, los estudios genéticos señalan que la enfermedad se encuentra asociada principalmente a la alteración de genes relacionados con mecanismos de presentación antigénica y activación de los linfocitos T. Además, su importancia en la AR humana queda reflejada por el éxito terapéutico que presenta, en determinados pacientes, el agente biológico **Abatacept**, una proteína de fusión CTLA4-IgG-Fc, que bloquea específicamente la coestimulación de células T. Por otra parte, la mayoría de los modelos animales de artritis son dependientes de células T, como es el caso de la artritis inducida por colágeno (**CIA**, *collagen induced arthritis*) o artritis inducida por antígeno (**AIA**, *antigen induced arthritis*) (Herrero-Beaumont *et al.*, 2012; Bax *et al.*, 2011).

Sin embargo, concretar el grado de implicación de las células T en la patogenia de la AR sigue siendo complejo, ya que podrían estar participando en procesos de la respuesta inmune adaptativa tanto a nivel sistémico, como localmente en las articulaciones que sufren la sinovitis y la degradación de sus tejidos.

A nivel articular, cabe destacar que el **infiltrado inflamatorio**, que característicamente aparece en la región subíntima, presenta un alto contenido en **células T CD4+ activadas**, representando éstas del 30 al 50 % del total (Cope *et al.*, 2007). Así, se ha propuesto que dichas células ejerzan una función patógena relacionada con su capacidad para interactuar con las células B, promover la producción de anticuerpos y activar localmente a células residentes como son MLS, FLS, osteoclastos y células endoteliales, siendo estas acciones dependientes de citocinas T y de proteínas de membrana.

Las células T CD4+ naïve, tras la activación, se diferencian en distintas subpoblaciones de células **T helper** (Th) (T colaboradoras) que se especializan en la liberación de diferentes tipos de

citocinas y se caracterizan por la expresión de factores de transcripción específicos. (Zhou *et al.*, 2009).

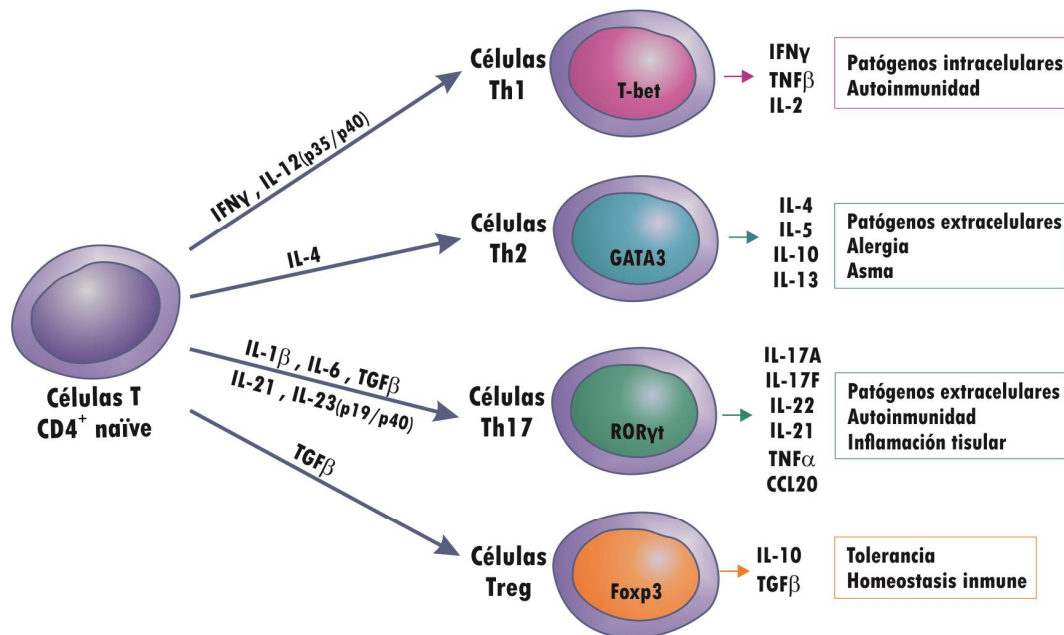


Figura 3. Subpoblaciones de células T helper. Citocinas y factores de transcripción implicados en la diferenciación de las subpoblaciones Th1, Th2, Th17 y Treg. Citocinas características y funciones en las que están involucradas.

Hasta hace unos años se asumía que, tras la estimulación antigénica, aparecían mayoritariamente dos tipos de subpoblaciones de células Th, denominadas Th1 y Th2. Durante el proceso de diferenciación, la presencia de **IL-12** en el microambiente favorece la generación del **fenotipo Th1**, caracterizado por la producción de interferón- (**IFN**), IL-2 y TNF . Mientras que cuando es **IL-4** la citocina que está presente en el entorno, las células se dirigen hacia un **fenotipo Th2**, especializado en la liberación de **IL-4** y también en la de IL-5, IL-10 e IL-13. Sin embargo, la investigación en este campo ha permitido que se hayan descrito nuevas subpoblaciones celulares.

En 2005 se identificó a las **células Th17** como una subpoblación de células Th que se caracteriza por producir las citocinas **IL-17A**, **IL-17F**, **IL-22**, **IL-21**, **TNF** y la quimiocina **CCL20/MIP-3** , así como por presentar el receptor de quimiocinas CCR6 en superficie. La diferenciación de este linaje celular incluye una serie de etapas de inducción, amplificación y estabilización, en las que se precisa la presencia del factor de crecimiento transformante (TGF-) y de las interleucinas IL-6, IL-1 , IL-21 e IL-23. Asimismo, los factores de transcripción STAT3, ROR t y ROR también intervienen en la generación de las Th17, ya que son responsables de regular la transcripción de diferentes genes específicos de dicho fenotipo. Además, en el caso humano, es necesaria la activación de NF- B por la IL-1 para potenciar la diferenciación hacia el fenotipo Th17 (Miossec *et al.*, 2012).

La identificación de las Th17 como la fuente principal de IL-17, descrita diez años antes como una citocina producida por células T implicada en procesos de inflamación crónica, ha sido de gran repercusión en el estudio de las enfermedades autoinmunes. Numerosos proyectos de investigación han tratado de esclarecer la relevancia de la participación del componente Th17/IL-17 en el desarrollo

de este tipo de patologías. Por otra parte, también ha suscitado gran interés el estudio de las denominadas **células T reguladoras** (Treg). Las células Treg, cuya diferenciación a partir de las células T CD4+ naïve es favorecida en presencia de TGF- β , se caracterizan por controlar la respuesta de las células T efectoras, siendo consideradas esenciales en el mantenimiento de la tolerancia periférica (Wing y Sakaguchi, 2010).

Por tanto, aunque tradicionalmente se había definido a la AR como una enfermedad dirigida por una respuesta Th1, los progresos en la investigación de las células Th exigen la revisión de dicho paradigma. Además, el análisis de los mediadores presentes en el espacio articular reumatoide ha demostrado que la expresión de citocinas Th1 y Th2, como son IFN γ , IL-2 e IL-4, es menor que la de otras citocinas proinflamatorias, entre las que se incluye IL-17. En este sentido, la **IL-17** ha emergido como una molécula clave en el desarrollo de la AR, debido a su capacidad en la inducción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y otros mediadores de destrucción del cartílago y del hueso en FLS, monocitos/macrófagos y condrocitos (Shahrara *et al.*, 2008).

La IL-17, también conocida como IL-17A, da nombre a la familia de interleucinas IL-17, compuesta por 6 miembros: IL-17 (IL-17A), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. Dichas moléculas están formadas por dos monómeros unidos por puentes disulfuro intramoleculares. Entre ellas, destacan IL-17A e IL-17F por estar implicadas en diferentes enfermedades inflamatorias y ser las isoformas que principalmente secretan las células Th17. IL-17A e IL-17F presentan una homología del 50% en su secuencia de aminoácidos y pueden formar homodímeros o combinarse para formar heterodímeros IL-17A/IL-17F. Las citocinas de la familia de la IL-17 son reconocidas por proteínas transmembrana de tipo I que constituyen, a su vez, una familia de receptores que incluye: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. Aunque el IL-17RA (IL-17R) fue el primer y único receptor conocido de la IL-17 hasta hace unos años, se ha comprobado que el resto son necesarios para la formación de complejos que, sin conocerse el modo concreto en el que interaccionan, permiten la señalización funcional de las diferentes isoformas de dicha citocina. Así, IL-17A e IL-17F requieren de la presencia de **IL-17RA** para desencadenar una respuesta intracelular en la que también se ha implicado a **IL-17RC**. A diferencia de IL-17RA, que se expresa prácticamente en todos los tipos celulares, IL-17RC presenta una expresión más restringida, siendo muy reducida en células mieloides. De modo que las células endoteliales, epiteliales y los fibroblastos, representan las principales dianas sobre las IL-17A e IL-17F ejercen sus efectos (Hot y Miossec, 2011; Miossec y Kolls, 2012; Ge y You, 2008).

Concretamente, en pacientes con AR se ha descrito una elevada expresión de los receptores IL-17RA e IL-17RC en células sanguíneas y en los sinoviocitos de las articulaciones afectadas (Zrioual *et al.*, 2008). Por otra parte, diferentes estudios han descrito que IL-17 estimula la producción de TNF α e IL-1 β por los MLS y FLS de AR y, que en la membrana sinovial, provoca una elevación de los valores de IL-6 (Jovanovic *et al.*, 1998; Katz *et al.*, 2001). Además, esta interleucina contribuye de manera directa o indirecta, mediante la inducción de CXCL8 y CCL2 en los FLS, al reclutamiento en la articulación de células inflamatorias, como son neutrófilos y macrófagos (Shahrara *et al.*, 2010). También es capaz, junto con TNF α e IL-1 β , de estimular la síntesis de metaloproteinasas de matriz (MMPs) por los condrocitos y los FLS, potenciando así la degradación del cartílago articular (Moran *et al.*, 2009; Hot y Miossec, 2011). Por otra parte, la IL-17 promueve la osteoclastogénesis mediante la

inducción de la síntesis del ligando del receptor activador de NF- κ B (RANKL) por los FLS y los osteoblastos de pacientes con AR (Okamoto y Takayanagi, 2011a).

Parece claro, por tanto, que la IL-17 es un mediador de daño articular en la progresión de la AR y que las **células Th17** podrían estar cumpliendo un **papel patogénico**. De hecho, en los últimos años es elevado el número de estudios que proponen su participación en los procesos degenerativos que sufren las estructuras articulares en la AR (Sarkar y Fox, 2010; Hemdan *et al.*, 2010). En este sentido, en el modelo murino de CIA, se ha demostrado que la depleción de las células Th17 conlleva una reducción de la inflamación crónica en las articulaciones periféricas afectadas (Koenders *et al.*, 2011). Sin embargo, aunque en modelos animales está bien establecida la patogéneidad de las Th17, las limitaciones que implica la investigación en humanos y la novedad relativa de su caracterización, han contribuido a que determinar el papel que cumplen estas células en la AR se convierta en un tema de debate científico en constante revisión.

Recientemente, en niños afectados por artritis juvenil idiopática, se ha observado que células T recuperadas del líquido sinovial de una articulación inflamada, no sólo sintetizaban IFN γ , sino que también presentaban receptores de quimiocinas propios de un **fenotipo intermedio** entre células Th1 y Th17 (Nistala *et al.*, 2010). Estos resultados conectan con los que, años antes, habían sido obtenidos por otros grupos en experimentos *in vitro*. En ellos se describía que células Th17, en respuesta a IL-12 o a IL-23 en ausencia de TGF β , pueden aumentar la producción de IFN γ y detener la de IL-17, desarrollando un fenotipo Th17/Th1 (IL-17+ IFN γ +) o un fenotipo Th1 (Annunziato *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2009).

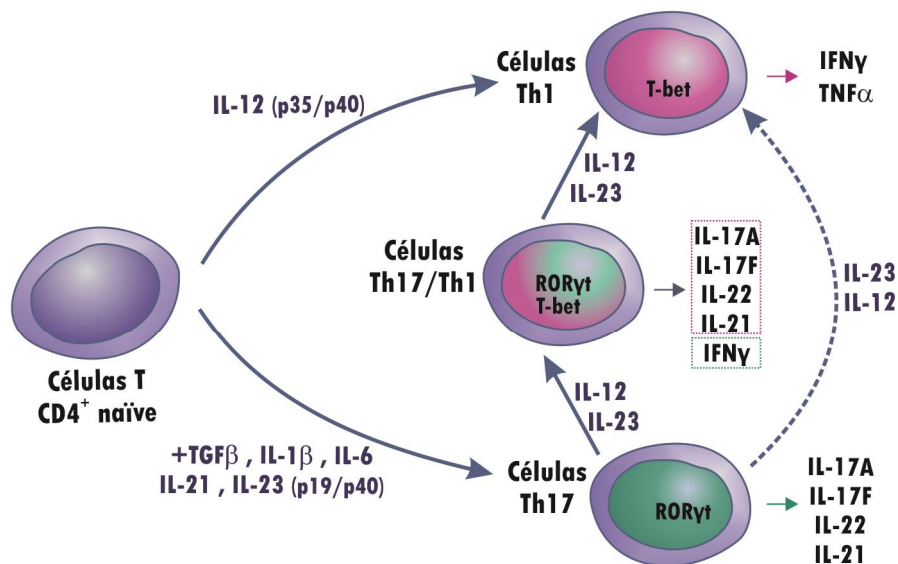


Figura 4. Plasticidad de las subpoblaciones de células Th17/Th1.

Citocinas y factores de transcripción implicados.

De modo que el fenotipo Th17 manifiesta cierta inestabilidad y una **plasticidad** fenotípica que, en las articulaciones afectadas por la AR, podría estar condicionada por el grado de inflamación del tejido sinovial (Peck y Mellins, 2010; Nistala *et al.*, 2010). De hecho, una de las hipótesis más aceptadas es que el microambiente inflamatorio articular reumatoide resulta determinante en la generación y activación de las células Th17 patogénicas (Dong y Zhu, 2012). Así, el conjunto de

citocinas y mediadores proinflamatorios liberados principalmente por MLS, aunque también por FLS activados y DCs, constituiría un nicho funcional para la determinación del fenotipo de las células Th efectoras.

En este contexto, es interesante remarcar que en dicho microambiente sinovial se ha detectado la presencia de **IL-12** e **IL-23**, siendo la primera considerada como la principal citocina en la inducción del fenotipo Th1 y la segunda como uno de los factores necesarios en el proceso de diferenciación y estabilización de las Th17. Ambas interleucinas pertenecen a la misma familia de citocinas, la familia de la IL-6/IL-12. Son heterodiméricas y comparten una subunidad común denominada IL-12p40. En el caso de la IL-12, dicha subunidad dimeriza con la **IL-12p35**, mientras que en la IL-23, se une a la subunidad **IL-23p19** (Pope y Shaharara, 2012; Vignali y Kuchroo, 2012).

El estudio de IL-12 e IL-23 en la AR, de manera análoga al del papel que cumplen las diferentes subpoblaciones de células Th, ha sido sometido a constante revisión y sigue presentando un gran número de interrogantes. En un principio, la IL-12 fue identificada como una citocina proinflamatoria clave en el desarrollo de lo que se consideraban enfermedades autoinmunes mediadas por una respuesta Th1, entre las que se incluía a la AR (Kim *et al.*, 2000). Sin embargo, el descubrimiento de las Th17 y de la IL-23 como una citocina capaz de intervenir no sólo en la diferenciación de las subpoblaciones de Th, sino también de ejercer una actividad proinflamatoria sobre las células sinoviales, han cuestionado estas primeras ideas. De hecho, el estudio del modelo murino de CIA en ratones knockout para IL-12p35 y para IL-23p19, ha demostrado que la ausencia de p35 conlleva un agravamiento de la enfermedad mientras que la de p19 protege de su desarrollo (Murphy *et al.*, 2003). Sin embargo, sigue siendo controvertido definir el papel de la IL-12 en la AR humana, ya que se detectan niveles elevados de dicha interleucina tanto en suero de pacientes como en líquido sinovial y se observa que presentan una correlación positiva con la actividad de la enfermedad (Bettelli *et al.*, 2006). En este sentido, el hecho de que IL-12 e IL-23 compartan la subunidad IL-12p40 también contribuye a dificultar la identificación de su papel relativo en la enfermedad, ya que los resultados obtenidos en ensayos en los que no se haya discriminado entre subunidades específicas, podrían atribuirse a ambas citocinas.

Así, por una parte es evidente que los linfocitos T se encuentran implicados en la AR, aunque sigue sin dilucidarse cuál es el fenotipo de mayor relevancia (Th1/Th17) en el desarrollo y mantenimiento de las condiciones patogénicas que aparecen en las articulaciones afectadas. Por otra parte, dicho microambiente ha sido propuesto como un factor clave en la polarización de las subpoblaciones de células Th, sin que se haya determinado la implicación concreta de los diferentes mediadores que potencialmente están presentes.

1.3.3.2. Células residentes

La principal función de los sinoviocitos, osteoclastos, osteoblastos y condrocitos que forman los tejidos de la articulación es la de mantener la matriz extracelular, permitiendo la conservación de la **homeostasis** articular. Sin embargo, en la AR, las células residentes en el ambiente sinovial inflamado manifiestan una **alteración de sus funciones**, convirtiéndose no sólo en mediadores de la destrucción del cartílago y el hueso articular, sino que a través de la síntesis de múltiples factores, también contribuyen a las **respuestas inmune e inflamatoria** del entorno articular. De hecho, se ha propuesto que la activación local de las células sinoviales pueda constituir un paso crucial en las

primeras fases del desarrollo de la enfermedad (Sweeney y Firestein, 2004; Mor *et al.*, 2005; Noss y Brenner, 2008).

Como se ha señalado en apartados anteriores, el tejido sinovial de las articulaciones afectadas por la AR se transforma en el denominado **pannus**, un tejido hiperplásico formado principalmente por **FLS** y **MLS** que crece de manera expansiva y conlleva la destrucción de las estructuras de la articulación. Concretamente, se ha identificado a los FLS como los efectores primarios de la degradación del cartílago articular, debido su crecimiento invasivo y a la producción de enzimas de destrucción de la matriz extracelular. Por otra parte, los **osteoclastos**, presentes en la interfase entre la sinovial reumatoide y el hueso articular, son los elementos celulares responsables de la erosión del hueso (Bartok y Firestein, 2010).

1.4. Sinoviocitos fibroblásticos en la AR

Los FLS de las articulaciones afectadas por la AR presentan un fenotipo estable y específico de la enfermedad, que les confiere la capacidad de intervenir en los procesos patológicos articulares. Participan en ellos de forma directa, invadiendo y destruyendo el cartílago, o mediante interacciones con las células adyacentes y la producción de una amplia variedad de citocinas, quimiocinas y enzimas de degradación de la matriz. Dichos mediadores perpetúan la inflamación crónica y resultan determinantes en la activación del comportamiento patogénico de los propios FLS y del de otras células implicadas (Noss y Brenner, 2008; Ospelt y Gay, 2008).

A continuación, se realizará una descripción de las principales características del fenotipo de los FLS en la AR y de los posibles elementos implicados en la activación de su comportamiento anómalo. También se revisará la capacidad patogénica de dicho tipo celular a partir del análisis de su participación en la destrucción del cartílago y el hueso articular. Por último, se describirán las consecuencias funcionales de las interacciones que tienen lugar entre los FLS y los macrófagos adyacentes, así como de las que los FLS establecen con células T y B del infiltrado inflamatorio.

1.4.1. Características fenotípicas y funcionales

Los FLS de pacientes con AR muestran unos rasgos morfológicos y funcionales particulares que son semejantes a los propios de células **tumorales**. Son capaces de expandirse e invadir el cartílago articular y, al igual que las células transformadas, pueden crecer sin adherirse y escapar a la inhibición por contacto. Además, en ellos se detectan alteraciones en la regulación y funcionamiento de proto-oncogenes, de genes supresores de tumores y de moléculas anti-apoptóticas que se han relacionado con su expansión en la capa íntima sinovial y la consiguiente hiperplasia de la misma (Juarez *et al.*, 2012).

Ya en la década de los 80, Fassbender introdujo la idea de que el fenotipo de los FLS de AR era semejante al tumoral. Señaló que su **morfología** se encontraba **alterada**, al presentar un retículo endoplásmico rugoso muy denso, un núcleo pálido de gran tamaño y un citoplasma mayor que el de otros fibroblastos. A partir de la observación de estas propiedades, que indicaban la existencia de una elevada tasa de síntesis, sugirió que los FLS en la AR podrían ser capaces de invadir el cartílago articular, incluso en ausencia de la colaboración de otros tipos celulares (Fassbender y Simmling-Annefeld, 1983).

Años más tarde, en 1996, Müller-Ladner y Gay demostraron que el **crecimiento agresivo** que presentan los FLS de AR constituye una capacidad intrínseca de dicho tipo celular. En su estudio, se aislaron FLS de pacientes con AR y se coimplantaron con cartílago humano de individuos sanos bajo la cápsula renal de ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID). A diferencia de los FLS de individuos sanos o con OA, los aislados de pacientes con AR se anclaron a la superficie del cartílago articular, provocando su destrucción mediante la síntesis de proteasas y la inducción de enzimas de degradación de la matriz extracelular en los condrocitos adyacentes. También observaron que el fenotipo invasor de los FLS en la AR se muestra estable y específico de la patología, sin ser una respuesta transitoria al ambiente articular reumatoide y sin depender de la participación de células del sistema inmune (Müller-Ladner *et al.*, 1996).

Como se ha señalado anteriormente, los FLS, además de estar directamente involucrados en el proceso destructivo del cartílago en la AR, cumplen un papel central en el **proceso inflamatorio** que se cronifica en las articulaciones afectadas. Estas ideas han sido corroboradas por los datos obtenidos en ratones knockout de **cadherina-11**, una glucoproteína de membrana que expresan los FLS de la íntima sinovial que media las adhesiones homotípicas célula-célula. Aunque los ratones knockout consiguen completar con normalidad su desarrollo en ausencia de la cadherina-11, éstos presentan una membrana sinovial con menor número de células y una reducción de la matriz extracelular. Tras inducir la artritis inflamatoria en este tipo de ratones mutantes, no se observaron daños en el cartílago y la inflamación quedó reducida aproximadamente a un 50% (Lee *et al.*, 2007). Es más, el grupo de Brenner ha demostrado recientemente que cadherina-11 induce en los FLS la producción de mediadores inflamatorios, entre los que figura la IL-6 (Chang *et al.*, 2011). De modo que estos datos, unidos a los anteriormente presentados, indican que los FLS intervienen en diferentes procesos que dirigen el curso de la AR, esto es, en la hiperplasia y angiogénesis sinovial, en la destrucción del cartílago y el hueso articular y en la cronificación de la inflamación sinovial.

Por otra parte, se ha sugerido que el hecho de que las alteraciones morfológicas y funcionales que caracterizan a los FLS de AR persistan *ex vivo* en ausencia de estímulos exógenos, podría estar relacionado con las **mutaciones** en genes reguladores del ciclo celular, proliferación y apoptosis, o con las diferentes **modificaciones epigenéticas** que se han detectado en estas células (Lefèvre *et al.*, 2009).

En los últimos años se ha desarrollado un amplio programa de investigación sobre la epigenética en las enfermedades reumáticas. La **epigenética** incluye todos aquellos cambios en la función del genoma que, siendo heredables, no alteran la secuencia de nucleótidos del DNA. La mayoría de las modificaciones epigenéticas son procesos reversibles catalizados por enzimas específicas y cofactores que permiten cambiar los patrones de expresión en respuesta a diferentes estímulos (Ballestar, 2011).

Se ha descrito que los FLS de AR presentan una **hiperacetilación** de su genoma, debida a una actividad reducida de las enzimas de desacetilación de las histonas (HDAC), que podría contribuir a la activación de factores de transcripción proinflamatorios. También manifiestan una **reducción de la metilación** global del DNA, siendo ésta una modificación asociada al aumento de la expresión de genes importantes en el desarrollo de la AR, como son factores de crecimiento, moléculas de adhesión y MMPs. De hecho, los FLS en proliferación presentan un menor nivel de metiltransferasa-1

de DNA (Dnmt1) que los no proliferativos, y es posible obtener un fenotipo activado similar al de los FLS de AR a partir de células sinoviales normales si se tratan con el agente desmetilante 5-azaC. También en este tipo de FLS se ha detectado una expresión específica de **microRNAs**, como miR-146a y miR-155, estando algunos de ellos relacionados con procesos de desmetilación del DNA (Karouzakis *et al.*, 2011; Neumann *et al.*, 2010).

En relación a las **mutaciones** somáticas citadas, cabe tener presente que aparecen como resultado de un entorno genotóxico y, por tanto, no pueden considerarse como causa del desarrollo de la AR. Sin embargo, su aparición en el DNA de los FLS puede suponer el aumento de su potencial invasivo, de la resistencia a los procesos de apoptosis o de la expresión de enzimas de degradación de la matriz y de mediadores proinflamatorios (Bartok y Firestein, 2010).

1.4.2. Factores y mecanismos de activación

Aunque siguen sin conocerse los factores concretos que determinan la activación del fenotipo patogénico de los FLS en la AR, parece que es el resultado de las circunstancias particulares que presentan en la sinovial reumatoide, donde están expuestos constantemente a estímulos proinflamatorios y a condiciones de hipoxia (Bartok y Firestein, 2010).

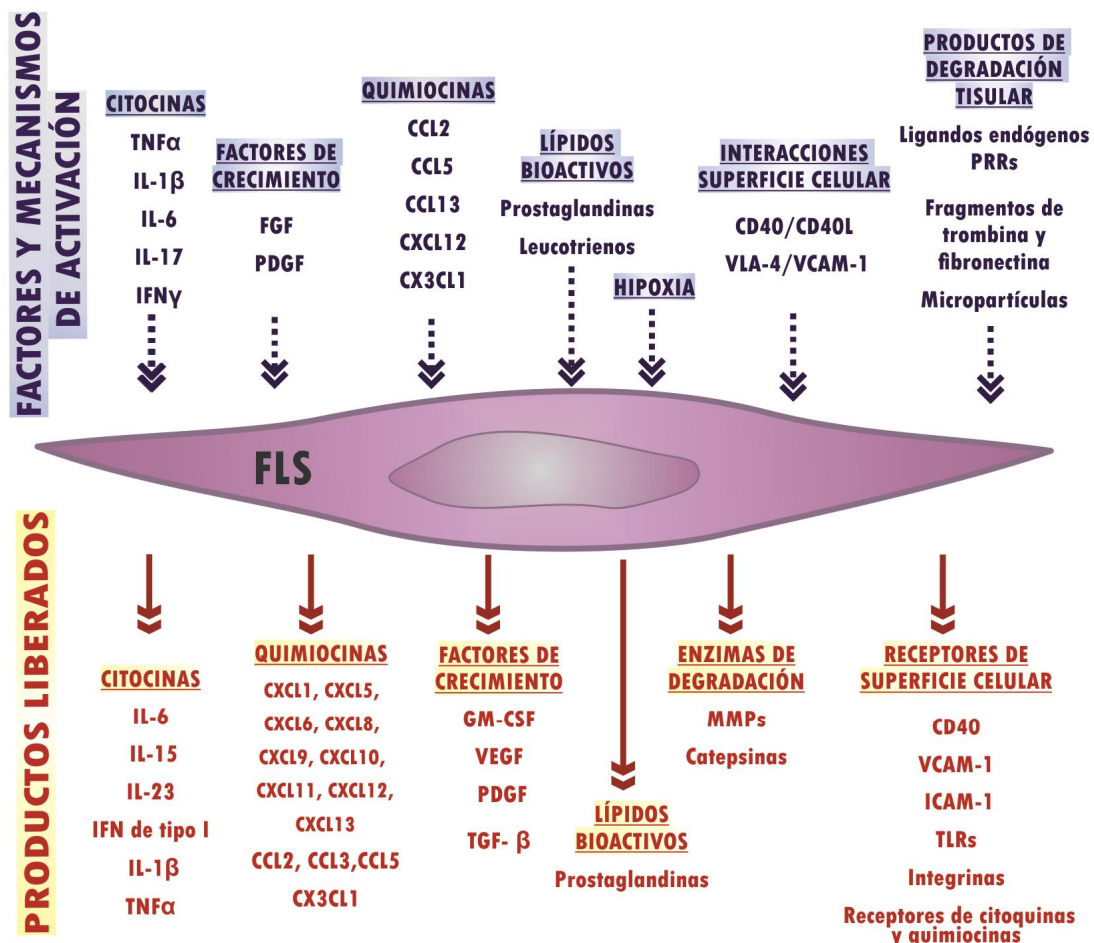


Figura 5. Esquema de la activación de los FLS. Factores y mecanismos de estimulación del FLS. Productos expresados y/o liberados tras su activación.

Entre los elementos capaces de estimular el comportamiento destructivo de los FLS identificados hasta el momento, se incluyen: moléculas proinflamatorias, interacciones directas con las superficies de otras células, ligandos de los PRRs, diferentes productos de la destrucción de los tejidos articulares y determinadas condiciones del ambiente sinovial (Neumann *et al.*, 2010).

A continuación se recapitularán los factores y mecanismos de estimulación de los FLS descritos en esta enfermedad reumática.

1.4.2.1. Mediadores inflamatorios

Las citocinas y quimiocinas, los factores de crecimiento y los lípidos bioactivos han sido identificados como moléculas proinflamatorias capaces de activar a los FLS de la sinovial reumatoide, pudiendo ser de tipo soluble o estar asociadas a la membrana celular o a la matriz extracelular. Dichos mediadores son sintetizados por las células del infiltrado inflamatorio de la capa subíntima sinovial o por los propios FLS.

Las **citocinas** que estimulan y potencian las propiedades destructivas de los FLS son fundamentalmente: TNF y IL-1 de origen macrofágico; IL-17 e IFN liberadas por las células T; IL-6 y TGF- producidas por los propios FLS (McInnes y Schett, 2007). Además, los FLS expresan CCR2, CCR5, CXCR4 y CX3CR1, receptores de **quimiocinas** que son liberadas por diversas células del tejido sinovial en AR y cuya unión, en experimentos *in vitro* desencadena un incremento de la migración de los fibroblastos y de su respuesta a la estimulación por citocinas (Szekanecz *et al.*, 2011).

Asimismo, los **factores de crecimiento** producidos por las células de la articulación o liberados durante la degradación de la matriz juegan un importante papel en la activación de los FLS. El FGF constituye un potente estímulo extracelular para estas células, induciendo en ellas un aumento de la proliferación y también de su propia liberación. El factor de crecimiento TGF- potencia en los FLS la síntesis de colágeno y de IL-6, IL-1 y MMP1, así como de los factores de crecimiento VEGF y CTGF (factor de crecimiento del tejido conectivo) (Müller-Ladner *et al.*, 2007; Rico *et al.*, 2010). El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) actúa junto al TGF- estimulando la producción de citocinas inflamatorias por los FLS de AR. PDGF también es importante en la angiogénesis y en la hiperplasia sinovial, donde contribuye a la proliferación de las células inflamatorias y de los fibroblastos sinoviales (Rosengren *et al.*, 2010; Terabe *et al.*, 2009).

Por otra parte, es destacable el potencial proinflamatorio que se atribuye a diversas **adipocinas** en el desarrollo de la AR. Estas proteínas, derivadas principalmente del tejido adiposo blanco pero también de otros tejidos, han sido identificadas como mediadores del *estado de inflamación subclínico* de los individuos obesos y como agentes implicados en alteraciones metabólicas propias de complicaciones cardiovasculares y de enfermedades inflamatorias autoinmunes, como es la AR (Otero *et al.*, 2005). Entre dichas adipocinas, se encuentra la leptina, cuyas funciones inmunomoduladoras han sido descritas sobre los FLS de AR, ya que induce en ellos la secreción de CXCL8. También la adiponectina estimula la síntesis de mediadores proinflamatorios como IL-6 y VEGF, de enzimas de degradación de la matriz extracelular y de quimiocinas que atraen a diferentes tipos celulares como linfocitos y otros FLS (Neumann *et al.*, 2011; Frommer *et al.*, 2012).

Otros factores proinflamatorios que potencialmente participan en la activación de los FLS son los lípidos bioactivos como la **prostaglandina E2** (PGE₂). Dicha molécula es sintetizada por los

propios FLS de AR en respuesta a otros factores proinflamatorios y al factor de crecimiento epidérmico (EGF), siendo también su expresión estimulada por la adiponectina (Kusunoki *et al.*, 2010)

1.4.2.2. Interacciones celulares

Los fibroblastos de la membrana sinovial establecen interacciones con **linfocitos** mediante receptores de la superficie celular. Los FLS activados aumentan la expresión en su superficie de **VCAM-1** y de **ICAM-1**, que facilitan la adhesión de células proinflamatorias a los FLS mediante la unión de sus respectivos ligandos **VLA-4** y **LFA-1**. Dicha interacción puede provocar directamente el aumento de la expresión de mediadores inflamatorios por los FLS o permitir que se produzcan los contactos necesarios para facilitar su activación mediante otras vías de señalización (Choy, 2012; Fox *et al.*, 2010).

Además, como respuesta a la estimulación con IFN , los FLS también pueden incrementar la expresión de **HLA-DR** y de la molécula coestimuladora **CD40** (Rissoan *et al.*, 1996). La unión de CD40-CD40 Ligando conlleva la liberación de mediadores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento VEGF y quimiocinas como CXCL12 (Cho *et al.*, 2000; Nanki y Lipsky, 2000).

1.4.2.3. Receptores de reconocimiento de patrones moleculares

Los **PRRs** son capaces de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (**PAMPs**), así como componentes estructurales presentes en células del propio huésped que han podido ser liberados como consecuencia de procesos de muerte celular o daño tisular. Tanto en el tejido sinovial reumatoide como en las células sinoviales aisladas (FLS y MLS), se ha descrito la presencia de determinados PRRs que responden a la unión con sus respectivos ligandos induciendo la síntesis de moléculas de adhesión, citocinas y MMPs (Brentano *et al.*, 2009a).

Cabe señalar que en el ambiente articular de pacientes con AR se han detectado diferentes **ligandos** potenciales para dichos receptores, tanto de **tipo exógeno** (de origen vírico, bacteriano, fúngico o de protozoos) como de **tipo endógeno** (proteínas de choque térmico, fibrinógeno o componentes de células necróticas como fragmentos de RNA y DNA) (Maciejewska Rodrigues *et al.*, 2009).

De modo que los FLS funcionarían como células centinela en la activación patológica de la respuesta inflamatoria y autoinmune en la AR, al responder a los ligandos los PRRs con la síntesis de diferentes moléculas efectoras que contribuyen a la inflamación y destrucción articular. Por ello, se ha propuesto que la unión de los ligandos presentes en la articulación reumatoide a los PRRs expresados por FLS podría jugar un papel crucial tanto en el inicio de la AR como en su evolución.

Al ser éste uno de los temas centrales del presente trabajo, se dedicará un apartado exclusivo para incidir en las principales características de determinados PRRs y su implicación en las funciones biológicas de los FLS en las enfermedades reumáticas, profundizando en la descripción de los sensores responsables del reconocimiento de moléculas de RNA.

1.4.2.4. Productos de la destrucción de los tejidos articulares

Además de mediante la activación de los PRRs, existen otros mecanismos por los que los productos de la degeneración articular contribuyen a la estimulación del potencial inflamatorio y destructivo de los FLS.

En las articulaciones afectadas por AR se ha descrito la presencia de las denominadas **micropartículas**, vesículas unidas a membrana que pueden ser liberadas por diferentes tipos celulares, incluyendo FLS y linfocitos. Se ha comprobado, *in vitro*, que en los FLS inducen la síntesis de citocinas y quimiocinas proinflamatorias y de enzimas proteolíticas como MMPs. (Boillard *et al.*, 2010).

El daño tisular también supone la liberación de **componentes de la matriz extracelular** y de factores asociados a ella, como son fragmentos de fibronectina y vitronectina. Dichas moléculas pueden activar a los FLS de AR, induciendo la síntesis de factores inflamatorios y de MMPs (Müller-Ladner *et al.*, 2007; Bartok y Firestein, 2010). De hecho, se ha comprobado que la estimulación de estas células con el fragmento carboxilo terminal de unión a heparina de moléculas de fibronectina, conlleva un aumento de la producción de MMPs y de la actividad de las vías de señalización desencadenadas por estas enzimas proteolíticas. Por su parte, la inflamación sinovial se acompaña una **degradación de las proteínas presentes en el líquido sinovial**, como son la lubricina y el ácido hialurónico (Elsaid *et al.*, 2007). Dichas proteínas, cuando se encuentran intactas, parecen constituir un sistema de control de la activación de los FLS. Así, se ha observado que moléculas de ácido hialurónico de elevado peso molecular inhiben la producción de mediadores proinflamatorios como prostaglandinas e IL-6 (Santangelo *et al.*, 2007). Es más, la lubricina parece proteger al cartílago de la fijación de los FLS en su superficie, evitando las erosiones de dicho tejido (Rhee *et al.*, 2005).

Por último, el ambiente sinovial reumatoide constituye un **medio severamente hipóxico** que ha sido relacionado con el proceso inflamatorio y con la hiperplasia sinovial. Las condiciones de hipoxia generan una respuesta en los FLS de la AR, induciendo un aumento de la expresión de mediadores pro-angiogénicos y quimiotácticos, de enzimas de degradación de la matriz y de factores osteoclastogénicos, como son VEGF, CXCL12, MMP1 y MMP3. Se ha demostrado, *in vitro*, que los FLS de AR sometidos a hipoxia aumentan su migración y su potencial proangiogénico. Además, tanto el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF)-1 como la expresión de VEGF, inducida en dichas condiciones, son centrales en el proceso de neoangiogénesis en la sinovial reumatoide (Del Rey *et al.*, 2010; Konisti *et al.*, 2012).

1.4.3. El sinoviocito fibroblástico y la destrucción del cartílago

En la AR, la destrucción del cartílago articular se considera un proceso dirigido por los FLS, ya que el fenotipo particular que presentan en esta patología les confiere la capacidad de adherirse a la superficie del cartílago adyacente y de sintetizar gran cantidad de enzimas proteolíticas que degradan la matriz sobre la que crecen. No obstante, en este proceso también se contempla la participación de los condrocitos y de los macrófagos presentes en los puntos de invasión del tejido sinovial reumatoide sobre el cartílago, cuya interacción con los FLS puede potenciar la capacidad patogénica de dichos tipos celulares (Bartok y Firestein, 2010).

Los FLS de AR se fijan a la superficie del cartílago a través de **moléculas de adhesión**, que les permiten establecer fuertes interacciones con componentes de la matriz extracelular, principalmente con fibronectina, colágeno y con la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP) (Karouzakis *et al.*, 2006). Entre estas moléculas destacan las **integrinas**, una familia de

receptores transmembrana de adhesión celular que están formados por dos glicoproteínas heterodiméricas. Las **integrinas** **1**, de elevada expresión en FLS de AR en cultivo, funcionan como receptores de **fibronectina** y su bloqueo, en estudios *in vitro*, supone la inhibición parcial de la capacidad de anclaje. Además, la interacción de las integrinas de superficie de los FLS con péptidos derivados de fibronectina, induce un aumento de la expresión de MMPs, de manera que la matriz extracelular participaría en la regulación de su propia destrucción (Bartok y Firestein, 2010).

Además, los FLS han sido identificados como la principal fuente de **enzimas de degradación de la matriz extracelular** en tejido sinovial reumatoide, siendo potentes productores de MMPs y catepsinas y, en menor medida, de agrecanasas.

Las **MMPs** son una familia de endopeptidasas relacionadas funcional y estructuralmente capaces de degradar tanto los componentes proteicos de la matriz extracelular, como los de la membrana basal. Se clasifican en cinco grupos en función de la afinidad por su sustrato, es decir, del tipo de proteína de la matriz extracelular sobre la que actúan. Así se distinguen: **colagenasas** (MMP1, MMP8, MMP13); **gelatinasas** (MMP2 y MMP9); **estromelisininas** (MMP3 y MMP10); **matrilisininas** (MMP7 y MMP26) y **metaloproteinasas de membrana** (MT-MMPs: MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24 y MMP25) (Cawston *et al.*, 2010).

Entre las MMPs que producen los FLS de AR implicadas en el daño articular, son de especial importancia las colagenasas **MMP1** y **MMP13** y la estromelisinina **MMP3**. Asimismo, en estas células se detecta la síntesis de la estromelisinina MMP10 y de las gelatinasas MMP2 y MMP9. También cuentan con la presencia de las MT-MMPs, capaces de degradar componentes de la matriz extracelular que a su vez activan a otras MMPs, siendo la expresión de **MMP14** y **MMP16** superior a la de MMP15 y MMP17 (Sabeh *et al.*, 2010).

La síntesis de las MMPs por los FLS es inducida por diferentes factores, como citocinas proinflamatorias, factores de crecimiento, proteínas de matriz, ligandos de receptores tipo Toll (TLRs, *Toll Like-Receptors*) y especies reactivas de oxígeno. En experimentos *in vitro* con FLS se observa un rápido aumento en la expresión de los genes de MMPs tras la estimulación con TNF e IL-1, un incremento al que también puede contribuir la IL-17, de manera directa o sinérgica con dichas citocinas (Chabaud *et al.*, 1998). Asimismo, se han descrito otros mecanismos de regulación de las MMPs, como es la modulación de la estabilidad de su RNA mensajero (mRNA). De hecho, la expresión del mRNA de MMP1, MMP3 y MMP9 puede verse incrementada como consecuencia de un aumento de su estabilidad en respuesta a estímulos como IL-1, EGF o lipopolisacárido (LPS) (Makkonen *et al.*, 2009). Además, los FLS en cultivo expresan de manera constitutiva una familia de proteínas que bloquean específicamente la actividad de las MMPs y que reciben el nombre de inhibidores tisulares de metaloproteinasas (**TIMPs**). En la articulación sana, el mantenimiento de la cápsula articular se consigue a través de los procesos de remodelado dirigidos por un equilibrio entre las enzimas de degradación de los componentes de la matriz y sus inhibidores. El ambiente inflamatorio sinovial reumatoide favorece un incremento del **ratio MMPs/TIMPs**, ya que la producción de las MMPs por los FLS aumenta en respuesta a citocinas proinflamatorias, mientras que la síntesis de TIMPs se encuentra regulada por IL-6 y TGF- β . De modo que en estas articulaciones se pierde el balance fisiológico de MMPs y TIMPs, implicando un exceso en la actividad de las primeras que conlleva a la destrucción del cartílago (Davidson *et al.*, 2006).

Las **catepsinas** son otro grupo importante de enzimas de degradación de la matriz extracelular con una amplia especificidad y cuya regulación depende de citocinas y proto-oncogenes. Los FLS de AR expresan **catepsina K** y **catepsina L**, siendo la primera capaz de degradar el cartílago y de contribuir a la erosión del hueso. Por su parte, la catepsina L actúa rompiendo moléculas de proteoglicano y colágeno, centrales en la matriz del cartílago, habiéndose comprobado que su inhibición supone la alteración del proceso de invasión del cartílago en modelos de artritis (Conus y Simon, 2010; Schedel *et al.*, 2004; Salminen-Mankonen *et al.*, 2007).

Las **agrecanasas** constituyen un tercer grupo de proteasas clave en la degradación del cartílago, ya que su sustrato es el agrecano y éste es el proteoglicano más abundante en la matriz extracelular de dicho tejido. Las agrecanasas 1 y 2, también denominadas **ADAMTS-4** y **ADAMTS-5**, rompen los glicosaminoglicanos entre los aminoácidos Glu373 y Ala374. Aunque clásicamente han sido consideradas enzimas propias de los condrocitos y mediadores clave en la destrucción del cartílago en la OA, se ha demostrado su expresión constitutiva en los FLS en cultivo, de modo que también podrían participar en el proceso de degradación del cartílago en la AR. Además, se ha descrito en modelos murinos que la ausencia de ADAMTS-5 supone la atenuación de los procesos destructivos propios de la artritis degenerativa. Por otra parte, la expresión de ADAMTS-4 puede ser inducida por TGF- β , de modo que dicho factor de crecimiento, presente en la íntima de la sinovial reumatoide, podría estar contribuyendo a la pérdida de proteoglicanos en el cartílago articular (Yamanishi *et al.*, 2002; Stanton *et al.*, 2005).

Aunque las interacciones que establecen los FLS con los **condrocitos** no han sido estudiadas en profundidad, se ha sugerido la existencia de algún tipo de comunicación entre ellos, ya que la presencia de condrocitos viables en la matriz del cartílago se asocia a una mayor degradación del mismo. Dichos condrocitos exhiben un **estado catabólico**, caracterizado por la inhibición de la síntesis de proteoglicanos y la liberación de enzimas proteolíticas, que puede ser promovido por citocinas proinflamatorias. De modo que, por una parte, los FLS expresarían factores inductores de dicho estado que conseguirían acelerar la destrucción del cartílago, y por otra, los condrocitos secretarían quimiocinas capaces de atraer y activar a los FLS (Steenvoorden *et al.*, 2007; Schroepel *et al.*, 2011). En este sentido, se ha detectado un elevado nivel de transcritos de CCL13/MCP-4 en el cartílago de AR, siendo ésta una molécula inductora de la proliferación de los FLS (Iwamoto *et al.*, 2006).

Los **macrófagos** adyacentes a los FLS en las zonas de erosión del cartílago también han sido implicados en el proceso degradativo del cartílago. Experimentos *in vitro* demuestran que el cocultivo de macrófagos y fibroblastos conlleva un aumento de la destrucción del cartílago, pudiendo inhibir el proceso mediante el uso de anticuerpos anti IL-1, TNF y IL-6 (Scott *et al.*, 1997). Probablemente, en este sistema, la degradación se encuentre potenciada por diferentes factores, como son un aumento de la síntesis de MMPs por parte de los FLS en respuesta a las citocinas producidas en su interacción con los macrófagos o también por la presencia de moléculas de superficie como CD147 (Zhu *et al.*, 2006).

Por tanto, aunque los FLS son las células centrales en la destrucción del cartílago, la evolución de dicho proceso patológico también se encuentra condicionada por los condrocitos y los macrófagos presentes en los tejidos de las articulaciones afectadas por AR.

1.4.4. El sinoviocito fibroblástico y la destrucción del hueso

La erosión ósea articular que aparece con la progresión de la AR fue atribuida, en un principio, a la acción de las enzimas de degradación de la matriz extracelular. Sin embargo, tras identificarse la presencia de **osteoclastos** en la interfase entre la membrana sinovial y el hueso de las articulaciones reumáticas, se ha considerado que dichas células son las principales ejecutoras del proceso destructivo en esta patología (Takayanagi, 2009).

Distintas evidencias han demostrado la importancia de la participación de los **FLS** en el proceso de degradación llevado a cabo por los osteoclastos. Los osteoclastos son células multinucleadas de gran tamaño, caracterizadas por expresar el receptor de calcitonina y la fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) y por estar especializadas en la resorción de la matriz ósea (Takayanagi, 2009). Se diferencian a partir de los precursores hematopoyéticos de los monocitos/macrófagos, en un proceso denominado **osteoclastogénesis** en el que es necesaria la presencia de una serie de factores sintetizados por otros tipos celulares. Una de las moléculas clave en la osteoclastogénesis es el **RANKL**, aunque también existe una participación del factor estimulador de colonias monocito-macrófago (M-CSF), que permite la supervivencia de las células precursoras. El RANKL pertenece a la familia de citocinas del TNF α e interviene en todas las etapas de la generación de los osteoclastos. A partir de la unión a su receptor RANK en los precursores mieloides, actúa estimulando su migración, fusión, activación y supervivencia (Takayanagi *et al.*, 2000). Dicha interacción con el receptor está modulada por la osteoprotegerina (**OPG**), un receptor soluble que se une a RANKL y bloquea su actividad (Walsh *et al.*, 2010).

En la AR, se ha sugerido que la diferenciación de los osteoclastos presentes en los puntos de destrucción ósea se produzca en la propia sinovial reumatoide, habiéndose detectado la formación de este tipo celular en cultivos que únicamente contienen células sinoviales, entre las cuales existirían, por tanto, precursores de osteoclastos y células que monitorizan la **osteoclastogénesis** (Takayanagi *et al.*, 2007). Además, diferentes estudios han confirmado la relevancia de RANKL en la formación de los osteoclastos y la destrucción ósea en las enfermedades inflamatorias articulares. La ausencia de RANKL en ratones mutantes en los que se induce la artritis, impide la osteoclastogénesis y la aparición de las lesiones óseas propias de la enfermedad, sin que el proceso inflamatorio se vea afectado (Pettit *et al.*, 2001). En pacientes con AR, el estudio histológico de las erosiones óseas ha mostrado que la expresión celular de RANKL se encuentra prácticamente limitada a los puntos donde los osteoclastos destruyen el hueso, mientras que la de su inhibidor OPG es mayor en zonas alejadas de dichas erosiones (Pettit *et al.*, 2006). En base a estos datos y al elevado nivel de RANKL que se detecta en la membrana sinovial de pacientes con AR, se ha sugerido que el daño óseo asociado a la enfermedad sea la consecuencia patológica de la alteración del **balance RANKL-OPG**, debido a una expresión anormal del primero promovida por las condiciones del ambiente sinovial inflamatorio (Komatsu y Takayanagi, 2012).

En cuanto a la identificación del tipo celular que contribuye en mayor grado a la generación de los osteoclastos en las articulaciones afectadas por la AR, sigue existiendo cierta controversia, ya que si bien se ha evidenciado la participación de los **FLS**, también parece existir una asociación entre la activación de las células T y el progreso de la degradación ósea.

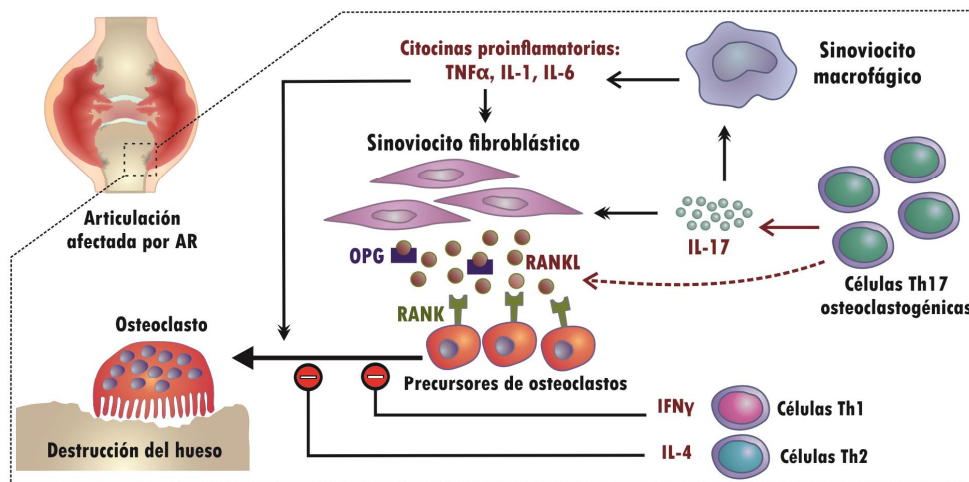


Figura 6. Regulación del proceso de osteoclastogénesis en una articulación afectada por AR.

Las células **Th17** constituyen la única **subpoblación osteoclastogénica** identificada entre las células T implicadas en la patología (Okamoto y Takayanagi, 2011b). Sin embargo, aunque expresan mayores niveles de RANKL que Th1 y Th2, se ha comprobado que, en cocultivo con precursores de osteoclastos, no son capaces por sí solas de inducir la diferenciación de éstos (Sato *et al.*, 2006). No obstante, la implicación de las células Th17 en la erosión ósea articular en las enfermedades reumáticas sigue siendo un tema actual investigación y, aunque no se ha demostrado su participación directa, **IL-17** se ha descrito como un potente mediador del proceso de osteoclastogénesis. Dicha citocina induce la síntesis de RANKL en las células que dirigen la diferenciación, como osteoblastos y FLS. También incrementa la inflamación local y la producción de mediadores como IL-1, IL-6 y TNF, que a su vez estimulan la producción de RANKL en los FLS. Finalmente, se ha observado una correlación entre los niveles de **IL-23** y los de RANKL en pacientes de AR (Braun *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2006), siendo la IL-23 una citocina necesaria en el proceso de estabilización y proliferación de las células Th17 en diferenciación. Esta última observación, unida a la función osteoclastogénica indirecta de la citocina efectora IL-17, ha contribuido a que la implicación del eje RANKL/Th17 en la destrucción ósea asociada a esta patología sea una hipótesis cada vez más considerada (Okamoto y Takayanagi, 2011a).

No obstante, el **RANKL producido por los FLS** parece tener mayor relevancia en la osteoclastogénesis que el liberado por las Th17, ya que se ha demostrado que sería suficiente para que se diferenciases dichas células. Además, citocinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF, de gran presencia en el líquido y la membrana sinovial de pacientes con AR, inducen potentemente la expresión de RANKL en los FLS (Takayanagi *et al.*, 2007). Es más, los FLS de AR también son capaces de bloquear la actividad reparadora de los osteoblastos, detectándose en ellos una elevada expresión del inhibidor de osteoblastos Dickkopf-1 (DKK-1). Por tanto, los FLS contribuyen de manera importante a la degradación del hueso articular en la AR, promovéndola a través de diferentes mecanismos (Diarra *et al.*, 2007).

1.4.5. Interacciones celulares de los sinoviocitos fibroblásticos

1.4.5.1. Sinoviocitos fibroblásticos y macrófagos

Los **macrófagos** son considerados como los principales productores de **TNF** e **IL-1** en la sinovial reumatoide, dos citocinas centrales en la mediación de la inflamación crónica articular (Kennedy *et al.*, 2011). Dichas células se encuentran en contacto directo con los FLS en la capa íntima de la membrana sinovial, donde entablan una comunicación que parece determinante en el comportamiento patogénico de ambos tipos celulares en la AR. Como se señaló en un apartado anterior, estas interacciones han sido relacionadas con un aumento de la capacidad destructiva de los FLS sobre el cartílago articular.

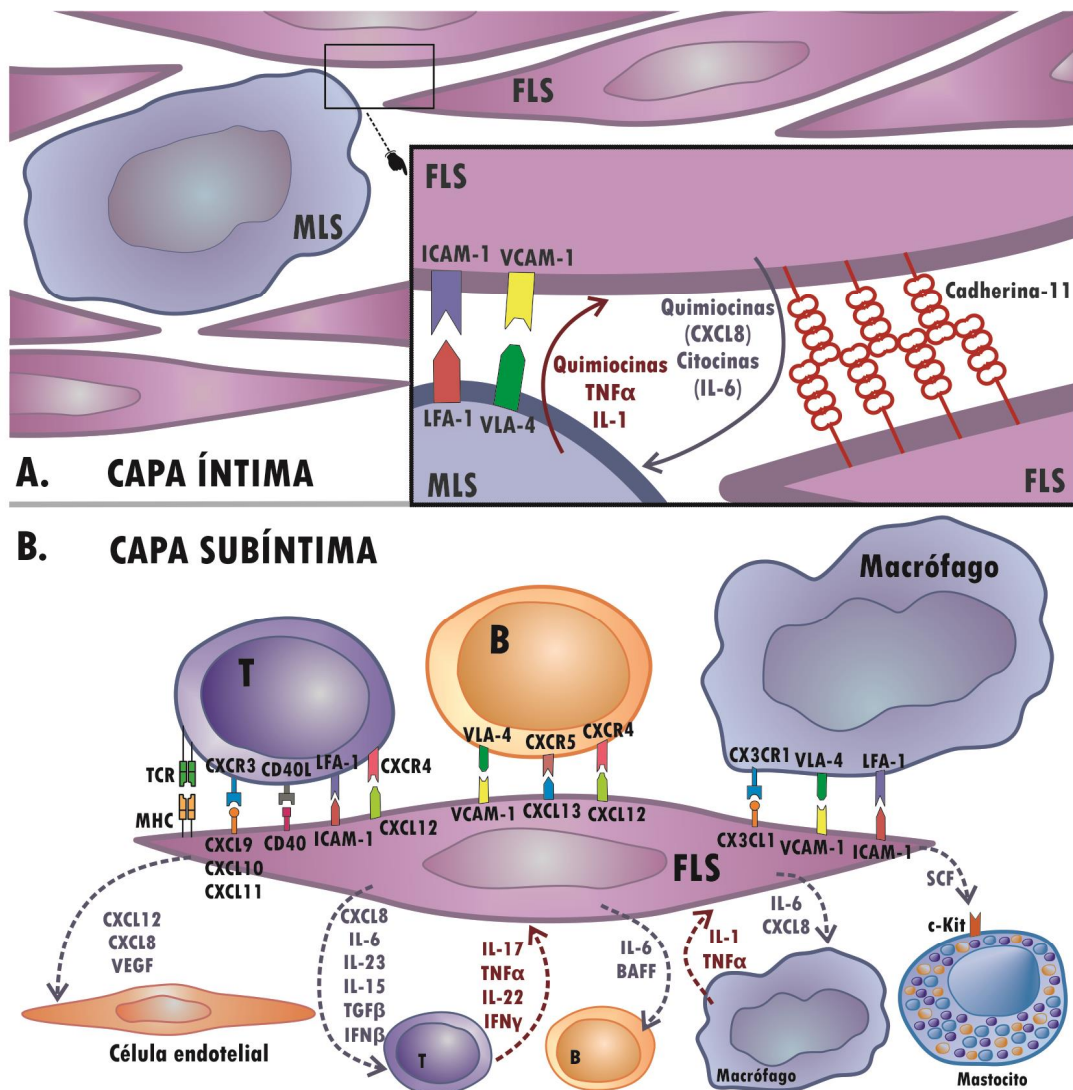


Figura 7. Esquema de las interacciones celulares que se establecen en la membrana sinovial en la AR. (A) Interacciones celulares entre los FLS y los MLS de la capa íntima. (B) Interacciones del FLS con los componentes celulares presentes en la capa subíntima.

Por su parte, los FLS son capaces de estimular la activación de los monocitos, habiéndose comprobado que, en cocultivo, inducen en ellos un aumento de marcadores de diferenciación, de la síntesis de transcritos de TNF e IL-1, de la secreción de TNF y de la liberación de quimiocinas.

Asimismo, los **FLS** de los cocultivos también se activan e incrementan la producción de **CXCL8** e **IL-6** y la expresión de **VCAM-1** e **ICAM-1** en superficie. Cabe señalar que la contribución de los macrófagos a la estimulación de los FLS no sólo está mediada por el TNF, sino que, una vez activados, también sintetizan ligandos de VCAM-1 e ICAM-1, cuya unión a sus receptores promueve la activación de los propios macrófagos. Por otra parte, los FLS sometidos a un ambiente inflamatorio también podrían contribuir al reclutamiento de macrófagos en la capa subíntima mediante la producción de quimiocinas, como es **CX3CL1**/fractalina, una molécula que es reconocida por el receptor CX3CR1, expresado en macrófagos (Noss y Brenner, 2008; Agarwal y Brenner, 2006). De modo que las interacciones entre los FLS y los macrófagos adyacentes en la membrana sinovial reumatoide intervienen en el mantenimiento de las condiciones mediadoras del desarrollo de la AR a nivel articular.

1.4.5.2. Sinoviocitos fibroblásticos y células del infiltrado inflamatorio

Como ya se ha dicho, en la AR aparece un infiltrado inflamatorio en la **capa subíntima** de la membrana sinovial de las articulaciones afectadas. Las células del infiltrado llegan a esta localización tras un proceso de migración regulado por múltiples factores, en el que resulta determinante la interacción con otros tipos celulares y la participación de diferentes moléculas de adhesión celular, de quimiocinas y de sus receptores (Boissier *et al.*, 2012). En el presente apartado se desglosarán las **interacciones** que establecen los FLS con las células B y T del infiltrado inflamatorio, analizando su contribución al reclutamiento, supervivencia y activación de las mismas, así como su repercusión en la funcionalidad de los propios FLS (Figura 7).

1.4.5.2.1. Sinoviocitos fibroblásticos y células T

Los linfocitos T representan un elevado porcentaje de las células que infiltran la membrana sinovial reumatoide, en cuyo reclutamiento y supervivencia están implicadas las interacciones que establecen con los FLS, constituyendo éstas, a su vez, un mecanismo de activación recíproco. De hecho, se ha comprobado que en cocultivo, los linfocitos T se adhieren sobre los FLS, aumentan sus marcadores de activación y sintetizan una mayor cantidad de citocinas, presentando además resistencia a la apoptosis. Por su parte, los FLS disminuyen la producción de colágeno e incrementan la de citocinas y quimiocinas, MMPs y moléculas coestimuladoras (Fox *et al.*, 2010; Lundy *et al.*, 2007).

La **migración de las células T** hacia las articulaciones afectadas por la AR y su acumulación en ellas, podrían estar mediadas, en parte, por las **quimiocinas** que sintetizan los FLS (Iwamoto *et al.*, 2008). En las células T de memoria del tejido sinovial reumatoide se detecta un aumento de los transcritos de los receptores CXCR4, CXCR2 y CCR5, siendo el **CXCR4** el de mayor presencia. La expresión de este receptor parece ser dependiente del **TGF- producido por los FLS, los cuales también pueden inducir un aumento de su síntesis a través de la liberación de **IL-15** (Nanki y Lipsky, 2000; Buckley *et al.*, 2000). Además, los FLS han sido identificados como los principales productores de **CXCL12**, el ligando de CXCR4, siendo capaces de incrementar su expresión en respuesta a la interacción con células T, ya sea por el efecto de IL-17 o por el contacto entre CD40L-CD40 de sus superficies celulares (Kim *et al.*, 2007a). Esta serie de observaciones se complementa con el hecho de que la unión de CXCR4 a su ligando promueve un aumento de la adhesión de las células T**

mediada por integrinas y de su migración a través de monocapas de FLS (Buckley *et al.*, 2000; Bradfield *et al.*, 2003). De manera que parece justificado el que se haya propuesto que las citocinas sintetizadas por los FLS participen en el reclutamiento y retención de las células T en la articulación. Esta misma hipótesis estaría respaldada por otros estudios que han detectado que la presencia de **CXCR3** y de **CCR5** en células T de líquido sinovial de pacientes con AR es mayor que en las células T de sangre periférica. Es más, también se ha comprobado que los FLS, tras ser estimulados con citocinas o ligandos de TLRs presentes en el ambiente sinovial reumatoide, aumentan la producción de agonistas de ambos receptores, como CXCL9, CXCL10, CXCL11 y CCL3 (Ueno *et al.*, 2005; Pierer *et al.*, 2004).

También se ha sugerido que los FLS promueven la **supervivencia de las células T** en el tejido sinovial reumatoide mediante la inhibición de su apoptosis (Buckley, 2011). En este sentido, además de que no se han encontrado evidencias de apoptosis de las células T en la membrana sinovial de pacientes con AR (Salmon *et al.*, 1997), se ha observado que al extraerlas de la articulación, se produce una rápida inducción del proceso apoptótico que puede evitarse si se cultivan con sobrenadante de FLS o con diferentes tipos de fibroblastos. De modo que los fibroblastos del ambiente sinovial serían determinantes en la supervivencia de las células T en el infiltrado inflamatorio, habiéndose identificado al **IFN** que sintetizan como el mediador clave en la inducción de la resistencia a la apoptosis (Buckley, 2011). De igual modo, otros estudios han propuesto que **CXCL12**, producida por los FLS, también participe en la protección de las células T, ya que es capaz de inhibir la inducción de la apoptosis mediada por anti-CD3 en las células T CD4+ de sangre periférica (Nanki *et al.*, 2000).

Asimismo, los FLS podrían inducir la **activación de las células T sinoviales**, bien sea mediante la presentación de antígenos o a través de la liberación de citocinas. Una de las particularidades de los FLS de AR, es la expresión de **moléculas HLA-DR** del MHC de clase II, cuya presencia les confiere la capacidad de actuar como células presentadoras de antígeno (Zimmermann *et al.*, 2001). Sin embargo, no se ha demostrado que cuenten con las señales coestimuladoras apropiadas para una activación de las células T dependiente de antígeno, de modo que, aunque expresan moléculas como CD40 que podrían contribuir a dicha coestimulación (Rissoan *et al.*, 1996), se propone que ésta se encuentre facilitada por otros tipos celulares de la sinovial reumatoide. No obstante, las células T también pueden ser activadas por las **citocinas del ambiente** inflamatorio crónico sinovial, al que los FLS contribuyen mediante la secreción de IL-6 e CXCL8, entre otras (Sweeney y Firestein, 2004).

Tras su activación, las células T sintetizan mediadores que estimulan a los propios FLS, cerrándose de este modo un **bucle de activación** entre ambos tipos celulares (Fox *et al.*, 2010). En este ámbito, la investigación en los últimos años ha estado dirigida a profundizar en el estudio de las **células Th17** en dicho sistema de interacciones. Existen evidencias experimentales que indican que entre los FLS y las Th17 del infiltrado se establece una comunicación mediada tanto por **citocinas** como por el **contacto celular** entre ambos tipos celulares. Como se ha señalado anteriormente, se ha sugerido que un indicador del carácter patogénico de las Th17 en la AR, sería, precisamente, su capacidad de potenciar la activación de los FLS. Asimismo, se ha apuntado que los propios FLS activados podrían participar en la diferenciación y activación de las células Th17 en la sinovial

reumatoide. En este sentido, los FLS de AR, en respuesta a IL-17 y TNF , aumentan la síntesis de IL-6 e IL-23, siendo ambas citocinas clave en el proceso de polarización y expansión de las Th17 (van Hamburg *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2007). Además, se ha descrito que tras el contacto celular directo con las células T sinoviales también incrementa notablemente su producción de IL-15, una interleucina capaz de estimular la expresión de IL-17 en dichas células T (Miranda-Carús *et al.*, 2004).

De modo que el progreso en el conocimiento de las interacciones entre los FLS y las células Th a nivel local, en las articulaciones afectadas por AR, refuerza la teoría de la existencia de una activación recíproca entre dichas células que resultaría clave en el proceso patológico articular (Dong y Zhu, 2012).

1.4.5.2.2. Sinoviocitos fibroblásticos y células B

El estudio del tejido sinovial de pacientes con AR muestra que, aproximadamente en un 30% de los casos, existen **agregados linfoides** similares a los **centros germinales** de los órganos linfoides secundarios. En ellos, se facilita la estimulación de las células B a través de su interacción con antígenos, quimiocinas y moléculas de adhesión. Así, a partir de estos datos y al haberse identificado la presencia de inmunoglobulinas en el tejido sinovial, que indican que posiblemente exista un proceso de maduración local de las células B, se ha propuesto que los agregados linfoides sinoviales puedan cumplir una función análoga a la de los centros germinales (Nakken *et al.*, 2011; Weyand y Goronzy, 2003).

En la membrana sinovial de las articulaciones afectadas que contienen este tipo de agregados, se detecta una elevada expresión de algunos genes clave en la formación de los centros germinales, como son **CXCL12** y **CXCL13/BCA-1**, siendo ambas quimiocinas sintetizadas por los FLS (Shi *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2011). En cuanto a la interacción entre células B y FLS, en cocultivos de ambos tipos celulares, se ha observado que las células B se adhieren sobre los FLS y migran a través de monocapas formadas por dichas células. Además, los FLS actúan inhibiendo la apoptosis de las células B, un efecto que podría estar mediado por diferentes factores de los que sintetizan, como son la quimiocina CXCL12, la molécula de adhesión **VCAM-1** y el factor de supervivencia **BAFF** (Factor activador de células B de la familia de TNF) (Wang *et al.*, 2011). Concretamente, los FLS de AR parecen presentar una mayor capacidad para bloquear la apoptosis de las células B que otros tipos de fibroblastos estudiados, como los de OA o de líneas dérmicas, siendo los únicos que inducen en ellas la expresión de la molécula anti-apoptótica **Bcl-x_L** (Hayashida *et al.*, 2000). Por otra parte, los FLS estimulan también la producción de inmunoglobulinas por las células B, promoviendo su diferenciación a células plasmáticas (Dechanet *et al.*, 1995).

Por tanto, aunque no existen evidencias concluyentes, algunas de las características de los FLS de AR junto a sus efectos sobre las células B aquí enumerados, les convierten en potenciales mediadores de la maduración y supervivencia de los linfocitos B, cumpliendo una función similar a las de las células del estroma en los centros germinales.

1.5. La artrosis (OA)

1.5.1. Epidemiología, etiología y manifestaciones clínicas

La artrosis u osteoartritis (**OA**) es una enfermedad degenerativa articular que se caracteriza principalmente por la destrucción del cartílago que recubre las superficies óseas, apareciendo también alteraciones patológicas en el hueso subcondral y la membrana sinovial (Kapoor *et al.*, 2011). Las articulaciones de las manos, cadera, rodilla, pies y espina dorsal son las más frecuentemente afectadas por esta enfermedad, cuya progresión termina en un deterioro de la estructura funcional de las mismas (Suri *et al.*, 2012).

La OA es una de las enfermedades reumáticas de mayor **prevalencia** en la actualidad. Se calcula que aproximadamente un 30% de la población española la padece, con una incidencia de alrededor del 60% en hombres mayores de 65 años y del 70% en mujeres de este rango de edad, representando una de las primeras causas de discapacidad en edades tardías (Fernández-López *et al.*, 2008).

Aunque sigue sin conocerse la **etiología** concreta de esta patología, se propone que existan múltiples factores implicados en su desarrollo, en el que participan componentes mecánicos, inflamatorios y metabólicos. En este sentido, los factores de riesgo descritos que parecen condicionar su aparición son diversos, como la edad avanzada, una predisposición genética, el estado nutricional y hormonal, discapacidades físicas, traumatismos, etc. La edad es el factor que más estrechamente se correlaciona con la aparición de la OA, ya que con el envejecimiento, el cartílago articular sufre una serie de cambios morfológicos debidos a una pérdida de la capacidad de mantener y reparar el tejido por parte de los condrocitos, cuya actividad mitótica y sintética disminuye con el paso de los años (Pereira *et al.*, 2011; Sandell, 2012).

El **síntoma** principal de la OA es el dolor articular, que se describe como difuso y aparece, típicamente, con el esfuerzo de movimiento o de carga. En etapas avanzadas de la enfermedad, el dolor se produce por mínimos movimientos articulares y puede mantenerse en reposo, llegando incluso a afectar al descanso nocturno. Son también síntomas comunes la rigidez de las articulaciones, la inflamación y acumulación de líquido en las mismas, la sensación de crujido y crepitación con el movimiento y, en procesos avanzados, la inestabilidad y deformidad condicionadas por el aumento del tamaño del hueso subcondral que pueden suponer la pérdida de la capacidad de movimiento articular (Moskowitz *et al.*, 2007). Tanto el estudio como el diagnóstico de esta patología se encuentran dificultados por el hecho de que sus síntomas aparecen de manera gradual, intercalándose, además, periodos activos y de remisión. De modo que su diagnóstico suele realizarse en etapas avanzadas, cuando el daño articular ya ha progresado suficientemente para provocar la aparición de signos clínicos y evidencias radiográficas, existiendo un margen reducido para una intervención terapéutica eficaz. De hecho, la Sociedad Española de Reumatología (SER) señala que las lesiones articulares propias de la artrosis, generalmente evolucionan hasta convertirse en procesos degenerativos que implican la incapacidad física del paciente y, en cuyo caso, se precisa la sustitución total de la articulación por una prótesis artificial (SER, 2008).

Por tanto, la OA se presenta como una enfermedad de origen multifactorial, heterogénea en su progresión y sintomatología, que afecta a las articulaciones de manera global. En los siguientes

apartados, además de analizar los procesos que acontecen en el cartílago articular, se describirán las alteraciones que se producen en la membrana sinovial y en el hueso subcondral, y su contribución al progreso de la enfermedad.

1.5.2. Histofisiopatología

Durante el desarrollo de la OA, aparecen una serie de **cambios morfológicos** a nivel estructural e histológico en los tejidos articulares. El **cartílago articular** sufre una alteración de los componentes de su matriz, que incluyen el aumento del contenido en agua, la disminución del tamaño de las moléculas de agregano y la pérdida de la estructura de la red de colágeno. Con el avance de la enfermedad, estas variaciones se traducen en la fibrilación del tejido, que termina por agrietarse y perder su elasticidad e integridad. Por otra parte, se produce un aumento de la osificación endocondral que se asocia a la **esclerosis del hueso subcondral**, siendo característica la formación de osteofitos marginales, el desarrollo de quistes de hueso subcondral y la aparición de microfracturas y lesiones a nivel de la médula ósea (Martel-Pelletier y Pelletier, 2010) (Figura 1).

Asimismo, se describe la **hipertrofia e hiperplasia de la membrana sinovial**, donde puede aparecer, junto al incremento de células de la capa íntima, un **infiltrado de células inflamatorias**, principalmente macrófagos y linfocitos T y, en menor número, linfocitos B activados. Otra de las manifestaciones patológicas es la **angiogénesis** que tiene lugar en el tejido sinovial, donde el aumento de la vascularización facilitaría el establecimiento de un proceso inflamatorio crónico (Mapp y Walsh, 2012; Ashraf *et al.*, 2011). En conjunto, dichos cambios promueven una transformación de la membrana sinovial que, en etapas avanzadas de la OA, es similar a la que sufre en la AR (Attur *et al.*, 2010). Sin embargo, a diferencia de la AR, la inflamación no afecta a la totalidad de la membrana, sino que se localiza específicamente en áreas adyacentes a las condropatías (Ayril *et al.*, 2005). De modo que clínicamente no siempre resulta sencillo detectar la sinovitis en la OA, sobre todo al inicio del desarrollo de la enfermedad (Sellam y Berenbaum, 2010).

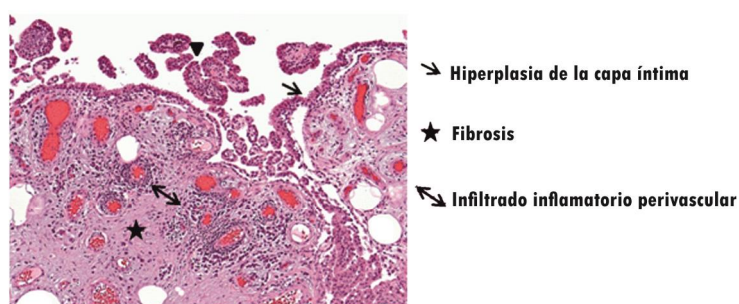


Figura 8. Apariencia histopatológica de la membrana sinovial en la OA.
Micrografía obtenida de Scanzello y Goldring, 2012. Tinción hematoxilina-eosina de corte de tejido sinovial de paciente con diagnóstico de OA. Aumento: 20x.

Por otra parte, sigue sin dilucidarse la secuencia de los **mecanismos patogénicos** responsables de dichas alteraciones morfológicas e histológicas. De hecho, constituye un tema de debate científico, ya que implica que se determine el orden temporal/causal en que se producen la erosión del cartílago articular, la remodelación del hueso subcondral y la inflamación de la membrana

sinovial. En relación a esta controversia, cabe señalar que, aunque la OA había sido clasificada como una enfermedad reumática no inflamatoria, son numerosos los estudios que han evidenciado la existencia de un **componente inflamatorio**, incluso en etapas iniciales (Sellam y Berenbaum, 2010; Kapoor *et al.*, 2011; Rainbow *et al.*, 2012). Como consecuencia de este nuevo concepto de la OA, en los últimos años se ha cuestionado su validez como control en los estudios que investigan el proceso inflamatorio articular con el que se manifiesta la AR (Del Rey *et al.*, 2012; Galligan *et al.*, 2007). Así, por ejemplo, tanto en el sobrenadante de cultivos de membrana sinovial de AR como de OA, se detectan la presencia de IL-1, TNF y CXCL8 (Furuzawa-Carballeda *et al.*, 2008), describiéndose una mayor secreción en la AR de IL-1, IL-6, EGF e IL-10 y siendo los niveles de TNF, CXCL8 y PGE₂ similares en ambas patologías, siempre y cuando la OA se encuentre en etapas avanzadas. En base a estos datos, algunos autores han propuesto que la principal diferencia entre la inflamación sinovial de OA y AR sea la cantidad de las citocinas proinflamatorias que se liberan, encontrándose condicionado el perfil de dichos mediadores por la propia evolución del proceso y por las células del infiltrado inflamatorio. De hecho, lejos del papel secundario que se había atribuido a la **sinovitis** en la OA, se propone que ésta influye en los procesos degenerativos del cartílago y el hueso articular, potenciando la liberación de proteasas y citocinas proinflamatorias al ambiente sinovial (Sellam y Berenbaum, 2010). Incluso hay estudios en los que se correlaciona la intensidad de la inflamación sinovial en la OA con la progresión de la destrucción del cartílago y la severidad del dolor articular (Scanzello y Goldring, 2012).

De modo que, a pesar de la controversia que existe en la descripción de los mecanismos patogénicos que dirigen el progreso de la OA, parece ampliamente aceptado que los factores inflamatorios presentes en el ambiente articular contribuyen a la alteración del metabolismo y a los procesos catabólicos que sufren los tejidos implicados. Así, una de las hipótesis más respaldadas es que en la OA se establece un **bucle de activación** recíproca entre la **degradación** del cartílago articular y la **inflamación** del tejido sinovial. Según esta idea, la actividad catabólica a nivel del cartílago, conllevaría la liberación de los productos de su degradación al líquido sinovial, siendo éstos capaces de activar a las células de la membrana sinovial. Los sinoviocitos activados, a su vez, iniciarían una respuesta inflamatoria, potenciando la infiltración de células mononucleares y aumentando la síntesis de agentes catabólicos y proinflamatorios con efectos sobre los tejidos articulares. De esta manera se liberarían al líquido sinovial un conjunto de mediadores, entre los que destaca la IL-1, ya que ésta es capaz de inducir la producción de otras moléculas proinflamatorias como TNF, IL-6, IL-17, CXCL8, y de enzimas de destrucción de matriz del cartílago, como MMPs y agreganasas. Como resultado de este ambiente, en el cartílago articular se perdería el balance entre la degradación y reparación de la matriz, potenciando la destrucción del mismo y estableciendo, de este modo, un sistema de estimulación continuo que contribuiría a la perpetuación de la OA (Scanzello y Goldring, 2012).

1.5.3. Sinoviocito fibroblástico en la OA

Los mediadores que participan en la patogénesis de la OA pueden tener su origen en los diferentes tejidos articulares afectados por la enfermedad, existiendo una participación activa de sus **componentes celulares** (Loeser *et al.*, 2012). Así, junto al estudio del comportamiento de los

condrocitos en esta patología, clásicamente considerados como las células responsables del proceso degenerativo de la OA, ha crecido el interés en determinar el papel de los **FLS**, macrófagos y linfocitos en los mecanismos patogénicos articulares.

El análisis de la **contribución de los FLS** a esta enfermedad podría ser fundamental, ya que, como se ha señalado en apartados anteriores, se presentan como los máximos responsables de las manifestaciones patológicas articulares en la AR, siendo éstas, en alguno de los aspectos, similares en ambas enfermedades. En este sentido, al igual que en la AR, los FLS de la OA, junto con los macrófagos y las células mononucleares, son los principales productores de **IL-1** y **TNF** (Sadouk *et al.*, 1995; Alaaeddine *et al.*, 2007). Dichas citocinas pueden estimular su propia producción de manera autocrina, ya que los FLS cuentan con receptores para ambas moléculas, siendo además capaces de activar en ellos y en los condrocitos la síntesis de otros **mediadores proinflamatorios** como IL-6, CXCL8 o PGE₂. Por otra parte, también se ha descrito que la **IL-17** actúa sobre los FLS de OA, induciendo la síntesis del factor angiogénico VEGF, así como la producción de las quimiocinas CXCL8 y CXCL1 que participan en el reclutamiento de células mononucleares y la diferenciación de condrocitos (Honorati *et al.*, 2002). Al igual que en la AR, los FLS de OA sintetizan **MMPs**, de modo que, junto a los condrocitos, producen grandes cantidades de MMP1, MMP3, MMP9 y MMP13 (Shibakawa *et al.*, 2003). Concretamente, la síntesis de MMP3 se localiza principalmente en el límite del cartílago en la OA, lo que sugiere que dicha proteasa sea secretada por el tejido sinovial y actúe directamente sobre el cartílago adyacente (Yuan *et al.*, 2004).

Al ser la sinovitis y la activación de los FLS conceptos clásicamente asociados a la AR, todavía es limitado el conocimiento acerca del papel que cumplen los FLS en la OA y de la relevancia del componente inflamatorio en la alteración funcional de los mismos. Hasta hace unos años, la mayoría de los estudios estaban encaminados a caracterizar el perfil de expresión génica y la función de los FLS de AR, considerando a los FLS de OA como controles y asumiendo que sus propiedades eran equiparables a las que se observarían en individuos sanos. Sin embargo, recientemente, mediante el uso de microarrays de mRNA, se ha demostrado que los FLS de OA cuentan con un **patrón transcriptómico propio** que presenta diferencias significativas no sólo con respecto a los de AR, sino también con los aislados de individuos sanos. De modo que dichas características diferenciales podrían ser determinantes en su participación en la patogénesis de la OA (J del Rey *et al.*, 2012).

1.6. Principales vías de señalización y factores de transcripción del sinoviocito fibroblástico en las enfermedades reumáticas

Los FLS contribuyen a los procesos de inflamación y destrucción articular con los que progresan la AR y la OA mediante diferentes mecanismos, algunos de los cuales son activados y potenciados por las vías de señalización intracelular que se desencadenan en respuesta a los estímulos presentes en el **ambiente sinovial reumatoide**. De hecho, la sobreactivación de las enzimas implicadas en las **cascadas de señalización** y la alteración en la función de los **factores de transcripción** que modulan la expresión génica en los FLS, han sido asociadas al desarrollo de ambas enfermedades reumáticas (Okamoto *et al.*, 2008).

En este apartado, se enumerarán las principales características de las vías de señalización intracelular y de los factores de transcripción implicados en la aportación patogénica de los FLS al progreso de la AR y la OA a nivel articular.

1.6.1. Vía de las MAPK

Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) son una familia de proteínas de señalización altamente conservadas en la evolución que participan en el control de diferentes funciones celulares, como son el metabolismo, proliferación, apoptosis o diferenciación celular. Las MAPKs han sido divididas en tres grandes subfamilias: las quinasas reguladas por señales extracelulares (**ERK**), cuentan con dos isoformas ERK1 y ERK2 y su función es participar en el control de las respuestas mitóticas, del crecimiento y de la diferenciación celular; las quinasas N-terminal de C-Jun (**JNK**), también conocidas como proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK), presentan tres isoformas JNK1, JNK2, JNK3 y son claves en la regulación de la transcripción; por último, las MAPK **p38**, con 4 isoformas (, , ,) y cuya activación se desencadena principalmente por citocinas inflamatorias y factores de estrés del ambiente celular (Johnson y Lapadat, 2002).

Las MAPK fosforilan específicamente proteínas intracelulares, en las que controlan su actividad enzimática, su interacción con otras proteínas y moléculas, su localización celular y la degradación por proteasas. Los sustratos de estas quinasas pueden ser otras proteínas quinasas, fosfolipasas, factores de transcripción y proteínas del citoesqueleto. Están reguladas por un complejo sistema de fosforilación que implica la participación de tres grupos de proteínas quinasas que se fosforilan y activan de manera secuencial. La unión de distintos estímulos (citocinas, factores de crecimiento, proteínas de matriz), a sus correspondientes receptores,

promueve la fosforilación de las quinasas de quinasas de MAPK (MAPKKK ó MAP3K) que, a su vez, activan a las quinasas de MAPK (MAPKK, MAPK2 ó MKK). Estas últimas cuentan con diversas isoformas con actividad específica sobre las diferentes MAPKs. Las fosfatasa de las MAPKs revierten su fosforilación para devolverlas a un estado inactivado, constituyendo un sistema de control de las cascadas de fosforilación en las respuestas intracelulares (Johnson y Lapadat, 2002).

Las MAPKs están implicadas en la **regulación** de la expresión de diversos **mediadores proinflamatorios** como IL-1 , TNF , IL-6 y MMPs, centrales en el desarrollo de la sinovitis y de la destrucción articular con las que progresan la AR y la OA. De ahí que se haya propuesto que dichas

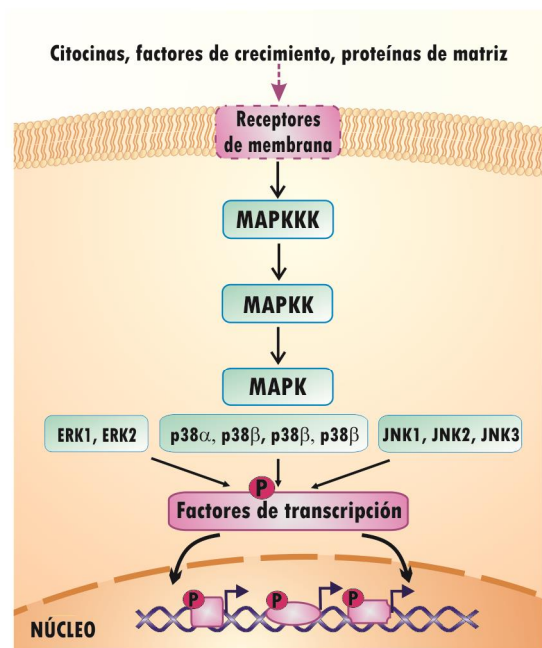


Figura 9. Esquema de la activación de la vía de las MAPK.

quinasas jueguen un papel importante en la patogénesis de ambas enfermedades reumáticas. De hecho, en la membrana sinovial de pacientes de AR y de OA, la expresión de JNK, ERK y p38 es constitutiva, siendo elevada la presencia de las formas fosforiladas en la AR (Guma y Firestein, 2012; Schett *et al.*, 2000). Asimismo, los FLS en cultivo expresan constitutivamente los tres tipos de MAPKs y se ha comprobado que tras la estimulación con TNF , otras citocinas proinflamatorias y ligandos de TLR, dichas quinasas fosforiladas son trasladadas al núcleo, siendo capaces de modificar la transcripción de diversos genes o la estabilidad de las moléculas de mRNA (Schett *et al.*, 2008; Han *et al.*, 1999).

La participación de la **MAPK p38** en el desarrollo de algunos de los **procesos patológicos** mediados por los FLS en la OA y la RA ha sido demostrada en diferentes trabajos. Así, la fosforilación de p38 es necesaria en la inducción de la síntesis de MMPs en FLS de OA estimulados con adiponectina y, en FLS de AR, regula la producción de IL-6 y CXCL8 en respuesta a IL-1 o TNF (Clark y Dean, 2012; Ehling *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2000). Además, se ha comprobado que la inhibición de p38, en modelos animales de artritis, resulta efectiva y que su bloqueo en células sinoviales en cultivo conlleva una disminución de la síntesis de citocinas. En FLS de AR también se describe que la activación de ERK, en respuesta a determinadas citocinas, participa en la regulación de la expresión de algunas MMPs, como MMP3, MMP1 y MMP9. (Pillinger *et al.*, 2003). Por otra parte, en el estudio de modelos murinos de artritis inflamatoria, **JNK** se muestra como un mediador en la producción de MMP1 inducida por citocinas y en la destrucción articular (Han *et al.*, 2001). La regulación de JNK depende específicamente de las quinasas **MKK4** y **MKK7**, habiéndose descrito en la membrana sinovial de AR una activación diferencial de ambas dependiente de estímulo (Sundarajan *et al.*, 2003). En este sentido, MKK7 se perfila como la principal responsable de la mayoría de las actividades proinflamatorias de las JNK tras la activación de los FLS por TNF , peptidoglicano y LPS como ligando de TLR4, mientras que en la respuesta al ácido poliinosínico-policitídílico (poly(I-C)), agonista sintético de TLR3, intervienen ambas MKKs (Yoshizawa *et al.*, 2008).

Las MAPKs constituyen, por tanto, una atractiva diana en el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear los mecanismos moleculares iniciales en el desarrollo de los procesos patológicos (Lindstrom y Robinson, 2010). Sin embargo, aunque en modelos animales de distintas enfermedades se ha demostrado la efectividad del empleo de inhibidores de MAPK, los ensayos clínicos con dichos compuestos revelan que, en líneas generales, presentan bastantes efectos adversos, ya que son importantes reguladoras de muchos procesos que permiten el mantenimiento de la homeostasis (Kytтары, 2012).

1.6.2. Vía del NF- B

Las proteínas que conforman la familia del NF- B son de expresión ubicua y aparecen implicadas en procesos de inflamación, supervivencia, proliferación y diferenciación celular. NF- B comprende un total de cinco proteínas: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- B1) y p52/p100 (NF- B2). Estas subunidades forman una serie de homodímeros y heterodímeros, cuya unión a la secuencia promotora es específica de estímulo y de tipo celular, siendo responsables, cada uno de ellos, de la regulación de un determinado conjunto de genes. Su activación es inducida por múltiples señales, como son citocinas (TNF , IL-1 , IL-17, etc), ligandos de PRRs, mitógenos (CD40L, BAFF,

etc), y elementos de estrés del ambiente celular (radiación ultravioleta, hipoxia, etc). En condiciones normales, los dímeros se encuentran en un estado inactivo en el citoplasma de las células, de manera que cuando son activados por diferentes mecanismos moleculares, se trasladan al núcleo. Esta activación puede seguir una *vía canónica* o completar otras rutas denominadas *atípicas*. En ambos procesos juega un papel importante la familia de las quinasas de las proteínas inhibidoras I B (IKKs), formada por 4 miembros: IKK α , IKK β , IKK γ y TBK1 (Luo *et al.*, 2005; Kaisho y Tanaka, 2008).

Entre los componentes del NF- κ B, se ha identificado a la pareja de factores integrada por **p65** y **p50** como la más prevalente y activa, cuyo paso al núcleo depende una ruta canónica de activación. En ausencia de estímulo, estos factores residen en el citoplasma formando complejos con **I κ B**. Su activación requiere de la fosforilación, ubiquitinización y posterior degradación de I κ B en el proteasoma, en un proceso en el que interviene un complejo multiprotéico que contiene dos proteínas quinasa, **IKK α** e **IKK β** , y una proteína reguladora denominada **NEMO**. Una vez que el dímero p65/p50 es liberado de su inhibidor, migra al núcleo y se une a las regiones promotoras de sus genes diana para regular su transcripción (Luo *et al.*, 2005).

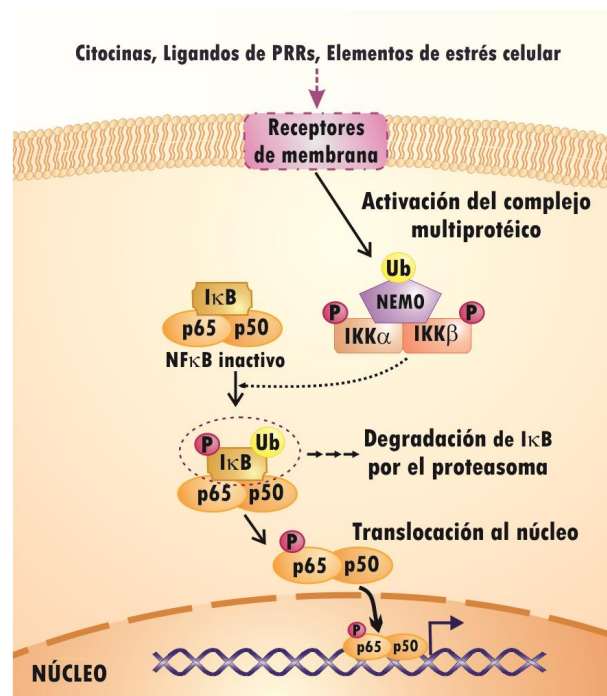


Figura 10. Esquema de la activación de la vía del NF- κ B p65/p50.

Los factores de transcripción NF- κ B controlan la expresión de diversos grupos de genes proinflamatorios como citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión, sintasas de prostaglandinas y óxido nítrico sintasas. De ahí que el aumento de la actividad de NF- κ B se haya relacionado con el desarrollo de **enfermedades inflamatorias crónicas** como son la AR y la OA (Thalhamer *et al.*, 2008; van Loo y Beyaert, 2011).

En las células de la capa íntima de la membrana sinovial de AR, y en menor cantidad en las de OA, se ha detectado la presencia de p50 y p65, habiéndose comprobado que la unión de NF- κ B a las secuencias promotoras es significativamente mayor en el tejido sinovial de AR que en el de OA (Benito *et al.*, 2004). En los FLS estimulados con IL-1 o TNF, se produce un movimiento inmediato de NF- κ B al núcleo, mediado por la activación del complejo de señalización IKK y que finaliza con la inducción de genes como IL-6, CXCL8, ICAM-1 y MMPs (Brown *et al.*, 2008). En dichas células, la expresión de IKK α e IKK β es constitutiva y su actividad quinasa puede incrementarse hasta diez veces tras la exposición a citocinas (Aupperle *et al.*, 2001), habiéndose comprobado que la ausencia

o la inhibición de IKK conlleva el bloqueo de NF- B y de la síntesis de citocinas, MMPs y moléculas de adhesión. Además, mediante estudios realizados con RNA de interferencia (siRNA), se ha demostrado que p50 y p65 son las subunidades de NF- B de mayor relevancia en síntesis de citocinas proinflamatorias por parte de los FLS (Simmonds y Foxwell, 2008).

La inhibición de la activación de NF- B constituye una de las estrategias propuestas en el control de la progresión de las enfermedades inflamatorias articulares. De hecho, se ha comprobado la efectividad en la disminución de la activación de NF- B de algunos de los fármacos que se emplean en el tratamiento de la OA y de la RA (Román-Blas y Jiménez, 2006). Sin embargo, el papel central que ocupa esta vía a nivel sistémico es incompatible con un bloqueo indiscriminado, de modo que, es necesario avanzar en el estudio de estrategias que permitan controlar su activación para devolverla a niveles homeostáticos (Ruland, 2011).

1.6.3. Vía de JAK/STAT

La vía de señalización JAK/STAT es empleada por muchas de las citocinas y de los mediadores locales que han sido implicados en el desarrollo de las enfermedades inflamatorias crónicas articulares. Así, a través de esta ruta señalizan citocinas como IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-22, IL-15, IFN y mediadores como PDGF o EGF. Los receptores de dichas moléculas están asociados de forma estable a las tirosinas quinasa citoplásmicas conocidas como Janus quinasa (**JAK**). Tras la unión del ligando correspondiente, las JAK fosforilan y activan a las **STAT** (transductores de señal y activadores de transcripción), proteínas localizadas en el citoplasma que, sólo tras ser activadas, forman homo/heterodímeros. Las STATs dimerizan a través de sus dominios SH₂ y se translocan al núcleo para regular la transcripción de determinados genes. Existen, además, tres familias de reguladores negativos de esta vía de señalización: PTPs (proteína tirosin fosfatasa),

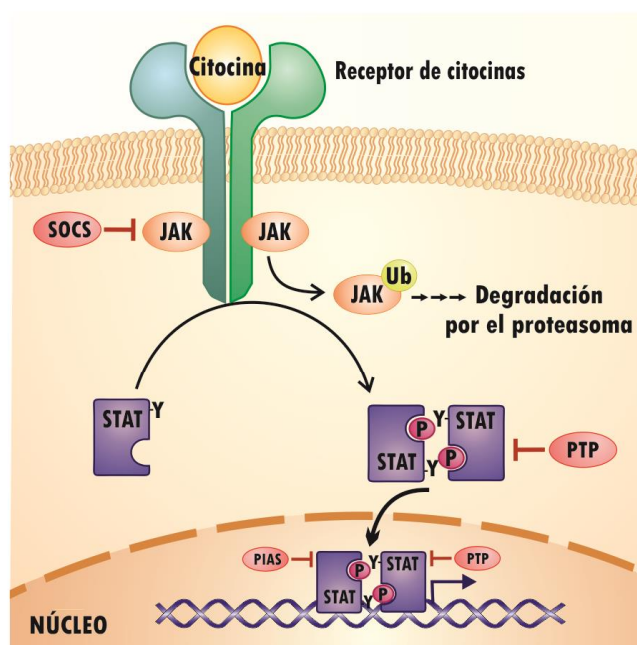


Figura 11. Esquema de la activación de la vía JAK/STAT.

SOCS (supresor de la señalización de citocinas) y PIAS (proteína inhibidora de STAT activadas). Cabe señalar que la vía de señalización JAK-STAT es considerada como la más directa entre las cascadas intracelulares que terminan en la modificación de la transcripción génica y se ha descrito su participación en la regulación de la activación, proliferación y diferenciación celular. Hasta la fecha, se conoce la existencia de 4 JAKs (JAK1-3 y Tyk2) y de 7 proteínas STAT (STAT 1-4, 5a, 5b y 6), que se activan de manera específica en función del tipo de receptor que desencadene el inicio

de la señalización (O'Shea *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2004; Laurence *et al.*, 2012; Kiu y Nicholson, 2012).

Tanto en el **tejido sinovial** de pacientes con AR, como en los de OA, se ha detectado una expresión de componentes de la vía de señalización JAK/STAT (Makarov, 2001). La presencia de dichos elementos es variable, habiéndose descrito que los niveles de **STAT1** fosforilado son superiores en las células sinoviales de AR que en las de OA, y que la localización principal de esta proteína es la capa íntima que contiene a las células activadas (van der Pouw Kraan *et al.*, 2003). Además, se ha sugerido que existe una implicación funcional de la vía JAK/STAT en el desarrollo de la AR, ya que en pacientes con AR sometidos a un tratamiento efectivo que reduce la actividad de la enfermedad, se registra un descenso en la expresión de **JAK3** y de **STAT1**, **STAT4** y **STAT6** en el tejido sinovial (Walker *et al.*, 2006). En este sentido, otros trabajos han demostrado que **STAT3** promueve la **supervivencia** de los FLS y que su activación, junto a la de STAT1, juega un importante papel en la **proliferación** de dicho tipo celular, dos procesos relacionados con la contribución del FLS a la hiperplasia patológica de la membrana sinovial (Yasukawa *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2002). Recientemente se ha confirmado que en FLS de AR, la activación de **JAK2/STAT3** es una de las rutas de señalización que emplea la IL-22 en la inducción de la **síntesis de RANKL**, importante mediador en la destrucción ósea articular (Kim *et al.*, 2012).

1.6.4. Factores de transcripción AP-1

La familia de factores de transcripción de la Proteína activadora 1 (AP-1) incluye a una serie de dímeros compuestos por miembros de las familias de proteínas **Jun** (c-Jun, Jun B, Jun D), **Fos** (c-fos, Fos B, Fra-1, Fra2) y del factor activador de transcripción (**ATF-1**, ATF-2 y ATF-3). Las proteínas Jun pueden formar homodímeros, mientras que Fos y ATF heterodimerizan para constituir dímeros estables y funcionales. Cada uno de estos dímeros, presenta una capacidad de unión específica a diferentes secuencias de DNA, regulando la expresión de genes implicados en múltiples procesos celulares como son la proliferación, diferenciación y apoptosis (Asahara *et al.*, 1997).

Distintos estudios han relacionado la actividad de AP-1 con la patogénesis de las enfermedades articulares, en las que además de intervenir en el proceso de osteoclastogénesis, se presenta como el factor de transcripción principal en la regulación de la síntesis de MMPs por los FLS (Zenz *et al.*, 2008).

En la **membrana sinovial** de AR, y en menor medida en OA, se detectan niveles elevados de los componentes de **AP-1**, **c-Fos** y **c-Jun**, tanto en la capa íntima como en la subíntima. La unión de dichos factores de transcripción al DNA es mayor en AR, localizándose principalmente en la capa íntima, donde también se observa una elevada presencia de MMPs. Así, se ha comprobado que la estimulación de FLS en cultivo con IL-1 o TNF, conlleva un aumento de los transcritos de MMPs que aparece asociado a un incremento de la unión de AP-1 al promotor y de su actividad transcripcional, siendo c-Fos y c-Jun los principales componentes de los dímeros activos (Shiozawa y Tsumiyama, 2009; Shiozawa *et al.*, 2011). La fosforilación de c-Jun, tras la activación de los FLS por citocinas, está mediada por las MAPKs, dependiendo especialmente de JNK. De hecho, se ha comprobado que en sinoviocitos en los que dicha quinasa está ausente o bloqueada, se produce un descenso de la expresión de **MMP3** respecto del control (Han *et al.*, 2001). Además, en el modelo

murino de CIA se ha descrito que el bloqueo de factores de transcripción de AP-1 conlleva un descenso de la severidad de la patología y una reducción en la síntesis de **citocinas inflamatorias** y MMPs. De modo que los datos obtenidos sugieren que este factor de transcripción participa en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas articulares (Shiozawa *et al.*, 2011; Aikawa *et al.*, 2008).

1.6.5. Factores de transcripción IRFs

Los factores reguladores de interferón (**IRF**, interferon regulatory factor) constituyen una familia de factores de transcripción en la que se han identificado 9 componentes, desde IRF1 a IRF9, que comparten un dominio de unión capaz de reconocer una secuencia consenso de DNA conocida como **ISRE** (regiones de respuesta al IFN). Dicha secuencia se localiza en las regiones de los promotores que regulan la expresión de los denominados genes inducibles por interferón (**ISGs**), que codifican moléculas efectoras como son interferones (IFNs) de tipo I, IL-12 o CXCL10/IP-10 (Santana-de Anda *et al.*, 2011).

La familia de los **IFNs de tipo I** incluye al IFN α y a múltiples subtipos de IFN β , los cuales resultan esenciales en el control de la respuesta inmunitaria de diferentes tipos celulares, como son células dendríticas, macrófagos, células epiteliales o fibroblastos (Génin *et al.*, 2009). Además de inducir la maduración de las células dendríticas y la presentación de antígenos vía el MHC de clase I, también potencian la producción de quimiocinas implicadas en el reclutamiento de linfocitos y la expresión de los citados ISGs que codifican moléculas que intervienen en los procesos de síntesis de proteínas, crecimiento celular o apoptosis (Der *et al.*, 1998). La alteración de los mecanismos de regulación de los IRFs se ha asociado con el desarrollo de enfermedades autoinmunes, como son el lupus eritematoso sistémico (LES), la diabetes mellitus dependiente de insulina o la AR (Theofilopoulos *et al.*, 2005; Baccala *et al.*, 2007; Hammaker *et al.*, 2012).

Concretamente se ha comprobado que, tanto en la AR como en la OA, la expresión de **IRF3** en la membrana sinovial es constitutiva, encontrándose una mayor presencia de la forma fosforilada en la sinovial de AR, donde también se detecta una de las quinasas capaces de fosforilar a esta molécula, la IKK (Sweeney *et al.*, 2007). En los FLS, la estimulación de TLR3 conlleva una inmediata activación del complejo de quinasas IKK γ y TBK1, las cuales fosforilan a **IRF3** e **IRF7**, permitiendo su dimerización y paso al núcleo. En cooperación con otros factores de transcripción, como ATF2/c-Jun, dichos IRFs promueven la transcripción de múltiples genes, entre los que se incluyen citocinas proinflamatorias e **IFN α** (Hammaker *et al.*, 2012; Sweeney *et al.*, 2010). En FLS de AR se ha descrito que el IFN α puede unirse de manera autocrina a su receptor IFN α R, iniciando una cascada de señalización que induce la síntesis de genes de respuesta secundarios dependientes de IFN α como IP-10 e IFN γ . A su vez, IP-10 es capaz de activar a los propios FLS mediante su unión al receptor CXCR3, de expresión constitutiva (Hammaker *et al.*, 2012; García-Vicuña *et al.*, 2004).

1.7. Estrategias terapéuticas en el tratamiento de la AR y la OA

En la actualidad, las terapias disponibles para el **tratamiento de la AR** están dirigidas a aliviar la sintomatología, fundamentalmente el dolor, frenar la inflamación sinovial crónica y prevenir las lesiones osteocartilaginosas articulares (Pablos Álvarez *et al.*, 2006). Los fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (**DMARDs**, Disease Modifying Antirheumatic Drugs) son la primera opción en el tratamiento de la AR, siendo empleados principalmente el metotrexato, la leflunomida y la sulfasalazina. Este grupo heterogéneo de compuestos, cuyo mecanismo de acción exacto no ha sido determinado, además de reducir el dolor y la inflamación, consiguen disminuir los marcadores de fase aguda y limitar la progresión del daño articular. Sin embargo, no todos los pacientes responden al tratamiento con DMARDs y, tras su administración, continúan progresando la inflamación y la destrucción de las estructuras articulares (Scott *et al.*, 2012).

Tabla 1. Principales agentes biológicos empleados en el tratamiento de la AR.

DIANA TERAPÉUTICA	FÁRMACO	TIPO DE AGENTE BIOLÓGICO	MECANISMO DE ACCIÓN
TNF	Infliximab	Anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico humano/murino.	Se une con alta afinidad a la forma soluble y transmembrana del TNF, inhibiendo su actividad.
	Adalimumab	Anticuerpo monoclonal humano recombinante.	Se une específicamente al TNF y neutraliza su función biológica, bloqueando su interacción con los receptores p55 y p75 del TNF.
	Golimumab	Anticuerpo monoclonal IgG1 humano.	Forma complejos estables de gran afinidad con la forma soluble y la transmembrana del TNF. Impide la unión de TNF a sus receptores.
	Etanercept	Proteína de fusión dimérica compuesta por el receptor p75 del TNF y la porción Fc de la IgG1 humana.	Inhibición competitiva de la unión del TNF a su receptor de la superficie celular.
	Certolizumab pegol	Fragmento Fab' de un anticuerpo humanizado recombinante anti-TNF conjugado con dos moléculas de polietilenglicol.	Reconoce y neutraliza específicamente al TNF humano, tanto su forma soluble como la unida a membrana.
Receptor IL-6	Tocilizumab	Anticuerpo monoclonal IgG1 recombinante humanizado anti receptor IL-6 humana.	Se une específicamente a los receptores de IL-6.
Células B CD20⁺	Rituximab	Anticuerpo monoclonal IgG1 quimérico murino/humano.	La porción murina le confiere la especificidad para unirse a las células CD20+. La parte de origen humano puede reclutar efectores de la respuesta inmune para mediar la lisis de las células B.
Coestimulación células T CD28/B7	Abatacept	Proteína de fusión que combina la porción extracelular de CTLA4 humano y la porción Fc de IgG1.	Es un receptor que se une a los miembros de la familia B7 con mayor afinidad que el CD28, bloqueando la segunda señal necesaria para la activación de los linfocitos T.
Receptor IL-1	Anakinra	Análogo estructural del antagonista del receptor IL-1 e IL-1.	Neutraliza la actividad biológica de IL-1 e IL-1 al inhibir, por mecanismos competitivos, su unión al receptor de tipo I de la IL-1.

El avance en el conocimiento de las bases celulares y moleculares de la AR ha permitido que se hayan desarrollado los denominados **agentes biológicos**, compuestos capaces de actuar específicamente sobre las células o los mediadores implicados en la patogenia de dicha enfermedad (Davis *et al.*, 2012).

Los diferentes agentes biológicos aprobados para el tratamiento de aquellos pacientes de AR con una respuesta inadecuada a los DMARDs, están diseñados para bloquear la acción de citocinas inflamatorias, principalmente de TNF pero también de IL-6 e IL-1, para impedir la coestimulación de las células T o para inhibir la actividad de las células B (Tabla 1).

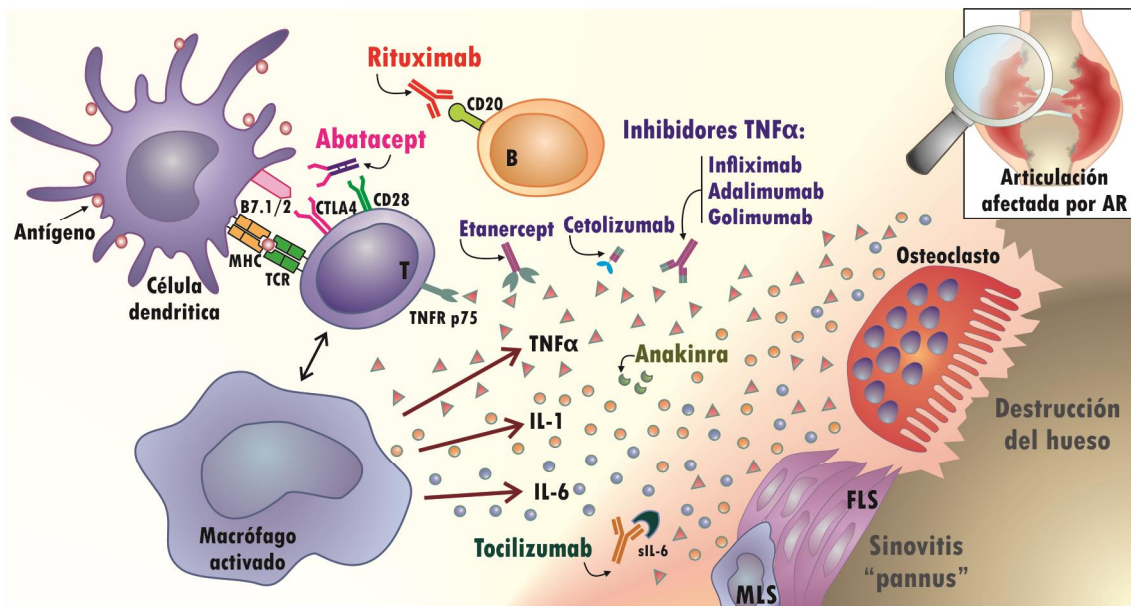


Figura 12. Esquema de los agentes biológicos empleados en el tratamiento de la AR.

La eficacia de dichas terapias, que consiguen reducir la sintomatología y la progresión radiológica del daño articular, evidencia la participación de las citocinas proinflamatorias citadas y de las células B y T en los procesos patogénicos de esta enfermedad reumática. Asimismo, la variabilidad en la respuesta clínica a los diferentes agentes biológicos, pone de manifiesto la heterogeneidad de los factores que determinan la aparición y progresión de AR, sugiriendo que no existe un único mecanismo patogénico común a todos los pacientes de esta enfermedad (Scott, 2012).

En cuanto a los objetivos terapéuticos del **tratamiento de la OA** (antiinflamatorios no esteroides (AINEs), como paracetamol, y derivados opiáceos), cabe señalar que la mayoría de las terapias están enfocadas a **contrarrestar** sus **síntomas**, principalmente el dolor y la inflamación, siendo escasos los fármacos comercializados capaces de actuar a nivel de destrucción articular (Cheng *et al.*, 2012). En nuestro país, los únicos compuestos disponibles que ejercen efectos sobre el proceso degenerativo son la glucosamina, el condroitín sulfato y la diacereína, habiéndose descrito una eficacia moderada para éstos en los ensayos clínicos realizados. De modo que continúan realizándose numerosos estudios centrados en investigar la efectividad de intervenir terapéuticamente a nivel de diferentes mediadores implicados en la progresión de la OA. Se han desarrollado inhibidores de MMPs y de agreganasas, terapias anti-citocinas, y compuestos capaces

de contrarrestar el exceso de los procesos de estrés oxidativo, sin que por el momento se hayan obtenido resultados concluyentes en la práctica clínica (Burrage y Brinckerhoff, 2007; Calich *et al.*, 2010; Román-Blas *et al.*, 2009).

Por otra parte, a nivel molecular, se ha considerado el desarrollo de terapias dirigidas a controlar la actividad de las **vías de señalización** que regulan la síntesis de mediadores implicados en la respuesta inflamatoria, como son las vías MAPK, NF- κ B o JAK/STAT (Thalhammer *et al.*, 2008; Yazici y Regens, 2011; Ruland, 2011). Sin embargo, las terapias de *inhibición* no constituyen tratamientos eficaces para ninguna de las dos patologías, ya que cuentan con obstáculos de especificidad, seguridad y efectos colaterales, derivados de la compleja red de señalización que establecen estas proteínas y de su implicación en múltiples funciones y procesos de la fisiología celular.

Por tanto, a pesar del avance que se ha experimentado en el tratamiento de ambas enfermedades reumáticas, las terapias actuales presentan una **eficacia parcial** y considerables **efectos secundarios**, además de suponer un elevado coste económico. De modo que sigue siendo necesaria la identificación de **nuevas dianas terapéuticas**, así como la optimización de las estrategias diseñadas frente a las ya conocidas.

1.8. Péptido Intestinal Vasoactivo. Mediador neuroinmune

1.8.1. Neuroinmunomodulación

La complejidad funcional adquirida por los organismos a lo largo de la evolución ha supuesto el desarrollo de un conjunto de sistemas fisiológicos que permiten coordinar las diferentes funciones biológicas y las respuestas frente a las variaciones del medio externo. El **sistema neuroendocrino** ha sido relacionado clásicamente con las respuestas a estímulos externos como la temperatura, el dolor o el estrés, mientras que el **sistema inmune** se asociaba con los procesos que se desencadenan frente a bacterias, virus o daños tisulares. Actualmente, se considera que ambos sistemas no constituyen entidades independientes, sino que contribuyen de una manera integrada a mantener la **homeostasis** del organismo, existiendo entre ellos una **comunicación bidireccional** a través de un circuito de mediadores y receptores comunes (Goetzl y Sreedharan, 1992; Weigent y Blalock, 1995). El estudio de este tipo de interacciones representa un área de investigación de gran interés, a la que, en 1987, N.H. Spector denominó **Neuroinmunomodulación**. Sin embargo, este término acuñado en el siglo XX, formalizaba un concepto presente en las experiencias relatadas por filósofos y observadores del Antiguo Egipto, Grecia, China, India y otras civilizaciones, en las que se considera que la mente está implicada en la defensa contra las enfermedades. De hecho, Aristóteles ya había apuntado esta idea en las siguientes palabras: "La psique (alma) y el cuerpo reaccionan complementariamente una con otro, según mi entender. Un cambio en el estado de la psique produce un cambio en la estructura del cuerpo, y a la inversa, un cambio en el estado del cuerpo produce un cambio en la estructura de la psique" (Spector, 1987, 1996).

Más de veinte años de estudio en esta área han generado multitud de trabajos en los que se evidencia la **interconexión** que existe entre los sistemas inmune y neuroendocrino. Uno de los ejemplos que mejor ilustra el concepto de comunicación neuroinmune es el hecho de que diferentes estímulos estresantes actúen induciendo la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), que

conduce a la secreción de glucocorticoides y, consiguientemente, a una inmunosupresión asociada al aumento de la susceptibilidad frente a infecciones (Black, 2002; Webster *et al.*, 2002).

La investigación de las **bases moleculares** de la neuroinmunomodulación ha demostrado que los productos del sistema endocrino y neuroinmune coexisten en los tejidos linfoides, endocrino y nervioso, detectándose en ellos, indistintamente, la presencia de mediadores como citocinas, hormonas o neuropéptidos y de sus respectivos receptores. Por otra parte, al igual que el sistema nervioso central puede inducir la liberación de glucocorticoides o norepinefrina en situaciones de estrés y provocar una inmunosupresión, también se ha comprobado que, como respuesta a los estímulos inflamatorios en las terminaciones periféricas de los nervios eferentes y sensoriales próximos a las células inmunes, puede producirse la liberación de diferentes **neuropéptidos** con propiedades inmunomoduladoras (Besedovsky y del Rey, 1996; Weigent *et al.*, 1990)

De modo que las interacciones específicas que se establecen entre los sistemas endocrino, nervioso e inmune permiten que se establezca una comunicación bidireccional entre una situación patológica local y el resto del organismo. Este tipo de interacciones se encuentran implicadas en procesos patológicos a nivel local, como es la sinovitis que aparece en las articulaciones afectadas por AR (Cutolo *et al.*, 2007; Jara *et al.*, 2006).

Desde que se descubrió el efecto antiinflamatorio del cortisol en la AR y que la hemiplegia conlleva una reducción de la sintomatología en los miembros paréticos afectados por la AR, en el estudio de la fisiopatología de esta enfermedad se ha contemplado la participación de la neuroinmunomodulación. En las células de la membrana sinovial se ha detectado la presencia de receptores funcionales de glucocorticoides, andrógenos y estrógenos, lo cual es compatible con la existencia de una conexión entre el sistema endocrino y la inflamación articular (Cutolo *et al.*, 2007; Jara *et al.*, 2006). Por otra parte, también se ha observado que cuando la sinovitis se encuentra en fase crónica, se produce una alteración del sistema nervioso periférico en el tejido sinovial inflamado, ya que se registra una pérdida de la inervación simpática al mismo tiempo que se produce una profusión de fibras sensoriales. El aumento relativo de este último tipo de fibras nerviosas implica una mayor liberación de neuropéptidos, como la sustancia P, cuyos efectos potencian el componente inflamatorio (Mapp *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 2000; Koopman *et al.*, 2011).

En los últimos años, algunos de los neuropéptidos que actúan como **mediadores neuroinmunomoduladores** a nivel sistémico y local, entre los que se incluye el péptido intestinal vasoactivo (VIP), han emergido como potenciales candidatos en el restablecimiento de la homeostasis alterada en los procesos inflamatorios y autoinmunes (Sterberg, 2006; Souza-Moreira *et al.*, 2011).

1.8.2. Péptido intestinal vasoactivo (VIP)

A finales de la década de los 60, Sami Said describió la existencia de un agente vasoactivo de naturaleza peptídica en el pulmón de mamíferos con efectos vasodilatadores a nivel sistémico. En 1969, en colaboración con Víctor Mutt, conseguía extraer y purificar parcialmente dicho péptido a partir de pulmón porcino. Sin embargo, condicionados por las dificultades técnicas que encontraron en su aislamiento a partir de tejido pulmonar, intentaron detectarlo en intestino delgado, al considerar que el origen embrionario de éste es común al de los pulmones. Finalmente, en 1970, **Said y Mutt**

aislaron, en **tejido duodenal porcino**, un péptido vasodilatador al que denominaron **Péptido Intestinal Vasoactivo** (Said y Mutt, 1970).

Tras su descripción, la presencia de VIP fue identificada en el sistema nervioso central y en el periférico, siendo definido como un **neuropéptido** con actividad neurotransmisora y neuromoduladora (Vaudry y Laburthe, 2006). Posteriormente, se demostró que este péptido también se localiza en el sistema inmunológico y que presenta una serie de propiedades inmunomoduladoras (Gomariz *et al.*, 2001).

VIP es un péptido con una amplia distribución que está presente en multitud de órganos y tejidos, actuando como **neurotransmisor**, **inmunoregulador**, **vasodilatador** y **estimulador de la secreción de hormonas** (Delgado y Ganea, 2011). Así, se encuentra implicado en una gran variedad de actividades fisiológicas relacionadas con el desarrollo, crecimiento, cáncer, respuesta inmune, control de células neuronales y endocrinas, ritmos circadianos y con los sistemas digestivo, respiratorio, reproductor y cardiovascular (Couvineau y Laburthe, 2012) resumidas en la Tabla 2.

La **síntesis de VIP** ha sido detectada en **neuronas** de diferentes áreas del sistema nervioso central y periférico y en **células endocrinas**, tales como los lactotrofos pituitarios y las células del páncreas endocrino (Davidson *et al.*, 1996). La última aportación descrita de VIP al eje neuro-endocrino-inmune fue la demostración de su presencia en el **sistema inmune**, ya sea en las terminaciones nerviosas o en células inflamatorias e inmunes, como mastocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos (Gomariz *et al.*, 2001, 2006). En este sentido, cabe señalar que nuestro grupo describió, en 1990, la síntesis y secreción de VIP en linfocitos T y B y que su secreción se produce en respuesta a estimulación con agentes que inducen inflamación, apoptosis y activación antigénica, habiéndose comprobado que los linfocitos Th2, pero no los Th1, sintetizan y liberan VIP, una vez activados por el TCR (Martínez *et al.*, 1999; Delgado y Ganea, 2001).

Tabla 2. Actividades biológicas de VIP

ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE VIP			
SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	EFECTOS GENERALES	Acción hipnótica	Riou <i>et al.</i> , 1981
		Hipertermia	Said, 1986
		Regula metabolismo del glucógeno	Sorg y Magistretti, 1992
		Efecto analgésico	Haghjoo <i>et al.</i> , 1996
		Implicado en el desarrollo del cerebro durante embriogénesis	Moody <i>et al.</i> , 2003
	SOBRE EL HIPOTÁLAMO	Estimula la producción de prolactina	Vijayan <i>et al.</i> , 1979 Reichlin, 1988
		Modula la liberación de GABA	Reed <i>et al.</i> , 2002
		Implicado en el mantenimiento de los ritmos circadianos	Harmar <i>et al.</i> , 2003
		Regula la transmisión sináptica en el núcleo supraquiasmático	Itri y Colwell, 2003
		Efecto anorexigénico	Tachibana <i>et al.</i> , 2004
	SOBRE EL COMPORTAMIENTO	Influye en los procesos de memoria y aprendizaje	Glowa <i>et al.</i> , 1992 Ivanova <i>et al.</i> , 2012
	EFECTOS NEUROTRÓFICOS	Estimula proliferación, diferenciación y supervivencia	Brenneman y Eiden, 1986 Pincus <i>et al.</i> , 1994
		Estimula desarrollo de neuritas	Pincus <i>et al.</i> , 1990
		Disminuye la apoptosis neuronal	Moody <i>et al.</i> , 2003
		Neuroprotector en patologías inflamatorias	Delgado y Ganea, 2003
		Protege de la neurodegeneración, inhibiendo la activación de la microglía	Delgado <i>et al.</i> , 2008b
		Inhibe la expresión de COX-2 en macrófagos, microglía y DCs	González-Rey y Delgado, 2008
		Induce neuroprotección en el desarrollo cerebral	Passemard <i>et al.</i> , 2011
	SOBRE LA HIPÓFISIS	Estimula la producción de hormona del crecimiento	Vijayan <i>et al.</i> , 1979
Estimula la producción de hormona luteinizante		Vijayan <i>et al.</i> , 1979	
Estimula la producción de hormona adrenocorticotropa		Oliva <i>et al.</i> , 1982	
Acción autocrina/ paracrina sobre la hiperplasia inducida por estrógenos		Gómez y Balsa, 2003	
SOBRE LA GLÁNDULA TIROIDEA	Estimula la secreción de hormonas tiroideas	Ahren <i>et al.</i> , 1980	
SOBRE LA GLÁNDULA SUPRARRENAL	Estimula la producción de catecolaminas	Malhotra <i>et al.</i> , 1988	
SOBRE EL RIÑÓN	Estimula la adenilato ciclasa a nivel cortical	Charlton <i>et al.</i> , 1991	
SOBRE EL PÁNCREAS	Estimula la producción de fluido alcalino	Jensen <i>et al.</i> , 1978	
	Reduce el estrés oxidativo en células del acino pancreático	Fujimori <i>et al.</i> , 2011	
SOBRE EL APARATO REPRODUCTOR	Estimula esteroidogénesis en el ovario	Ottesen y Fahrenkrug, 1995	
	Estimula esteroidogénesis en el testículo	El-Gehani <i>et al.</i> , 1998	
	Estimula erección del pene	Hedlung <i>et al.</i> , 1995 Fahrenkrug, 2001	
	Estimula la relajación de la musculatura lisa y la vasodilatación	Houdeau <i>et al.</i> , 1998	
	Estimula la proliferación de células epiteliales prostáticas	Juarranz <i>et al.</i> , 2001	

SOBRE EL TRACTO GASTROINTESTINAL	Estimula la relajación de la musculatura lisa	Said y Mutt, 1970	
	Estimula la secreción de intestino grueso y delgado	Dockray, 1994	
	Disminuye la motilidad gástrica e intestinal	Olsson y Holmgren, 2001	
SOBRE EL SISTEMA RESPIRATORIO	Potente relajante de la musculatura lisa	Palmer <i>et al.</i> , 1986	
	Dilatación de vasos sanguíneos	Laitinen <i>et al.</i> , 1987	
	Actúa como neurotransmisor no-adrenérgico/no-colinérgico	Widdicombe, 1998	
	Inhibe la liberación de mediadores de mastocitos y basófilos	Bousquet <i>et al.</i> , 2000	
	Estimula o inhibe glándulas mucosas	Groneberg <i>et al.</i> , 2001	
	Estimula el transporte de iones en el epitelio		
	Estimula la proliferación en células del epitelio bronquial	Guan <i>et al.</i> , 2009	
	Regula el transporte a través de CFRT en epitelio nasal y bronquial	Rafferty <i>et al.</i> , 2009; Qu <i>et al.</i> , 2011	
	Implicado en el balance oxidante/antioxidante endógeno en patologías inflamatorias como el asma	Szema <i>et al.</i> , 2011	
	Protege el epitelio alveolar del daño por hiperoxia	Ao <i>et al.</i> , 2011	
	SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR	Regula el tono vasomotor normal	Brum <i>et al.</i> , 1986
		Efecto inotrópico	Unverferth <i>et al.</i> , 1985; Colston y Freeman, 1992
Estimula la vasodilatación (mayor en arterias que en venas)		Luu <i>et al.</i> , 1993	
Estimula la contracción y relajación de miocitos (estimulando el ritmo cardiaco)		Feliciano y Henning, 1998	
Aumenta el consumo de oxígeno del miocardio		Henning y Sawmiller, 2001	
SOBRE TEJIDO ÓSEO	Estimula el metabolismo en osteoblastos	Lundberg <i>et al.</i> , 1999	
	Disminuye la reabsorción ósea por osteoclastos	Lundberg <i>et al.</i> , 2000	
SOBRE MÉDULA ÓSEA	Inhibe la proliferación de las células progenitoras	Rameshwar <i>et al.</i> , 2002	
SOBRE LA PIEL	Estimula la proliferación de los queratinocitos	Granoth <i>et al.</i> , 2000	
SOBRE TEJIDO ADIPOSO	Efecto lipolítico	Akesson <i>et al.</i> , 2005	
SOBRE LA CÓRNEA	Protege al endotelio frente al daño por estrés oxidativo agudo	Koh y Waschek, 2000	
	Induce un aumento de p-CREB y de la expresión de Bcl-2 y de N-cadherina en células endoteliales	Koh <i>et al.</i> , 2008, 2009, 2011	
	Aumenta la integridad de explantes corneoesclerales	Koh <i>et al.</i> , 2011	
SOBRE CÉLULAS TUMORALES	Estimula crecimiento en neuroblastoma y en tumores de pulmón y páncreas	Pincus <i>et al.</i> , 1990 Moody <i>et al.</i> , 1993 Jiang <i>et al.</i> , 1997	
	Inhibe crecimiento en líneas de cáncer de colon	Gamet <i>et al.</i> , 1992	
	Estimula la expresión de c-Fos, c-Jun y c-Myc en células de cáncer de pulmón	Casibang <i>et al.</i> , 2001	
	Inhibe apoptosis en la línea de cáncer prostático PC-3	Gutiérrez-Cañas <i>et al.</i> , 2003	
	Induce la diferenciación neuroendocrina en la línea LNCaP de cáncer prostático	Gutiérrez-Cañas <i>et al.</i> , 2005	
	Regula la proliferación de las células de cáncer gástrico	Li <i>et al.</i> , 2007	
	Disminuye la proliferación celular en carcinoma hepático	Absood <i>et al.</i> , 2008	
	Induce la transformación maligna de la línea RWPE-1 de cáncer prostático	Fernández-Martínez <i>et al.</i> , 2010	

1.8.2.1. Estructura bioquímica de VIP

VIP pertenece a una gran familia de péptidos relacionados estructuralmente y altamente conservados en la escala evolutiva en la que también se incluyen el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria 27 y 38 (PACAP27 y PACAP38), helodermina, péptido histidina-metionina (PHM, en humanos) o péptido histidina-isoleucina (PHI, en otros mamíferos), secretina, factor liberador de la hormona de crecimiento (GRF), glucagón, péptidos relacionados con el glucagón 1 y 2 (GLP1 y GLP2) y el péptido inhibidor gástrico (GIP) (Couvineau y Laburthe, 2012).

Este conjunto de péptidos presenta una elevada **homología estructural**, compartiendo las siguientes propiedades (Tan y Waschek, 2011):

- Longitud comprendida entre 27 y 44 residuos de aminoácidos.
- Sintetizados y secretados por células endocrinas, neuronas y/o células del sistema inmune.
- Configuración de hélice de la secuencia incluida desde el residuo 6 hasta el extremo carboxilo terminal.
- Extremo amino terminal desestructurado.
- Presencia de un motivo estructural común en el dominio amino terminal conocido como N-Cap. Dicho dominio ha sido implicado en la activación de los receptores que reconocen a los componentes de esta familia de péptidos, habiéndose sugerido su utilidad en el diseño de compuestos farmacológicos (Neumann *et al.*, 2008).

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Longitud aa
VIP	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSILN	28
PACAP27	HSDGIFTDSYSRYRQKMAVKKYLAAVL	27
PACAP28	HSDGIFTDSYSRYRQKMAVKKYLAAVLGKRIKQRVKNK	38
Helodermina	HSDAIFTEEYSKLLAKLALQKYLASILGSRTPPP	35
PHM	HADGVFTSDFS KLLGQLSAKKYLESIM	27
Secretina	HSDGTFTSELSRLREGARLQRLIQGLV	27
GRF	YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRQQGESNQERGARARL	44
Glucagón	HSQGTFTSDYSKYLDSTRRAQDFVQWLMNT	29
GLP-1	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR	30
GLP-2	HADGSFSDEMTILDNLAARDFINWLIQTKITD	33
GIP	YAEGTFISDYSIAMDKIHQDFVNWLLAQKGGKNDWKHNITQ	42

Figura 13. Comparación de las secuencias de aminoácidos de VIP y otros miembros de su familia. La homología en la secuencia aparece marcada con color morado y la identidad en la secuencia con color rosa.

En base a la semejanza de las secuencias de los péptidos de esta familia, se ha propuesto un origen evolutivo común para sus componentes, en el que a partir de un mismo gen ancestral y mediante procesos de duplicación génica y mutaciones, se habrían generado las secuencias codificantes finales de los diferentes péptidos (Sherwood, *et al.*, 2000). Recientemente, un análisis filogenético ha confirmado y demostrado que, para Agnatos, los ligandos VIP/PACAP presentan un

alta conservación de su secuencia, hecho que reafirma su gran relevancia funcional en la escala de Vertebrados (Ng *et al.*, 2012).

La **estructura primaria** de VIP consta de una única cadena de 28 aminoácidos con un peso molecular de 3.326 Da, presenta carácter anfipático y naturaleza básica. En solución acuosa, se pliega al azar y es susceptible de sufrir hidrólisis espontánea y digestión por proteasas, mientras que en presencia de lípidos y solventes orgánicos, adquiere una estructura secundaria óptima para la interacción con sus receptores (Nicole *et al.*, 2000a,b; Filizola *et al.*, 1997; Krishnadas *et al.*, 2003). Su estructura tridimensional es similar a la de otros miembros de la familia, especialmente a la de **PACAP27**, con el que comparte un 68% de homología en su secuencia y una afinidad equivalente por sus receptores (Gronenborn *et al.*, 1987; Wray *et al.*, 1993).

La **secuencia de aminoácidos** de VIP se encuentra filogenéticamente muy conservada en la escala evolutiva de vertebrados, presentando la misma estructura, salvo alguna excepción, en los mamíferos comunes estudiados, que difiere tan sólo en 4 ó 5 aminoácidos de la de otros grupos como en anfibios anuros o peces (Ibrahim *et al.*, 2011). Mediante estudios de sustitución de diferentes aminoácidos de VIP se ha observado que, si bien es necesaria la presencia de todos para que pueda desempeñar el total de sus funciones biológicas, los residuos His¹, Val⁵, Arg¹⁴, Lis¹⁵, Lis²¹, Leu²³ e Ile²⁶ se presentan como cruciales para desarrollar dichas actividades, sin resultar esenciales para el mantenimiento de la estructura secundaria (Nicole *et al.*, 2000a).

1.8.2.2. El gen de VIP, su regulación y traducción

El gen de VIP humano se encuentra localizado en la región q24 del cromosoma 6 y consta de 8837 pb que se organizan en 6 intrones y 7 exones, cada uno de los cuales codifica un dominio funcional diferente, detallados a continuación: (Bodner *et al.*, 1985; Tsukada *et al.*, 1985; Gozes *et al.*, 1986).

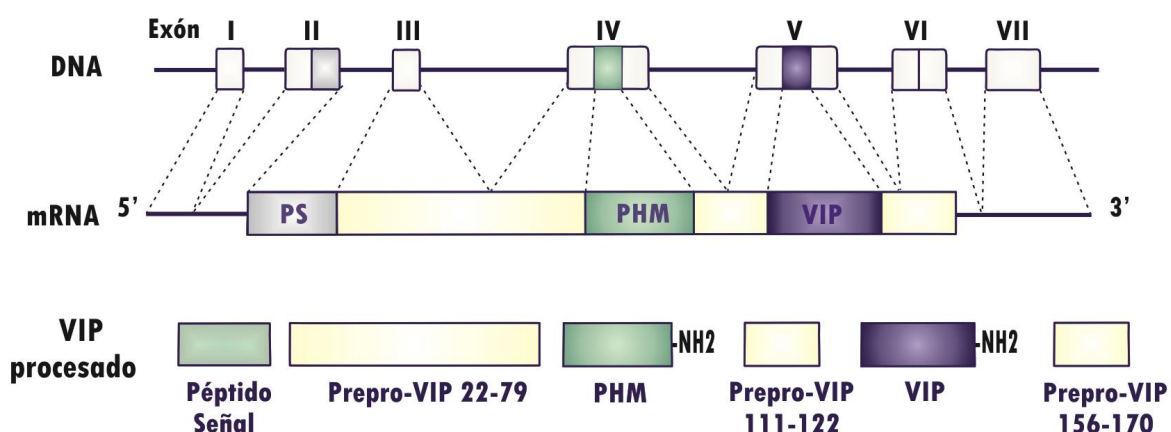


Figura 14. Estructura del gen de VIP. Organización en exones del DNA, correspondencia con el mRNA y los distintos péptidos tras su procesamiento.

Exón 1: consta de 165 pb, codifica la región 5' no traducida del mRNA.

Exón 2: consta de 117 pb, codifica el péptido señal.

Exón 3: consta de 123 pb, codifica el extremo amino terminal del péptido.

Exón 4: consta de 105 pb, codifica el PHM.

Exón 5: consta de 132 pb, codifica el VIP.

Exón 6: consta de 89 pb, codifica el extremo carboxilo terminal.

Exón 7: consta de 723 pb, codifica la región 3' no traducida del mRNA.

La **expresión génica** de VIP se encuentra controlada por una serie de secuencias localizadas en su región 5' altamente conservadas en humano, rata y ratón. Así, se han identificado los siguientes **elementos reguladores**:

- Secuencias reguladoras localizadas entre -5.2 y -2.5 kb. En la región A, en posición -4,3kb del origen de transcripción, aparece un elemento regulador de la expresión específica de tejido (TSE) de 425 pb que contiene secuencias consenso octaméricas ATGCAAAT y es indispensable para activar la transcripción génica tras su unión a proteínas como Oct-1 y Oct-2 (Liu *et al.*, 2001; Hahm y Eiden, 1998a,b). También se identifica la presencia de un elemento AP-1/*ets* estimulador de la transcripción y un elemento silenciador VSE-1 localizados a -4.4 / -4.2 kb del origen de transcripción (Liu *et al.*, 2001).
- Un elemento de respuesta a PMA (acetato de forbol miristato) de 7 nucleótidos y secuencia TGACTCA, situado a -2.25 kb del origen de transcripción (Liu *et al.*, 2001).
- Tres regiones consecutivas: región B (-1.55 a -1.37kb), región C (-1.37 a -1.28kb) y región D (1.28 a -0.94 kb). La región B contiene cajas E o hexámeros (CACCTG y CATGTG) y las regiones C y D contienen elementos represores (Hahm y Eiden, 1998a,b).
- Un elemento de 17 nucleótidos, situado a -100 pb del origen de transcripción, de respuesta a AMPc con dos dominios CGTCA invertidos (elemento CRE) (Fink *et al.*, 1991).
- Una secuencia de 180 pb, localizada a -1.33 kb en la región 5' en el promotor, denominada elemento CyRE que está implicado en la regulación por citocinas y presenta un sitio de unión para los factores de transcripción STAT y AP-1 (Symes *et al.*, 1994, 1997; Sena *et al.*, 1994; Rajan *et al.*, 1996).

Por otra parte, también existen mecanismos de **regulación postranscripcional** de VIP, resultando clave para su expresión la estabilización del mRNA. Así, en la región 3' no traducida de estas moléculas, aparecen tres motivos AUUUA ó secuencias desestabilizadoras que pueden interaccionar con proteínas citoplásmicas y formar complejos que desestabilizan el RNA (Wolford y Signs, 1995). El mRNA también puede presentar colas de adenina de diferente tamaño que modifican la estabilidad del transcrito (Sachs y Wahle, 1993).

Tras la transcripción y traducción del gen de VIP, se obtiene una **molécula precursora** de elevado peso molecular, constituida por 170 aminoácidos, denominada **prepro-VIP**. Este prepro péptido es metabolizado por proteasas señal en el retículo endoplásmico, obteniéndose como resultado el pro-VIP, de 148 aminoácidos, el cual es escindido por pro-hormonas convertasas para dar lugar a VIP-GKR (prepro-VIP 125-155) y PHM-GKR (prepro-VIP 81-110). VIP-GKR y PHM-GKR

son a su vez metabolizados por enzimas tipo carboxipeptidasa-B, generando VIP-G y PHM-G, que finalmente, tras la actuación de diferentes enzimas, dan lugar a VIP y PHM. (Bloom *et al.*, 1983; Itoh *et al.*, 1983; Fahrenkrug, 2010). Cabe señalar que, a pesar de que ambos péptidos están localizados en un gen común, no siempre son expresados en los mismos tejidos, sugiriendo que se encuentren sometidos un procesamiento alternativo diferente, a nivel del mensajero o de proteína. (Beinfeld *et al.*, 1984)

1.8.2.3. Receptores de VIP

A partir de 1970, año en el que Said y Mutt aislaron el VIP en tejido duodenal porcino, hubo trabajos tempranos que revelaron que este péptido tenía receptores ampliamente distribuidos en diferentes órganos y tejidos, observándose que se unía a sitios específicos en hígado y en membrana plasmática de células grasas (Bataille *et al.*, 1974), en páncreas exocrino (Christophe *et al.*, 1976), en epitelio intestinal (Prieto *et al.*, 1979) y en células cancerígenas humanas (Laburthe *et al.*, 1978). No sería hasta 1989, con el aislamiento de los péptidos PACAP27 y PACAP38, de elevada homología con VIP, cuando se sugirió que los receptores clásicos de VIP podrían presentar una afinidad similar para PACAP (Miyata *et al.*, 1989).

Estudios posteriores han permitido demostrar que VIP y PACAP ejercen sus múltiples funciones biológicas a través de tres receptores que, de acuerdo a la nomenclatura de la Unión Internacional de Farmacología, se denominan: **VPAC1**, **VPAC2** y **PAC1** (Harmar *et al.*, 2012). Estos receptores pertenecen a la **familia B** o clase II de **receptores acoplados a proteínas G (GPCRs)**, que incluye a los receptores de otros miembros de la familia del VIP y también a los de otros péptidos que no presentan homologías en su secuencia con VIP, tales como la hormona paratiroidea, calcitonina o el factor liberador de corticotropina (CRF) (Laburthe *et al.*, 2007).

La familia B de los GPCRs presenta algunas **características estructurales** comunes, como son (Laburthe *et al.*, 2007):

- Siete dominios transmembrana (TM), desde TMI hasta TMVII, conectados por tres bucles extracelulares (EC1-3) y tres intracelulares (IC1-3).
- Un largo dominio amino terminal extracelular, con más de 120 residuos, implicado en la interacción con los péptidos agonistas.
- Seis cisteínas en el dominio amino terminal que contribuyen a mantener la conformación espacial del receptor, estableciendo tres puentes disulfuro.
- Un dominio hidrofóbico en la secuencia amino terminal que constituye una secuencia señal, probablemente implicada en la inserción del receptor en la membrana citoplásmica.
- Varios sitios de glicosilación conservados en el dominio amino terminal implicados en el tráfico del receptor.
- Ausencia de motivos arquetípicos de la familia A de los GPCR.
- Complejidad en su organización genética, con la presencia de diferentes intrones.

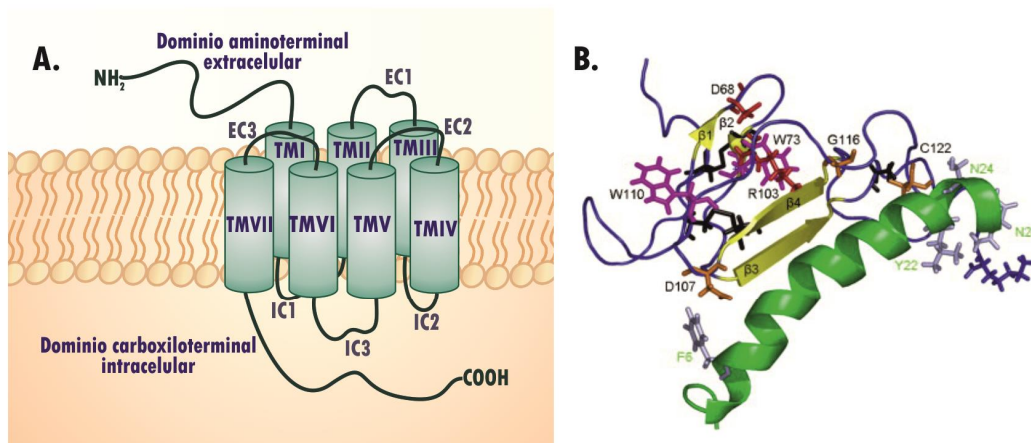


Figura 15. (A) Esquema de la estructura de los GPCRs. (B) Representación de la interacción de VIP con VPAC1. La cadena principal del receptor de VPAC1 se muestra en azul y las láminas β en amarillo. El VIP se muestra en verde (Imagen de Laburthe *et al.*, 2007).

En cuanto a la **localización celular** de los GPCRs, aunque clásicamente se habían descrito en la **membrana citoplásmica**, más recientemente se ha constatado su localización **intranuclear** (Gobeil *et al.*, 2006). De hecho, mediante el uso de microscopía electrónica de alta resolución, han sido detectados tanto en el nucleoplasma como en la membrana nuclear interna y externa (Gobeil *et al.*, 2003). La presencia nuclear de los receptores de VIP/PACAP ha sido demostrada en diversos tipos celulares, tales como células humanas de cáncer de mama (Valdehita *et al.*, 2010) y de colon (Omary y Kagnoff, 1987) o células germinales testiculares (Li *et al.*, 2004). A partir de la descripción de esta nueva localización, ha crecido el interés en dilucidar sus posibles efectos fisiológicos, así como los mecanismos implicados en el acceso de los ligandos a dichas dianas intracelulares. En este sentido, se ha demostrado que diferentes isoformas del péptido PACAP son capaces de alcanzar el interior celular para activar sus sitios de unión nucleares y citoplásmicos, gracias a una serie de características en su conformación que les permiten penetrar en la célula (Doan *et al.*, 2012).

1.8.2.3.1. Receptor VPAC1

En 1992 se aisló, por primera vez, un receptor específico de VIP a partir de tejido pulmonar de rata al que se denominó VIP1, actualmente conocido como VPAC1 (Ishihara *et al.*, 1992). El **gen de VPAC1** humano se encuentra localizado en el cromosoma 3p21.33-p21.31 y consta aproximadamente de 22kb que se distribuyen en 13 exones y 12 intrones. Dicha secuencia codifica una proteína de 457 aminoácidos cuya estructura tridimensional presenta un dominio amino terminal extracelular que resulta crucial para la unión de VIP (Laburthe y Couvineau, 2002).

Este receptor reconoce con la **misma afinidad VIP y PACAP**, siendo también capaz de unir otros péptidos relacionados estructuralmente con VIP, en un orden de afinidad que, en el caso de humanos, es (Usdin *et al.*, 1994):



Presenta una amplia **distribución** en el sistema nervioso central (SNC), detectándose niveles elevados de su mRNA en la corteza cerebral y en el hipocampo (Ishihara *et al.*, 1992, Usdin *et al.*, 1994). También se ha descrito su presencia en tejidos periféricos como corazón, páncreas, tiroides,

glándula adrenal, riñón, hígado, pulmón, estómago, intestino grueso y delgado, ovario, útero, vesícula seminal, próstata y en linfocitos T (Christophe *et al.*, 1981, Prieto *et al.*, 1981, Toccafondi *et al.*, 1984, Molinero *et al.*, 1985, Magistretti *et al.*, 1988, Gottschall *et al.*, 1990, Guijarro *et al.*, 1991, 1995, Ishihara *et al.*, 1992, Rodríguez-Henche *et al.*, 1994; Usdin *et al.*, 1994, Sreedharan *et al.*, 1995; Busto *et al.*, 1999, 2000a, b; Bajo *et al.*, 2000, Delgado *et al.*, 2006).

1.8.2.3.2. Receptor VPAC2

El receptor VPAC2 fue clonado, en 1993, por el equipo de Lutz a partir de bulbo olfatorio de rata (Lutz *et al.*, 1993). En humanos, el **gen de VPAC2** se encuentra localizado en el cromosoma 7q36.3 (Mackay *et al.*, 1996), está constituido por 13 exones y 12 intrones, y la similitud que presenta en su organización genómica con VPAC1 ha sugerido la existencia de un gen ancestral común para ambos receptores (Laburthe *et al.*, 2002). Aunque su estructura tridimensional ha sido menos estudiada que la de VPAC1, en base a la homología que presenta con este receptor, un 49% de homología, y a diferentes estudios de mutagénesis, el dominio amino terminal de VPAC2 se perfila como determinante en la unión con el ligando, resultando indispensable para que se produzca dicha interacción (Nicole *et al.*, 1998).

Este receptor reconoce **VIP con menor afinidad que VPAC1**, sin presentar diferencias de afinidad entre VIP y PACAP. Asimismo, también reconoce otros péptidos de la familia del VIP, aunque no una secretina (Usdin *et al.*, 1994), siendo el orden de afinidad:

VIP = PACAP38 = PHI > PACAP27 >>> GRH

Se encuentra ampliamente **distribuido** en el SNC, en el que su localización es aparentemente complementaria a la de VPAC1, detectándose en zonas opuestas. Así, se ha descrito su presencia principalmente en tálamo y núcleo supraquiasmático, espina dorsal y ganglios raquídeos dorsales (Usdin *et al.*, 1994; Sheward *et al.*, 1995), donde apenas existe expresión de VPAC1. Por otra parte, también se ha detectado VPAC2 en los siguientes tejidos periféricos: páncreas, pulmón, músculo liso, corazón, riñón, tejido adiposo, ovario, útero, testículo, pene y estómago (Usdin *et al.*, 1994; Adamou *et al.*, 1995; Krempels *et al.*, 1995; Wei y Mojssov, 1996; Busto *et al.*, 1999, 2000 a,b; Bajo *et al.*, 2000; Groneberg *et al.*, 2001; Guidone *et al.*, 2002).

1.8.2.3.3. Receptor PAC1

El receptor PAC1, conocido como el receptor selectivo de PACAP, fue clonado por primera vez en 1993 por Pisegna y Wank, a partir de una línea celular procedente de un carcinoma pancreático acinar de rata (Pisegna y Wank, 1993). Posteriormente, el equipo de Ogi publicó su secuencia en humanos (Ogi *et al.*, 1993). El **gen de PAC1** está localizado en el cromosoma 7p15, consta de 15 exones y 14 exones (Brabet *et al.*, 1996).

PAC1 muestra una **elevada afinidad por PACAP38 y 27**, mientras que la potencia de VIP es aproximadamente quinientas veces menor, presentando diferencias de afinidad en las distintas regiones del sistema nervioso central (Cauvin *et al.*, 1991). El orden de afinidad por los péptidos es:

PACAP38 = PACAP27 >>> VIP >>>> GRH

La **expresión** de PAC1 en el SNC es más abundante que VPAC1 y VPAC2 (Basille *et al.*, 2000). Se localiza principalmente en el bulbo olfatorio, el girodentado del hipocampo, el núcleo supraóptico del hipotálamo y el córtex cerebelar (Gottschall *et al.*, 1991; Hashimoto *et al.*, 1996;

Nombra *et al.*, 1996; Shioda *et al.*, 1996; Otto *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000). En tejidos periféricos, PAC1 se ha descrito en glándula adrenal, ojo, hígado, pulmón, páncreas, ovario, testículo, pene e hiperplasia prostática (Shivers *et al.*, 1991; Heindel *et al.*, 1992; Hashimoto *et al.*, 1993; Hosoya *et al.*, 1993; Morrow *et al.*, 1993; Ogi *et al.*, 1993; Nilsson *et al.*, 1994; Yon *et al.*, 1994; Carmena *et al.*, 1996; Scaldaferrri *et al.*, 1996; Solano *et al.*, 1996, 1999; Kotani *et al.*, 1997,1998; Romanelli *et al.*, 1997; Busto *et al.*, 1999; Guidone *et al.*, 2002).

1.8.2.4. Vías de señalización de VIP

La unión específica de VIP a los receptores VPAC1, VPAC2 y PAC1, desencadena una serie de vías de señalización intracelular que transducen su señal, induciendo la activación de diferentes moléculas efectoras que terminan modulando la actividad de diversos factores de transcripción.

La interacción de los agonistas con el dominio extracelular de dichos GPCRs, conlleva un cambio conformacional en éstos que permite que interactúen con las **proteínas G** heterotriméricas. Estas proteínas están formadas por tres subunidades α , β y γ y han sido clasificadas en función del tipo de **subunidad α** que presentan, diferenciándose cuatro tipos principales: G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$. En estado basal, dicho trímero se encuentra unido a **GDP**, de manera que tras la unión del ligando, la proteína G intercambia el GDP por **GTP**, convirtiéndose en su forma activa. Cuando esto ocurre, sufre un proceso de hidrólisis por el que las subunidades α se disocian de la $\beta\gamma$, que queda unida a GTP, obteniéndose como resultado una unidad **G- α** y un dímero **G- $\beta\gamma$** , capaces de acceder a sus efectores para iniciar diversas vías de señalización (Langer, 2012; Johnston y Siderovski, 2007; Kobilka y Deupi, 2007).

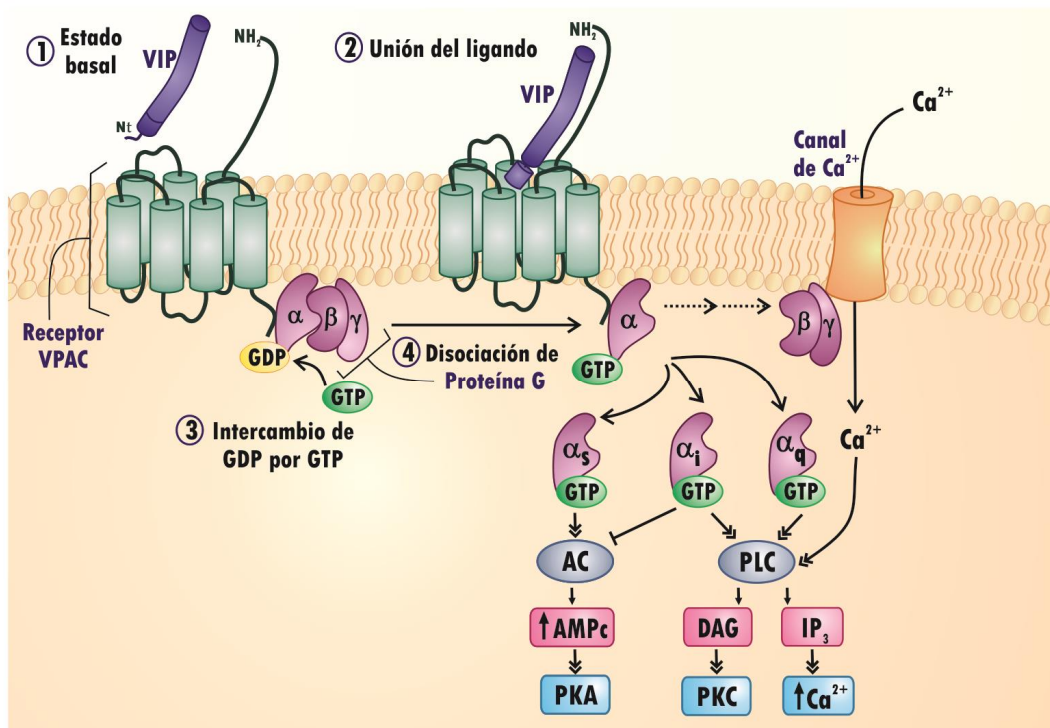


Figura 16. Esquema de la señalización iniciada por VIP tras la unión a su receptor.

Los tres receptores de VIP/PACAP se acoplan principalmente a proteínas **G_s** o proteínas G estimuladoras, caracterizadas por activar a la adenilato ciclasa (**AC**), resultando en un aumento de los niveles de **AMPc** intracelulares. El AMPc es el responsable de la activación de varios efectores, siendo el principal la proteína quinasa dependiente de AMPc (**PKA**). La unión del AMPc a las subunidades reguladoras de la PKA, permite la liberación de las subunidades catalíticas capaces de fosforilar a múltiples sustratos implicados en diferentes vías de señalización (Laburthe *et al.*, 2007; Dickson y Finlayson, 2009; Vaudry *et al.*, 2009).

A pesar de que el AMPc se presenta como el segundo mensajero por excelencia en la señalización desencadenada por VIP, los mecanismos de transducción de su señal pueden variar en función del tipo de proteína G que se encuentre acoplada a sus receptores. (Laburthe y Covineau, 2002). Así, a través de las proteínas **Gq/Gi**, puede inducir la activación de la fosfolipasa C (**PLC**) que, a su vez, conlleva la hidrólisis del fosfatidilinositol difosfato (PIP₂), dando lugar a inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). Por su parte, el **DAG** puede inducir la activación de otros efectores, como es la proteína quinasa C (**PKC**), mientras que el IP₃ puede promover la liberación de calcio (**Ca²⁺**) desde el interior del retículo endoplásmico al citoplasma. Aunque el Ca²⁺ ha sido considerado como un segundo mensajero independiente del AMPc, también se ha descrito un aumento simultáneo de ambas moléculas, existiendo estudios en los que observan que el aumento del Ca²⁺ en el citoplasma inducido por VIP es dependiente de AMPc y PKA (Hagen *et al.*, 2006). Recientes estudios filogenéticos demuestran que en Agnatos existen formas ancestrales intermedias entre VPAC1, VPAC2 y PAC1 y que, curiosamente, uno de los subtipos no trasduce via AMPc pero es capaz de incrementar los niveles de Ca²⁺ intracelular (Ng *et al.*, 2012).

Además de los mecanismos efectores definidos, se han descrito múltiples sistemas de transducción de la señal de VIP en diferentes tipos de células, entre ellos se incluye la modulación de la actividad de la fosfolipasa D (PLD) (McCulloch *et al.*, 2000), de tirosina quinasas (Morisset *et al.*, 1995), de los canales de Ca²⁺ (Tompkins *et al.*, 2006) o de JAK/STAT y NF- κ B, entre otras (Delgado y Ganea, 1999, 2000).

En este contexto, cabe señalar que los GPCRs a los que VIP se une también están sometidos a una **regulación** mediada por procesos de desensibilización, internalización y fosforilación por proteínas quinasas de los GPCRs (**GRK**) y **arrestinas** (Krupnick y Benovic, 1998; Lefkowitz, 1998; Pitcher *et al.*, 1998). La fosforilación del receptor por GRKs provoca la unión de proteínas citosólicas denominadas arrestinas, que bloquean la capacidad de los GPCR de interactuar con proteínas G, conduciendo a una rápida desensibilización. Como resultado de la unión de -arrestinas, los receptores fosforilados sufren endocitosis mediada por clatrina, un proceso que finalmente resensibiliza y recicla los receptores a la membrana plasmática (Moore *et al.*, 2007).

Además, junto a estos mecanismos de regulación a corto plazo, también se han descrito sistemas de modulación a largo plazo que consisten en modificaciones de los procesos de transcripción, mediadas por hormonas y citocinas (Pei, 1996; Madsen *et al.*, 2001; Kakurai *et al.*, 2001). Asimismo, en determinados tipos celulares, algunos de los GPCRs de la clase B pueden experimentar un procesamiento o **splicing alternativo** que supone la aparición de variantes de dichos receptores y, por tanto, una diversificación de sus posibles respuestas funcionales (Furness *et al.*, 2012). De modo que aquellas formas con variaciones en la secuencia del dominio aminoterminal o

de los bucles extracelulares, presentarían una alteración en la afinidad y selectividad por los ligandos, mientras que las modificaciones en los bucles intracelulares o en dominio carboxilo terminal afectarían a los mecanismos de transducción de la señal (Harmar *et al.*, 2012).

Por otra parte, diferentes trabajos han demostrado que algunos GPCRs son capaces de iniciar una señalización independiente de las proteínas G, empleando una serie de proteínas accesorias conocidas como proteínas de interacción con los GPCRs (**GIPs**) (Bockaert *et al.*, 2010). La naturaleza de este tipo de moléculas es muy variable y las diferentes familias descritas pueden estar implicadas en múltiples funciones biológicas, modulando la actividad del receptor a nivel de su señalización, movilidad, compartimentación e incluso de su perfil farmacológico. Las proteínas modificadoras de la actividad del receptor (**RAMPS**, receptor activity-modifying proteins) son una familia de tres proteínas transmembrana (RAMPS 1, 2 y 3) que heterodimerizan con los GPCRs para formar múltiples subtipos de los receptores con diferente afinidad por sus ligandos peptídicos endógenos (Barwell *et al.*, 2012). El receptor VPAC1, pero no VPAC2 ni PAC1, es capaz de interactuar con las RAMPs. Aunque se desconoce la funcionalidad de los complejos VPAC1/RAMP1 y VPAC1/RAMP3, se ha comprobado que el heterodímero **RAMP2-VPAC1**, a pesar de no manifestar cambios en la afinidad por el sustrato, es capaz de desencadenar una vía de señalización diferente a la principal del VPAC1, induciendo un incremento selectivo de la hidrólisis de fosfoinositoles sin que exista un aumento del nivel de AMPc mediado por la AC (Christopoulos *et al.*, 2003; Laburthe *et al.*, 2007).

1.8.2.5. Agonistas y antagonistas de los receptores de VIP

El desarrollo de agonistas y antagonistas específicos para los receptores VPAC1, VPAC2 y PAC1 ha ido acompañado de los avances en el conocimiento de su conformación espacial y de las secuencias clave implicadas en la unión de los ligandos. Por su parte, estas moléculas han sido de gran utilidad en el estudio de la participación de cada uno de los receptores en los procesos en los que interviene VIP (Harmar *et al.*, 2012). En la siguiente tabla se recogen los principales agonistas y antagonistas de dichos receptores:

Tabla 3. Agonistas y antagonistas de VIP.

AGONISTAS			
	Maxadilan	Agonista selectivo de PAC1 de elevada afinidad. Péptido vasodilatador aislado de la glándula salivar de la mosca <i>Lutzomyia longipalpis</i> .	Lerner <i>et al.</i> , 1991
	(Ala ^{2,8,9,11,19,22,24,25,27,28})VIP	Selectividad por VPAC1 2000 veces mayor que VIP. Sin selectividad por VPAC2.	Igarashi <i>et al.</i> , 1995
	(Ala 2,8,9,11,19,24-28)VIP	Selectividad por VPAC1 600 veces mayor que VIP. Sin selectividad por VPAC2.	
	[K ¹⁵ , R ¹⁶ , L ²⁷] VIP (1-7)/ GRH (8-27)	Gran selectividad para el receptor VPAC1, se une con una afinidad 1000 veces mayor que a VPAC2. No se une al receptor PAC1.	Gourlet <i>et al.</i> , 1997a
	Ro 25-1553	Gran afinidad por VPAC2. Mucha menor por los otros dos receptores.	Gourlet <i>et al.</i> , 1997c
	Ro 25-1392	Análogo cíclico de VIP. El agonista más selectivo de VPAC2.	Xia <i>et al.</i> , 1997
	C ₆ -VIP	Posee de 3 a 4 veces mayor afinidad por VPAC2 y 6 veces menor afinidad por VPAC1 que VIP.	Juarranz <i>et al.</i> , 1999
	[Tyr ⁹ , Dip ¹⁸] VIP (1-28)	EC ₅₀ menor de 1 nM a través del receptor VPAC1.	Tams <i>et al.</i> , 2000
	[Ala ^{11,22,28}] VIP	EC ₅₀ menor de 1 nM a través del receptor VPAC1 y mayor de 1000 nM a través del VPAC2.	Nicole <i>et al.</i> , 2000b
	Moléculas creadas por mutagénesis de los péptidos VIP	Agonistas de VPAC2 altamente selectivos.	Yung <i>et al.</i> , 2003
ANTAGONISTAS			
	[Ac-His ¹ , D-Phe ² , K ¹⁵ , R ¹⁶ , L ²⁷] VIP (3-7)/ GRH (8-27)	Antagonista de VPAC1 con elevada selectividad.	Gourlet <i>et al.</i> , 1997b
	VIP (10-28)	Antagonistas de VPAC1 con baja eficacia.	Turner <i>et al.</i> , 1986
	VIP (1-11)		Goossens <i>et al.</i> , 1992
	[4-Cl-D-Phe ⁶ -Leu ¹⁷] VIP		Pandol <i>et al.</i> , 1986
	[Tyr ⁹ , Dip ¹⁸] VIP (6-23)		Tams <i>et al.</i> , 2000
	[Ac-Tyr ¹ , D-Phe ²] GRH (1-29)		Análogo de GRH. Antagonista de VPAC1 con baja eficacia.
	JV-1-51	Análogo de GRH. Antagonista de VPAC1 con baja eficacia.	Rekasi <i>et al.</i> , 2000
	Péptidos quimera entre VIP y PACAP	Actúan como antagonistas de VPAC1.	Fishbein <i>et al.</i> , 1994
	Péptidos quimera entre neurotensina y VIP	Actúan como antagonistas de VPAC1.	Gozes <i>et al.</i> , 1991
	PG 99-465	Derivado de VIP. Actúa como antagonista de VPAC2.	Moreno <i>et al.</i> , 2000
	JV-1-53	Antagonista de VPAC1 y VPAC2. No discrimina entre ambos receptores.	Rekasi <i>et al.</i> , 2000b
	VIP ₄₋₂₈	Péptido endógeno generado por proteólisis de VIP en linfocitos. Actividad antagonista para VPAC2 y agonista para VPAC1.	Summers <i>et al.</i> , 2003
	PACAP (6-38)	Antagonista de PAC1. No es totalmente selectivo ya que presenta una afinidad significativa por el VPAC2.	Tornoe <i>et al.</i> , 1997
	Molécula híbrida entre neurotensina y PACAP	Parece ser mejor antagonista de PAC1 que PACAP (6-38).	Gozes <i>et al.</i> , 1998
	M65	Derivado del Maxadilan. Antagonista de alta afinidad para PAC1.	Uchida <i>et al.</i> , 1998
	Compuesto no péptido	Antagonista no péptido del receptor VPAC2.	Chu <i>et al.</i> , 2010

1.8.2.6. VIP como agente terapéutico

La presencia de VIP y de sus receptores ha sido descrita en multitud de órganos y tejidos, encontrándose implicado en un gran número de actividades biológicas, ya resumidas anteriormente. El progreso en su estudio ha permitido que se haya identificado al VIP como un **potencial agente terapéutico** en diferentes tipos de enfermedades, entre las que se incluye el asma (Groneberg *et al.*, 2001b), la impotencia sexual (Fahrenkrug, 2001), el infarto cerebral (Dogrukol-Ak *et al.*, 2004), la inflamación crónica (Delgado *et al.*, 2004), el Alzheimer (Gozes *et al.*, 1996), la diabetes (Herrera *et al.*, 2006) y el Parkinson (Korkmaz *et al.*, 2010).

Entre los usos terapéuticos de VIP más prometedores, destacan los basados en los **efectos antiinflamatorios** que presenta debido a su capacidad **inmunomoduladora**, ya que este péptido, además de ser sintetizado por células del sistema inmune, también ejerce sobre ellas diferentes efectos biológicos mediados por su unión a los receptores VPAC1, VPAC2 y PAC1. El VIP y sus receptores han sido estudiados en diferentes tipos de células inmunes, tanto de animales de experimentación como de humanos, observándose que presentan una expresión diferencial y una funcionalidad variable que está mediada por una compleja señalización que implica la regulación de diversos factores de transcripción, tal y como ya se ha reseñado.

Actualmente, el VIP es considerado un **neuroinmunopéptido** pleiotrópico que presenta un amplio rango de funciones implicadas en la modulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, siendo destacable su participación en el **bloqueo de la respuesta inflamatoria**, en la regulación del **balance Th1/Th2** y en la modulación del sistema **Th17/Treg** (Delgado *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2004; Gomariz *et al.*, 2001; Leceta *et al.*, 2007). De hecho, se ha propuesto al VIP como un potencial candidato en el **tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes**, habiendo sido probada su eficacia en la prevención de los síntomas asociados a **modelos animales** de enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, algunas de ellas con un componente autoinmune, tales como choque séptico, CIA, colitis inducida por sulfonato de trinitrobenzeno (TNBS), encefalomiелitis autoinmune experimental, diabetes de tipo 1 en ratones NOD, uveroretinitis experimental y síndrome de Sjogren (Delgado y Ganea, 2001; Gomariz *et al.*, 2007; Lodde *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Abad *et al.*, 2003). Los efectos terapéuticos de VIP observados en estos modelos animales, se han asociado a una disminución de la respuesta inflamatoria y a la modulación del balance de las células T helper, bloqueando las respuestas de tipo Th1 y aumentando la síntesis de citocinas anti-inflamatorias Th2 (Delgado *et al.*, 2004). Además, otros efectos de VIP evidencian su **carácter antiinflamatorio**, como es la inhibición de la activación y migración de leucocitos, la reducción de la activación del factor de transcripción NF- B y la disminución de la expresión de quimiocinas y citocinas proinflamatorias (Gomariz *et al.*, 2001).

No obstante, la investigación en ratones VIP-KO y VPAC1-KO ha aportado nueva información acerca del papel de VIP en las enfermedades inflamatorias, revelando la complejidad de sus efectos, ya que también podría ejercer **acciones proinflamatorias**. Así, se ha comprobado que la resistencia a desarrollar encefalomiелitis aumenta en ratones que no presentan el gen del VIP y que los que no cuentan con el receptor VPAC1 están parcialmente protegidos frente a la colitis inducida por sulfato de dextrano (DSS). Además, un estudio recientemente publicado demuestra que en ratones hembra

VIP-KO aumenta la resistencia al shock inducido por la inyección intraperitoneal de LPS. (Abad *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2011; Abad *et al.*, 2012).

A pesar de estos últimos datos, lo cierto es que diferentes trabajos han demostrado que la **administración de VIP a corto plazo** presenta un claro **efecto antiinflamatorio** en modelos animales de enfermedades inflamatorias autoinmunes, como la AR y la enfermedad de Crohn. De modo que dichas publicaciones avalan la hipótesis que plantea que el uso de VIP, o de otros agonistas de los receptores de VIP, podría ser beneficioso en el tratamiento de este tipo de patologías, especialmente en aquellas asociadas a un exceso en la activación de los macrófagos y a la pérdida del balance en las respuestas Th1/Th2 (Tan y Waschek, 2011).

Por otra parte, cabe señalar que en los últimos años se ha investigado la capacidad de VIP para **modular las respuestas inmunes** mediadas por los **TLRs**, receptores implicados en la patogénesis de enfermedades inflamatorias autoinmunes como la AR y la enfermedad de Crohn. De este modo, VIP controlaría los procesos inflamatorios desencadenados por la activación de los TLRs y lograría restablecer la homeostasis alterada en la progresión de este tipo de enfermedades (Gomariz *et al.*, 2010).

Al estar uno de los objetivos del presente trabajo enmarcado en este último punto, y por ser la AR la patología estudiada, a continuación se profundizará en los datos obtenidos hasta el momento en el estudio de VIP en el modelo de CIA y en células obtenidas de pacientes con AR.

1.8.2.6.1. Efecto de VIP en el modelo de artritis inducida por colágeno

El modelo murino experimental de CIA está generado por inmunización con colágeno tipo II y comparte las características clínicas, histopatológicas e inmunes de la AR en humanos.

La investigación del efecto de VIP en este modelo ha demostrado que es capaz de **regular** tanto el **componente inmune** como el **inflamatorio** de la enfermedad, presentando un efecto beneficioso a diferentes niveles (Delgado *et al.*, 2001, 2002; Delgado y Ganea, 2001):

- VIP disminuye la **incidencia y severidad** de la enfermedad, tal y como muestra el análisis histológico de las articulaciones, en el que dicho péptido inhibe la inflamación del tejido sinovial, la formación del *pannus*, la destrucción del cartílago y la erosión ósea.
- VIP regula el **equilibrio Th1/Th2** a través de múltiples mecanismos:
 - VIP interfiere en la expansión clonal de linfocitos T en respuesta a colágeno tipo II, al menos parcialmente.
 - Tras el tratamiento con VIP, se registra un aumento de la producción de IL-4 y una disminución de la de IFN γ , contrarrestando así el efecto de los linfocitos T efectoras específicos de antígeno (colágeno II) que se generan durante el progreso de la enfermedad, ya que los linfocitos T producen elevados niveles de IFN γ y bajas cantidades de IL-4.
 - VIP induce un descenso en los niveles de anticuerpos IgG anti-colágeno II, favoreciendo el isotipo IgG1 (asociado a Th2) frente al IgG2a (asociado a Th1).
- VIP bloquea la **respuesta inflamatoria** en la articulación, disminuyendo la expresión de mediadores proinflamatorios, como TNF α , IL-6, IL-12, IL-1 β , IL-1 α , IL-18, iNOS, CCL5, CCL2, CCL3, CCL4/MIP1 α , CXCL1 y CXCL2/MIP2 α , e induciendo la de factores anti-inflamatorios, como IL-10 e IL-1Ra.

- VIP inhibe la **destrucción del cartílago** y la **erosión ósea** a través de la modulación de factores implicados en el proceso, tales como la MMPs, citocinas inflamatorias y el balance RANK/RANKL. VIP consigue este efecto al impedir el paso de NF- κ B al núcleo y la formación de complejos AP-1 transcripcionalmente inactivos (Juarraz *et al.*, 2005).
- VIP bloquea la **diferenciación Th17** (Leceta *et al.*, 2007).

1.8.2.6.2. Efecto de VIP en células de pacientes con AR

En base a los efectos beneficiosos de VIP descritos en el modelo experimental de CIA, en el que reduce la incidencia y severidad de la enfermedad, este péptido ha emergido como un potencial agente terapéutico en el tratamiento de pacientes con AR. Así, se ha estudiado el efecto de VIP en diversos tipos celulares aislados de pacientes afectados por esta patología y sometidos a diferentes condiciones experimentales.

En **leucocitos de sangre periférica** de pacientes con AR se ha confirmado el efecto antiinflamatorio de VIP descrito en el modelo de CIA, ya que VIP induce en ellos una disminución de la producción de mediadores *proinflamatorios*, como las citocinas TNF α e IL-6 y las quimiocinas CCL2 y CXCL8. Además, tras la estimulación de estas células con PMA e ionomicina, VIP promueve una respuesta Th2, aumentando la liberación de IL-4 e IL-10, sin que se vean afectados los niveles de IFN γ , y por tanto, la respuesta Th1. Sin embargo, en leucocitos de sangre periférica de individuos sanos, se observa que tras su estimulación, VIP reduce una respuesta de tipo Th1 (Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2008).

También ha sido objeto de estudio el efecto de VIP sobre los componentes celulares de las articulaciones afectadas por la AR. Inicialmente se comprobó su actividad anti-inflamatoria en **suspensiones celulares de tejido sinovial** y **FLS** aislados de pacientes con AR, donde conseguía disminuir la síntesis de citocinas y quimiocinas proinflamatorias inducidas tras la estimulación con LPS, tales como CCL2, CXCL8 e IL-6 (Juarraz *et al.*, 2004, 2006).

Posteriormente, se ha investigado la capacidad moduladora de **VIP sobre los TLRs de los FLS**, ya que dichos receptores han sido implicados en la activación del comportamiento patológico de este tipo celular, potenciando la síntesis de mediadores inflamatorios y de destrucción articular. Los primeros trabajos en esta área demostraron que VIP inhibe el incremento de la expresión de TLR4 inducido por LPS y por TNF α en dicho tipo celular, conllevando, al mismo tiempo, una reducción en la síntesis de CCL2 y CXCL8 aumentada por ambos estímulos. Por tanto, al quedar evidenciado el potencial de VIP como **regulador de la expresión de TLR4**, se sugiere su utilidad en el restablecimiento del control de los procesos inflamatorios patológicos (Juarraz *et al.*, 2006; Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2006).

En este sentido, otros autores han señalado que en la línea monocítica humana THP-1, VIP también promueve una reducción de la expresión de TLR2 y TLR4 tras estimulación con LPS. Además, existen evidencias que sugieren que VIP modula la presencia de dichos TLRs inhibiendo el paso al núcleo del factor de transcripción PU.1, necesario para la expresión de ambos receptores (Foster *et al.*, 2007).

A partir de estos resultados se planteó la posibilidad de que VIP no sólo ejerciese un efecto regulador a nivel de expresión de TLR4, sino que también podría estar interviniendo en la cascada de señalización desencadenada por su unión a LPS. Así, mediante un análisis del perfil de expresión

génica de las moléculas implicadas en la **señalización de TLR4**, se ha demostrado que en los FLS de pacientes con AR, VIP es capaz de reducir el efecto inductor del LPS sobre muchas de dichas moléculas, al promover un descenso en los niveles de mRNA de proteínas específicas de interacción con los TLR, de moléculas adaptadoras y efectoras, así como de moléculas que modulan la activación de los factores de transcripción. El efecto regulador de VIP sobre los componentes de la cascada de señalización iniciada por TLR4 ha sido corroborado mediante el análisis de la expresión proteica de moléculas implicadas, tanto en la vía de señalización dependiente de MyD88 (Factor 88 de diferenciación mieloide), como en la independiente. Por tanto, la actividad inhibitoria de VIP afectaría tanto a la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como a la de genes inducibles por IFN, habiéndose confirmado dicho efecto en el caso de IL-6 y CCL5, cuya síntesis estimulada por LPS en FLS de AR se ve disminuida tras el tratamiento con VIP (Arranz *et al.*, 2008). De modo que VIP se presenta como un **regulador negativo** de la cascada de **señalización de TLR4** en los sinoviocitos de pacientes con AR, actuando a diferentes niveles y modulando las dos vías de señalización descritas para este receptor.

1.8.2.6.3. Limitaciones del uso terapéutico de VIP

El uso clínico de VIP como agente terapéutico en humanos se encuentra limitado por su alta **sensibilidad a ser degradado por proteasas** y por sus **efectos pleiotrópicos**, ya que la amplia distribución de los diferentes subtipos de GPCRs de clase B a los que se une, implica su participación en numerosos procesos fisiológicos (Vessillier *et al.*, 2012).

VIP presenta una **vida media muy corta** tras su administración sistémica, sin que pueda incrementarse su dosis hasta niveles elevados, ya que podría provocar efectos no deseados en los pacientes, tales como taquicardia (Morice *et al.*, 1983). Este péptido pierde drásticamente la afinidad por sus receptores tras la eliminación de los primeros residuos His1-Ser2 por la acción de peptidasas, como la dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) (Gourlet *et al.*, 1997a,b). Sin embargo, una modificación de la molécula de VIP también podría aumentar su resistencia a la degradación, tal y como se ha comprobado en el caso de la acetilación del extremo amino terminal, que conlleva un incremento de su estabilidad en presencia de suero humano (Couvineau y Laburthe, 2012). Además, se han aplicado otras estrategias para proteger al péptido de la degradación, como es su administración junto a inhibidores de proteasas, su inserción en micelas y en nanopartículas o mediante el desarrollo de vectores virales y no virales de VIP para su uso en terapia génica (Fernández-Montesinos *et al.*, 2009; Onyüksel y Mohanthy, 2009; Lodde *et al.*, 2004; González-Rey *et al.*, 2010).

Por otra parte, el segundo de los obstáculos en la aplicación terapéutica del VIP es su capacidad de **unión a diferentes GPCRs**, como son los receptores VPAC1 y VPAC2 y, con menor afinidad, a los receptores de PAC1, de secretina y de GRF. Las **interacciones cruzadas** de VIP con dichos receptores podrían ser responsables de sus efectos adversos en humanos, tales como hipotensión y diarrea (Laburthe *et al.*, 2007).

Así, uno de los objetivos centrales en la investigación del uso terapéutico de VIP en humanos es, precisamente, el **diseño de agonistas y antagonistas** metabólicamente estables y altamente específicos de los receptores de VIP/PACAP. En este sentido, a pesar de que se cuenta con diferentes derivados peptídicos dirigidos específicamente a frente los subtipos de receptores VPAC (resumidos en la tabla 3), es necesario optimizar su diseño, ya que éstos siguen presentando una

vida media muy corta, sus vías de administración son complicadas y no son totalmente selectivos en su unión a los diferentes receptores (Couvineau y Laburthe, 2012). De hecho, el interés en el desarrollo de moléculas de naturaleza no peptídica, basado en las nuevas nociones sobre la estructura de los receptores y los sitios de unión de los ligandos, ha incrementado en los últimos años. Sin embargo, en la actualidad únicamente está disponible un antagonista no peptídico del receptor VPAC2 descrito en 2010 por el equipo de Chen (Chu *et al.*, 2010).

1.9. Receptores de reconocimiento de patrones moleculares (PRRs)

La **respuesta inmunitaria** se ha desarrollado en los organismos como una reacción de defensa frente a sustancias extrañas o antígenos en la que intervienen de manera colectiva y coordinada una serie de órganos, células y moléculas que conforman el denominado sistema inmune. Tradicionalmente se han considerado dos tipos de inmunidad, la **innata** y la **adaptativa**, existiendo múltiples elementos conectores entre ambas que aseguran su interregulación.

La activación de las respuestas de la **inmunidad innata**, está mediada por los **PRRs**, capaces de reconocer estructuras compartidas por grupos de microorganismos relacionados, conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (**PAMPs**, *pathogen-associated molecular patterns*), y de unir ligandos derivados del propio huésped (Kumar et al., 2011). Incluyen a tres grandes familias de sensores moleculares: los **TLRs**, las helicasas **RLRs** (RIG-I-like receptors) y los receptores tipo NOD (**NLRs**, Nucleotid-binding and Oligomerization Domain-like receptors). Dichos receptores, que pueden ser de membrana (TLRs) o citosólicos (NLRs y RLRs), resultan esenciales en la **función de defensa** que cumple el sistema inmune, ya que, tal y como se ha señalado, además de ser capaces de detectar **ligandos exógenos** presentes en agentes infecciosos (virus, bacterias, micobacterias, hongos y parásitos), también reconocen **moléculas endógenas** liberadas en procesos de daño tisular, necrosis celular o en determinadas condiciones patológicas (Kawai y Akira, 2009; Akira *et al.*, 2006).

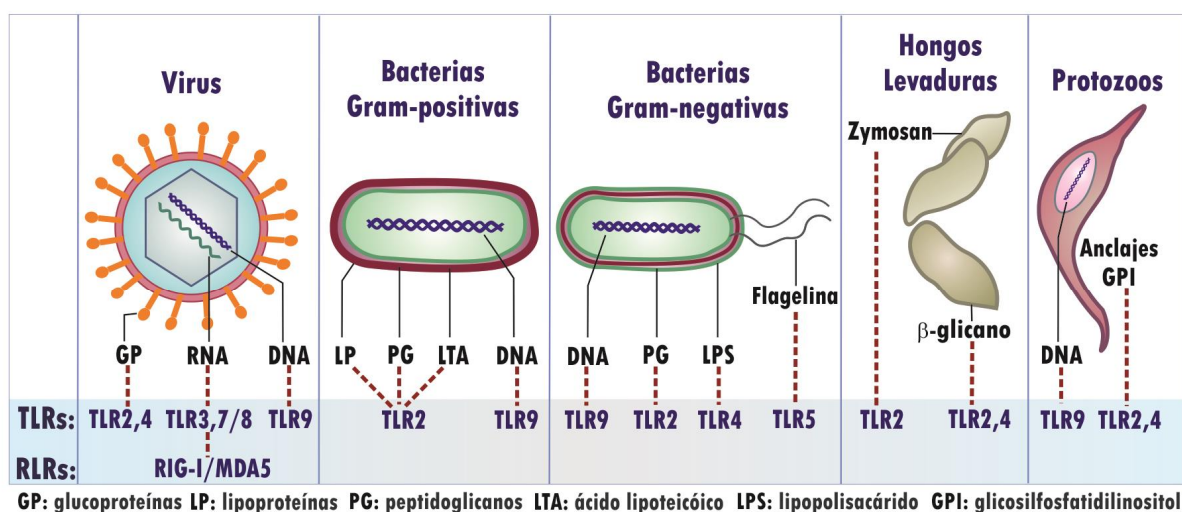


Figura 17. Esquema de los PAMPs que reconocen los diferentes PRRs.

Una vez que tiene lugar la unión de un ligando a su correspondiente PRR, se inicia una serie de cascadas de señalización intracelular que culminan en la activación de diferentes **MAPKs** y de determinados **factores de transcripción**, entre los que se incluyen NF- κ B, AP-1 (c-Fos, c-Jun) e IRFs. De este modo se consigue modificar la expresión de genes de **citocinas proinflamatorias**, **IFNs de tipo I** y **moléculas coestimuladoras** que actúan como agentes efectores de la respuesta inmune innata y como mediadores de la activación y modulación de la **inmunidad adaptativa** (Kawai y Akira, 2010). Cabe señalar que los microorganismos patógenos normalmente presentan varios PAMPs capaces de activar a múltiples PRRs, siendo también posible que un mismo PAMP sea reconocido por diferentes miembros de estos receptores. De modo que sería el conjunto de los PRRs el que, de una manera coordinada, dirige el desarrollo de una respuesta inmune adecuada. El hecho de que la activación de diferentes sensores sea simultánea y que algunos se solapen en sus funciones, sugiere la existencia de algún tipo de comunicación entre ellos que contribuya a la optimización de las respuestas que coordinan (Kawai y Akira, 2011).

A pesar de que la función de los PRRs en origen es protectora, su **activación excesiva** o descontrolada se asocia con una alteración de la respuesta inmune con consecuencias patológicas relacionadas con el desarrollo de **procesos inflamatorios crónicos** y **enfermedades** de tipo **autoinmune**. También se ha propuesto que la estimulación de dichos sensores por moléculas endógenas, producidas por muerte celular y en determinadas condiciones patológicas, podría estar implicada en el desarrollo o la exacerbación de este tipo de enfermedades (Kawai, 2010; Kawasaki *et al.*, 2011; Theofilopoulos *et al.*, 2010).

En los siguientes apartados se señalarán las principales características de los TLRs y RLRs, profundizando en la descripción de los sensores de RNA, al ser un objetivo del presente trabajo avanzar en su caracterización en los FLS de pacientes con OA y con AR. Concretamente, los PRRs implicados en la detección de moléculas de RNA son TLR3 y TLR7 y las helicasas RIG-I y MDA5.

1.9.1. Receptores tipo Toll (TLRs, Toll-Like Receptors)

Los TLRs fueron descubiertos por su homología con la proteína Toll de *Drosophila melanogaster*, una molécula clave en la detección de las infecciones y en la consecuente activación de la **respuesta inmune innata** en dichos insectos (Hoffmann, 2003). En 1997, el grupo de Medzhitov clonó y describió el primer homólogo de los receptores Toll de *Drosophila* en humanos, al que denominaron TLR4. Además, demostraron la implicación del TLR4 humano en la respuesta inmune innata y su participación en el **desencadenamiento de la adaptativa** (Medzhitov, 1997). Posteriormente, los progresos en la investigación de los TLRs han ratificado su implicación en las situaciones de inflamación, así como en la **conexión entre ambos tipos de inmunidad**, resultando fundamental su contribución al mantenimiento de la **homeostasis**. Dichos receptores son expresados en células del sistema inmune, como DCs, monocitos, macrófagos y células B, y también en otros tipos celulares, tales como keratinocitos, células epiteliales o fibroblastos. Por otra parte, su expresión se encuentra regulada por múltiples factores, como son citocinas, estrés celular y agentes infecciosos (Baccala *et al.*, 2009).

1.9.1.1. Estructura, ligandos y localización celular

En mamíferos, se han descrito 13 miembros de la familia de los TLRs, de los que TLR1-TLR9 están presentes en humanos y ratones, TLR10 no es funcional en ratones debido a la inserción de un retrovirus y TLR11-13 no aparecen en el genoma humano (Lee *et al.*, 2012).

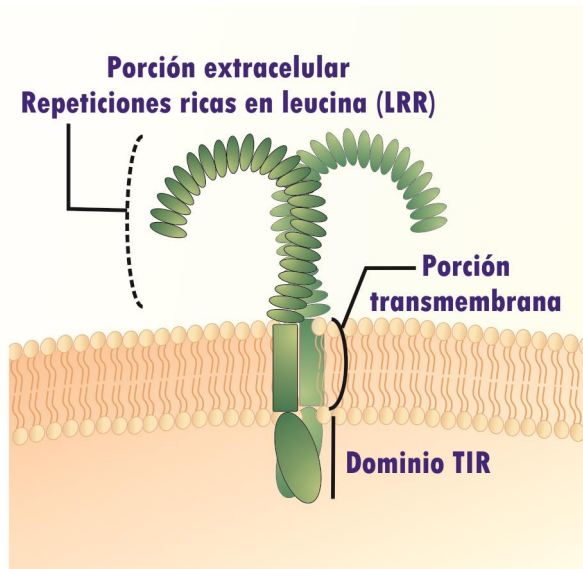


Figura 18. Estructura de los TLRs.

Todos los TLRs comparten una **estructura proteica común**, también presente en las proteínas Toll de *Drosophila*, que les define como receptores transmembrana de tipo I, encontrándose su extremo amino terminal localizado en la parte externa de la membrana. En ellos se puede diferenciar un dominio extracelular compuesto por repeticiones ricas en leucina (**LRRs**); una **porción transmembrana**, implicada en la localización celular de los receptores, y una porción citoplásmica, conocida como **dominio TIR** (Toll/IL-1 Receptor) por su similitud al que presenta el receptor de la IL-1 (Gay y Keith, 1991).

El dominio TIR, está formado por tres segmentos altamente conservados en la evolución, habiendo sido descrita la implicación de dos de ellos en la señalización del receptor y desconociéndose la función exacta del tercero (Slack *et al.*, 2000). Por su parte, las LRRs de la región extracelular son mediadoras del reconocimiento de las estructuras moleculares que activan a los TLRs, encontrándose cada una de ellas formada por 20-30 aminoácidos que incluyen la secuencia consenso LxxLxLxxN. Los TLRs presentan diferencias en la composición de aminoácidos de dichos módulos, que suponen una variación en su conformación estructural y permiten la interacción con sus respectivos ligandos (Kang y Lee, 2011). Estos receptores cuentan además, con una serie de **proteínas específicas** y de **cofactores** que funcionan como mecanismos adicionales para asegurar que dicha detección se realice correctamente, tal es el caso de TLR4 que necesita de CD14, MD-2 y PAR-2 para el reconocimiento de sus ligandos. Algunas de estas moléculas accesorias, como UNC93B1, PRAT4A y gp96, están implicadas en la localización adecuada de los TLRs a nivel celular, siendo su intervención necesaria en el complejo sistema que modula la funcionalidad de dichos receptores (Lee *et al.*, 2012) (Tabla 4).

Los análisis cristalográficos del dominio extracelular de los TLR demuestran que presentan una **estructura solenoide** en forma de herradura y que tras la unión a sus agonistas, ya sean de origen natural o sintético, se induce la **dimerización**, necesaria para el inicio de las cascadas de señalización (Huyton *et al.*, 2007; Jin y Lee, 2008). Aunque la mayoría de los TLRs forma homodímeros, existe alguna excepción, como es el caso de TLR2 que heterodimeriza con TLR1 y TLR6 y así reconoce de manera diferencial a distintos tipos de lipopéptidos (Lee *et al.*, 2012).

Cada uno de los TLR **detecta un tipo determinado de moléculas**, entre las que se incluyen lipoproteínas (TLR1, TLR2 y TLR6); RNA de doble cadena (dsRNA) y de cadena simple (ssRNA)

(TLR3 y TLR7-8, respectivamente); LPS (TLR4); flagelina (TLR5) y DNA (TLR9) (Akira *et al.*, 2006). Además de reconocer dichas estructuras moleculares presentes en los **microorganismos patógenos**, los TLRs también son capaces de unirse a moléculas de **origen endógeno**. Entre los ligandos endógenos descritos se incluyen productos de la ruptura de la matriz extracelular, tales como fragmentos del ácido hialurónico, heparán sulfato, fibrinógeno, dominio extra A de la fibronectina y proteínas HMGB1 (grupo box1 de alta movilidad), reconocidos por TLR4 y/o TLR2 (sólo HMGB1). También han sido identificadas como ligandos de ambos receptores, las proteínas de choque térmico (HSPs) que funcionan como chaperonas moleculares. Por otra parte, el complejo DNA inmunoglobulina (IgG2a/cromatina), uno de los ligandos endógenos mejor establecidos, es capaz de estimular a las células B y a las dendríticas a través de TLR9 y ha sido implicado en la patogénesis del LES (Viglianti *et al.*, 2003; Boule *et al.*, 2004; Barrat *et al.*, 2005). Asimismo, se ha comprobado que el TLR3 de DCs humanas puede reconocer mRNAs heterólogos endógenos liberados por células necróticas, cuya estructura secundaria parece estar implicada en su efecto estimulador (Kariko *et al.*, 2004).

Tabla 4. TLRs descritos en humanos, moléculas adaptadoras y accesorias implicadas en su señalización y ligandos que reconocen.

TLR	PROTEÍNAS ADAPTADORAS	MOLÉCULAS ACCESORIAS	LIGANDOS	
			EXÓGENOS	ENDÓGENOS
TLR1	MyD88/TIRAP	PRAT4A gp96	Lipopéptido triacil	
TLR2	MyD88/TIRAP	CD14 CD36 RP105/MD-1 gp96	PGN, LTA, Zimosan, Lipopéptidos (Pam3 CSK4), Porinas, GIPLs, Glicolípidos, LPS atípico, LAM	Hsp60, Hsp70, gp96, EDN, HMGB1, Biglicano, Hialuronano
TLR3	TRIF	CD14 Unc93B gp96	dsRNA (virus), poly(I-C)	mRNA
TLR4	MyD88/TIRAP TRIF/TRAM	CD14 HMGB1 MD-2 RP105/MD-1 PRAT4A gp96	LPS, Taxol, toxina pertussis, cubierta de proteínas virus, proteínas de fusión, hifas fúngicas	Hsp22, -crystallin A, Fibrinógeno, Fibronectina A, Heparán sulfato, fragmentos de hialuronano, proteína surfactante A, proteína de fusión - defensina 2
TLR5	MyD88	gp96	Flagelina	
TLR6	MyD88/TIRAP	CD14 CD36	Diacil lipopéptidos, LTA, Zimosan	
TLR7	MyD88	Unc93B PRAT4A gp96	ssRNA, Imiquimod, Resiquimod, PolyU RNA sintético, determinados siRNAs	siRNAs encapsulados, inmunocomplejos que contienen RNA, determinadas snRNP
TLR8	MyD88		ssRNA, Resiquimod (R848)	siRNAs encapsulados
TLR9	MyD88	HMGB1 LL37 Unc93B gp96	ODN con CpG no metilados, hemozoína	inmunocomplejos que contienen DNA o cromatina
TLR10	Desconocido		Desconocido	

Atendiendo a su **localización celular**, los TLRs pueden dividirse en **dos subfamilias**. Los receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11 se localizan en la **superficie celular**, donde reconocen principalmente **componentes de la membrana** microbiana como lípidos, lipoproteínas y proteínas. El otro grupo de TLRs, en el que se incluyen TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, se expresa en compartimentos **intracelulares**, como el retículo endoplásmico, endosomas, lisosomas y endolisosomas, capaces de detectar la presencia de **ácidos nucleicos** (Blasius y Beutler, 2010). Recientemente ha sido descrito que TLR11, además de localizarse en superficie, puede hacerlo en compartimentos intracelulares (Pifer *et al.*, 2011), en los que también se expresa TLR13, del que sigue sin conocerse exactamente la naturaleza del PAMP que lo activa (Blasius y Beutler, 2010).

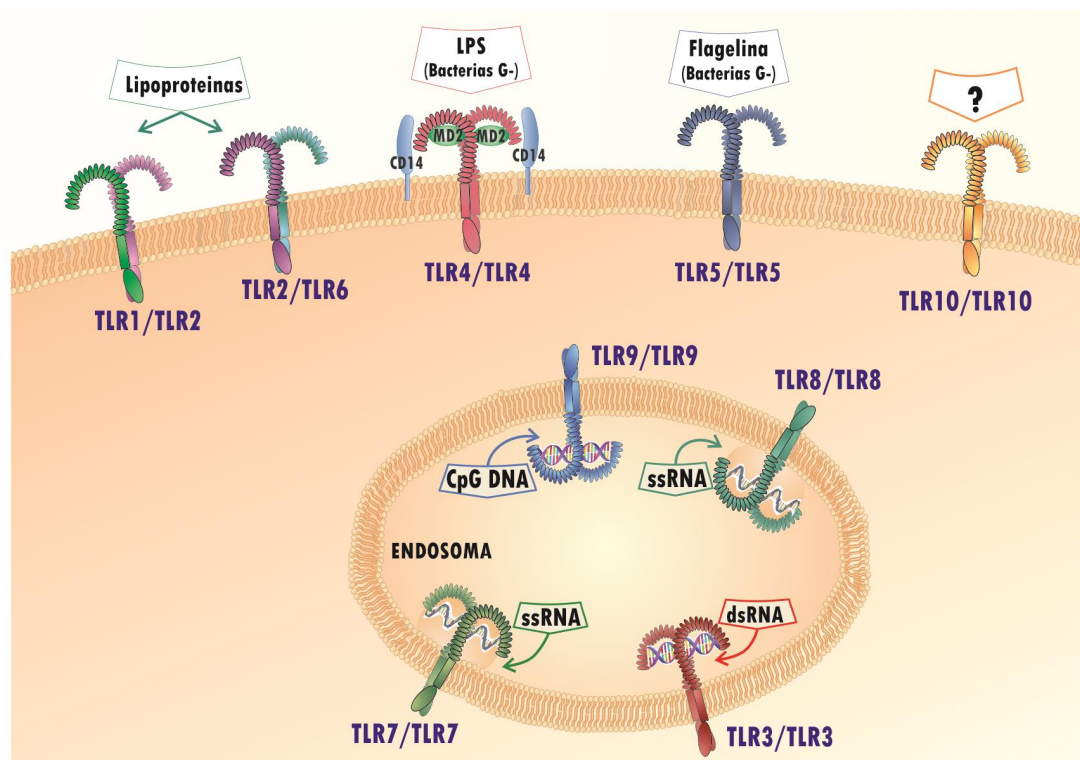


Figura 19. Distribución de los TLRs en la célula y sus principales ligandos.

La **localización intracelular** de los TLRs que reconocen ácidos nucleicos se interpreta como un **mecanismo de protección** frente al contacto de dichos receptores con moléculas propias, en cuyo caso aumentaría el riesgo de iniciar el desarrollo de una **patología autoinmune**. Dichos TLRs presentan el dominio de reconocimiento de los ligandos dirigido hacia el interior de las vesículas en las que se expresan, de modo que sólo pueden reconocer a los ácidos nucleicos que hayan sido liberados al interior de los compartimentos intracelulares, tras un proceso de endocitosis de las partículas víricas y de otros patógenos o de las células infectadas. De modo que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran secuestrados en el retículo endoplásmico y, mediante el aparato de Golgi, son liberados a los endosomas donde interaccionan con sus respectivos PAMPs. Una vez en los endosomas, la región amino terminal de los TLRs debe ser procesada por múltiples proteasas lisosomales, entre las que se incluyen catepsinas y la asparagina endopeptidasa, para llegar a ser funcionales y poder, así, iniciar la señalización intracelular (Blasius y Beutler, 2010; Ewald *et al.*,

2011). La interacción de los TLRs con **UNC93B1**, una proteína transmembrana del retículo endoplásmico, resulta clave en la regulación del paso de estos receptores hacia los compartimentos endosomales (Kim YM *et al.*, 2008). En la movilización de los TLRs también intervienen otras dos proteínas del retículo endoplásmico: PRAT4A y gp96. **PRAT4A** controla la salida de TLR1, TLR2, TLR4, TLR7 y TLR9 desde el retículo endoplásmico y su traslado entre la membrana plasmática y los endosomas. Sin embargo, dicha proteína no interviene en la movilización de TLR3, sugiriendo que la regulación de este receptor intracelular sea diferente a la de TLR7 y TLR9. **gp96** pertenece a la familia 90 de HSPs residentes en el retículo endoplásmico, donde funciona como una chaperona de la mayoría de los TLRs, incluyendo a TLR1, TLR2, TLR4 y TLR5 de la superficie celular y a TLR7 y TLR9 intracelulares (Saitoh y Miyake, 2009).

1.9.1.2. Vías de señalización asociadas a TLRs

Tras la unión de los TLRs a sus respectivos ligandos, se inicia una cascada de señalización intracelular en sus dominios TIR citoplásmicos. Éstos interactúan con una serie de proteínas adaptadoras que también contienen dominios TIR y que se activan en función del tipo de TLR que señalice (Uematsu y Akira, 2006).

Se han descrito un total de cuatro de estas **proteínas adaptadoras**: **MyD88**; **TRIF/TICAM1** (Adaptador que contiene al dominio TIR e induce IFN o Molécula adaptadora que contiene el dominio TIR-1); **TIRAP/Mal** (Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR o *MyD88 adapter-like protein*) y **TRAM/TICAM2** (Molécula adaptadora relacionada con TRIF o Molécula adaptadora que contiene al dominio TIR-2). Entre estos adaptadores destacan MyD88 y TRIF/TICAM1, ya que, en base a su participación, se definen dos tipos de vías de señalización en los TLRs: **vía MyD88 dependiente** y vía MyD88 independiente o **vía TRIF dependiente**. La mayoría de los TLRs emplea MyD88 en su señalización, a excepción de TLR3 que sólo utiliza TRIF y de TLR4 que emplea ambas vías, siendo en este último caso, necesaria la interacción de TRIF con TRAM/TICAM2. La activación de la vía MyD88 por TLR1, TLR2, TLR6 y TLR4 requiere de la proteína adaptadora TIRAP/Mal (Kawai y Akira, 2010; Jenkins y Mansell, 2010; Gomariz *et al.*, 2010) (Figura 20).

Tanto la vía de señalización MyD88 dependiente como la MyD88 independiente, implican la participación de una serie de quinasas y de reacciones de ubiquitinización que conducen a la activación de determinados factores de transcripción. Todos los TLRs activan a **NF- κ B** y **AP-1**, induciendo la producción de citocinas proinflamatorias, tales como TNF, IL-6 o IL-1 y de quimiocinas, como CCL2 o CXCL8. Algunos de estos receptores, entre los que se incluyen TLR3 y TLR7, también activan a **IRF3** y/o a **IRF7**, promoviendo la síntesis de IFNs de tipo I, es decir, de IFN α y de los diferentes IFN β (Kawai y Akira, 2007,2008).

Existen diversos tipos de **reguladores negativos** de las cascadas de señalización de los TLRs que contribuyen al control de su activación, entre los que se incluyen reguladores extracelulares, proteínas transmembrana y moléculas intracelulares que pueden actuar sobre los propios TLRs o sobre proteínas adaptadoras, moléculas efectoras o factores de transcripción implicados en sus vías de señalización (Lang y Mansell, 2007; Liew *et al.*, 2005). Por ejemplo, SARM es una proteína intracelular, cuya síntesis es inducida por LPS, que interacciona con TRIF e inhibe el reclutamiento de las moléculas efectoras de esta vía de señalización, actuando como un regulador negativo intracelular de TLR3 y TLR4 (Carty *et al.*, 2006). En este contexto, cabe señalar que la vía MyD88 dependiente es la más estudiada y por tanto se conocen una serie de puntos que constituyen potenciales dianas en el diseño de estrategias para controlar la actividad de dicha ruta, tales como la activación de TRAF6 (factor asociado al receptor de TNF) por ubiquitinización, la activación de diferentes MAPKs, la fosforilación de la quinasa IKK y la activación de NF- κ B (Gomariz *et al.*, 2010).

1.9.1.3. TLRs de reconocimiento de RNA: TLR3 y TLR7

El **TLR3** fue identificado, en un principio, por su capacidad para reconocer el **poly(I-C)**, un análogo sintético del **dsRNA**. El poly(I-C) es, básicamente, una molécula que simula una infección viral, ya que en el ciclo replicativo de muchas de estas infecciones se genera dsRNA, como subproducto de la transcripción simétrica de genomas virales de DNA o como intermediario esencial en la síntesis de RNA viral (Alexopolou *et al.*, 2001). De hecho, el TLR3, además de ser activado por poly(I-C), también es capaz de reconocer el RNA del genoma de los reovirus y el dsRNA producido durante la replicación del ssRNA y detectar así la presencia de diferentes virus, entre los que se incluye el virus sincitial respiratorio, el virus de la encefalomiocarditis (EMCV) y el virus West Nile (WNV). Además, se ha descrito que puede unir determinados siRNA de pequeño tamaño (Akira *et al.*, 2006; Kawai y Akira, 2008).

Los mecanismos que intervienen en el reconocimiento del dsRNA por TLR3 en humanos fueron determinados mediante el análisis estructural de su dominio extracelular. Dicha porción presenta forma de una gran herradura que consigue aumentar el área de superficie y así facilitar su interacción con el dsRNA en las paredes internas de la zona convexa. Tras la unión del ligando, el receptor se estabiliza para formar un **homodímero** e iniciar una vía de **señalización MyD88 independiente** (Choe *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 2006). Dicha cascada de señales comienza con la interacción del dominio TIR de TLR3 con TRIF y termina induciendo la producción de **citocinas proinflamatorias**, mediada por **NF- κ B** y **AP-1**, y de **interferones de tipo I**, principalmente de **IFN α** , activada por la fosforilación de **IRF3** y su consiguiente homodimerización (Blasius y Beutler, 2010; Alexopolou *et al.*, 2001). De modo que TLR3 ejerce potentes actividades antivirales e inmunoestimuladoras, presentándose como un sensor central en la defensa frente a la infección por ciertos virus. Se ha comprobado que la ausencia de TLR3 en ratones aumenta el efecto letal de la infección por citomegalovirus murino (Tabeta *et al.*, 2004) y que la deficiencia de este receptor en humanos se asocia a una mayor susceptibilidad al virus del herpes simple de tipo I (HSV-1) (Zhang *et al.*, 2007).

La identificación del **TLR7** se realizó gracias a su capacidad para reconocer moléculas del grupo de las imidazoquinolinas, como **imiquimod** (R-837), **resiquimod** (R-848), y a análogos de guanina, como la loxoribina. Aunque estos compuestos sintéticos, relacionados estructuralmente con ácidos nucleicos, habían sido descritos como potentes antivirales y antitumorales, su mecanismo de

actuación era desconocido hasta que se demostró que consiguen activar a las células inmunes a través de TLR7 y TLR8 (Hemmi *et al.*, 2002; Jurk *et al.*, 2002). Posteriormente, se han identificado diferentes ligandos de origen natural para este receptor, que es capaz de reconocer moléculas de **ssRNA**, de origen viral y no viral. Así, TLR7 reconoce moléculas de ssRNA ricas en uridina o en guanosina derivadas de virus de RNA como el virus influenza A y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). También puede detectar ssRNA poly(U) de origen sintético, determinados siRNA y RNA de mamíferos, presentando, este último, una menor capacidad para inducir su estimulación que se ha relacionado con la modificación de nucleótidos que suele presentar dicho RNA (Kariko *et al.*, 2005; Diebold *et al.*, 2004; Heil *et al.*, 2004).

TLR7 inicia una **señalización dependiente de MyD88** que puede variar en función del tipo celular que se analice. Así, se ha observado que en macrófagos y DCs convencionales, promueve la síntesis de citocinas proinflamatorias mediante la activación del factor de transcripción NF- κ B. Mientras que en las DCs plasmacitoides (pDCs), además, conduce a la fosforilación del IRF7 que actúa como mediador de la notable producción de IFN de tipo I, principalmente IFNs α y β , que caracteriza a estas células. Por tanto, TLR7 se perfila como un sensor de ssRNA clave en la activación de las respuestas de defensa del sistema inmune (Kawai y Akira, 2010; Blasius y Beutler, 2010).

1.9.1.4. TLRs, homeostasis y enfermedad

Debido al papel central que juegan los TLRs en la regulación de la respuesta inmune innata y de la adaptativa, se considera que una **activación aberrante** de los mismos podría estar implicada en la inducción, progresión o exacerbación de diferentes procesos patológicos. La estimulación descontrolada de las **vías de señalización** que inician los TLRs, supondría un exceso en la producción de mediadores inflamatorios y una activación inapropiada de las células presentadoras de antígeno, facilitando el desarrollo de procesos inflamatorios y/o autoinmunes.

Por otra parte, tal y como se ha señalado anteriormente, algunos TLRs pueden ser activados en ausencia de infección, cuando existe daño tisular o en diversas situaciones patológicas, al detectar tanto los residuos generados en la degradación de macromoléculas o en las cascadas proteolíticas, como los componentes intracelulares de las células muertas y los productos de genes activados por inflamación (Beg, 2002; Janssens y Beyaert, 2003). Esta capacidad para reconocer **ligandos endógenos** de los TLRs es clave en las situaciones de daño tisular, ya que activan las cascadas de señalización que dan lugar a la expresión de gran variedad de genes implicados en el proceso de regeneración tisular (Zhang y Schluesener, 2006). Sin embargo, también es posible que el reconocimiento de determinados ligandos endógenos se produzca de manera accidental o descontrolada y que las subsiguientes respuestas inflamatorias e inmunes tengan consecuencias fisiológicas e inmunológicas patológicas, representando un mecanismo que potencie el desarrollo de procesos inflamatorios y autoinmunes (Kawai y Akira, 2010).

Numerosos trabajos han demostrado la **participación de los TLRs** en el establecimiento de gran variedad de **procesos patológicos**, tanto en infecciones agudas y crónicas, como en enfermedades inflamatorias y/o de tipo autoinmune (Papadimitraki *et al.*, 2007; Kawasaki *et al.*, 2011).

Entre dichas patologías se encuentra la **AR**, en la que los datos obtenidos, tanto en el estudio de modelos animales como en muestras de pacientes, evidencian que las vías de señalización de los

TLRs son claves en su desarrollo. Así, en el **modelo murino** de artritis inducida por pared celular estreptocócica, se ha demostrado que en ausencia de MyD88, no se desarrolla la enfermedad y que los ratones deficientes en TLR2, presentan una significativa reducción en la severidad de los síntomas (Joosten *et al.*, 2003). También se ha descrito como la inyección intraarticular de peptidoglicano de *Staphylococcus*, de DNA CpG o de dsRNA en ratones, conduce al desarrollo de una forma de artritis limitada (Deng *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Zare *et al.*, 2004).

Tanto en el **tejido sinovial de pacientes con AR**, como en las **células sinoviales** aisladas (FLS y MLS), se detecta una elevada expresión de determinados TLRs (Brentano *et al.*, 2005a). Así, se ha descrito que la presencia de TLR3 y TLR7 es mayor en la membrana sinovial de AR que en controles sanos (Roelfs *et al.*, 2005) y que los niveles de TLR3 y TLR4 en AR son superiores a los de OA (Ospelt *et al.*, 2008). También se ha demostrado un aumento de la expresión de TLR2 en las zonas de erosión del cartílago y el hueso (Seibl *et al.*, 2003). En cuanto a la presencia de TLRs en los sinoviocitos fibroblásticos, el análisis de expresión del mRNA, muestra un mayor nivel de los transcritos de TLR3, TLR4 y TLR2 en los FLS de AR que en los de OA (Ospelt *et al.*, 2008).

Se ha comprobado la capacidad estimuladora de diferentes ligandos de los TLRs, como LPS (TLR4), peptidoglicano (TLR2) o poly(I-C) (TLR3), sobre **FLS de AR** en cultivo, en los que además de inducir la producción de citocinas proinflamatorias y de MMPs, también promueven la síntesis de RANKL, interviniendo en la contribución de los FLS a los procesos de destrucción ósea en la articulación reumatoide (Goh y Midwood, 2012; Kim *et al.*, 2007b, 2009). Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que la expresión de TLR4 en los FLS puede aumentar en respuesta a LPS y TNF y que tras su estimulación con LPS, se registra un incremento producción de CCL2 e CXCL8 (Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2006; Juarranz *et al.*, 2006). Por su parte, la activación de TLR2 también induce la expresión de VEGF y de varias quimiocinas, entre las que se encuentra CCL5, CXCL8, CCL8/MCP-2, etc (Kyburz *et al.*, 2003; Pierer *et al.*, 2004), mientras que la estimulación con poly(I-C), conlleva un aumento de la síntesis de IFNs de tipo I, IL-6, MMP1 y MMP3 (Sweeney *et al.*, 2007).

En el **ambiente articular reumatoide** también se ha demostrado la presencia de **potenciales ligandos de TLRs**, tanto de tipo exógeno como endógeno, capaces de inducir la activación de las rutas de señalización que conducen a la síntesis de mediadores inflamatorios y de destrucción articular (Brentano *et al.*, 2005a). Junto a ligandos exógenos, como peptidoglicanos y ácidos nucleicos bacterianos, también se han descrito ligandos de origen endógeno como fibrinógeno, ácido hialurónico y proteínas de choque térmico capaces de activar a TLR4, habiendo sido descritas estas últimas como participantes en la patogénesis de la artritis (van der Heijden *et al.*, 2000; Gaston, 1997; Roelofs *et al.*, 2006).

En esta misma línea, en la sinovial reumatoide se han detectado diferentes tipos de **virus**, tales como parvovirus B19, virus Epstein-Barr o Citomegalovirus, que representan potenciales ligandos para TLR3 (dsRNA) y TLR7 (ssRNA) (Takahashi *et al.*, 1998; Saal *et al.*, 1999; Takei *et al.*, 1997; Hamerman *et al.*, 1982). Asimismo, en el líquido sinovial de pacientes con AR se ha observado que el **contenido en dsRNA** es superior al de muestras de OA, siendo mayor la frecuencia del dsRNA de origen viral en los pacientes con un proceso erosivo de AR (Bokarewa *et al.*, 2008). Por otro lado, el RNA liberado por la necrosis de células de mamíferos constituye un ligando endógeno de TLR3 (Brentano *et al.*, 2005b). De hecho, se ha comprobado que el dsRNA de las células necróticas del

líquido sinovial es capaz de estimular el TLR3 en FLS de la sinovial reumatoide, induciendo la producción de IFNs de tipo I y de las quimiocinas CXCL10 y CCL5 (Karikó *et al.*, 2004; Bokarewa *et al.*, 2008). De modo que la señalización de TLR3 activada por moléculas de dsRNA, de origen vírico o endógeno, parece contribuir a la patogénesis de la AR, siendo ésta hipótesis también sustentada por el efecto artrítico del dsRNA en las articulaciones de ratones (Magnusson *et al.*, 2006; Zare *et al.*, 2004).

1.9.2. Receptores tipo RIG-I (RLRs, RIG-I Like Receptors)

Los RLRs son una familia de **helicatas de RNA** que funcionan como **sensores citoplásmicos** de los PAMPs presentes en el RNA viral. Estos PRRs citoplásmicos son expresados por múltiples tipos celulares y la unión con sus ligandos desencadena una cascada de señalización que termina activando la expresión de **IFNs de tipo I** y de **genes de respuesta antiviral**. Juegan un papel importante en el inicio de los mecanismos de defensa innata en las células mieloides, epiteliales y en las del SNC, mientras que no son imprescindibles para la síntesis de IFN por las pDCs. Su expresión suele ser reducida en ausencia de estímulo, siendo inducida por la exposición a IFN o tras una infección vírica (Loo y Gale, 2011; Kang *et al.*, 2004; Yoneyama *et al.*, 2004, 2005).

En la actualidad, se conoce la existencia de tres RLRs: **RIG-I** (gen inducible por ácido retinoico-I), **MDA5** (factor 5 asociado a la diferenciación de melanoma 5) y **LPG2** (laboratorio de genética y fisiología 2, homólogo a D11lgp2 de ratón) (Loo y Gale, 2011). RIG-I es la helicasa que da nombre a la familia de los RLRs, siendo la más estudiada y la mejor conocida.

1.9.2.1. Estructura y ligandos

Las helicasas RIG-I y MDA5 presentan una serie de características estructurales comunes, diferenciándose tres segmentos distintos en su organización. La región amino terminal consiste en un par de dominios de reclutamiento y activación de caspasa (**CARDs**) implicados en la transducción de la señal; la zona central contiene un **dominio helicasa** con capacidad para hidrolizar ATP y unirse a RNA, por último, el segmento carboxilo terminal que incluye un dominio represor (**RD**), en el caso de RIG-I implicado en su autorregulación (Yoneyama *et al.*, 2004, 2005; Saito *et al.*, 2007). A pesar de que la organización de LGP2 es similar a las anteriores, ésta carece de los dominios CARDs y se sugiere que su función sea la de actuar como un regulador de la señalización de RIG-I y MDA5 (Yoneyama *et al.*, 2005).

Inicialmente, **RIG-I** fue caracterizado como una proteína de unión a dsRNA inductora de la síntesis de IFN y de la señalización antiviral (Yoneyama *et al.*, 2004). Más tarde, se identificó como un factor clave en la resistencia de las células frente a la replicación del virus de la hepatitis C (Sumpter *et al.*, 2005). Estudios moleculares posteriores han demostrado que RIG-I reconoce preferentemente secuencias de **RNA con terminaciones 5' trifosforiladas**, motivo asociado a RNA exógeno, y que modificaciones monofosfato o difosfato de dicha terminación, conllevan una notable atenuación de la respuesta, llegando a desaparecer en ausencia de la triple fosforilación (Hornung *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). Aunque siguen sin conocerse exactamente las características de los PAMPs que activan a estas helicasas inductoras de la producción de IFN, los datos obtenidos hasta el momento indican que en la identificación del RNA viral, además del motivo 5' trifosforilado y de la longitud de las

moléculas, también resulta crucial la composición de la secuencia y los motivos secundarios que ésta pudiese presentar como producto de un procesamiento previo (Loo y Gale, 2011).

La familia de los RLRs ha sido implicada en el reconocimiento de una gran variedad de **virus**. Diferentes estudios han demostrado que RIG-I es capaz de reconocer virus del género *Hepacivirus* y de las familias *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* y *Orthomyxoviridae*, mientras que MDA5 está asociado a la detección de especies de *Picornaviridae* (Kato *et al.*, 2006). Se ha descrito que determinados virus, entre los que se incluyen el virus del dengue, el WNV y reovirus, presentan PAMPs que pueden ser reconocidos por RIG-I y MDA5 en caso de infección en fase aguda (Fredericksen *et al.*, 2008; Loo *et al.*, 2008). Por su parte, aunque LPG2 puede unirse a RNA, no ha sido demostrada su intervención en la detección de RNA durante la infección viral (Yoneyama *et al.*, 2005).

Tabla 6. Tipos de virus que reconocen los RIG-I y MDA5.

VIRUS DETECTADOS POR RIG-I	VIRUS DETECTADOS POR MDA5
Paramyxoviridae, ssRNA (-), no segmentado	Picornaviridae, ssRNA (+), no segmentado
Virus Sendai Kato <i>et al.</i> , 2005 Yoneyama <i>et al.</i> , 2005	Virus encefalo-miocarditis Gittlin <i>et al.</i> , 2006 Kato <i>et al.</i> , 2006
Virus enfermedad Newcastle Kato <i>et al.</i> , 2005	Virus de Theiler Kato <i>et al.</i> , 2006
Virus sincitial respiratorio Loo <i>et al.</i> , 2008	Virus de Mengo Kato <i>et al.</i> , 2006
Sarampión Plumet <i>et al.</i> , 2007	Virus ADN
Nipah Habjan <i>et al.</i> , 2008	Vaccina virus Pichlmair <i>et al.</i> , 2009
Parainfluenza humano 5 Luthra <i>et al.</i> , 2011	FLAVIVIRUS DETECTADOS POR RIG-I y MDA5
Rhabdoviridae, ssRNA (-), no segmentado	Flaviviridae
Virus estomatitis vesicular Kato <i>et al.</i> , 2005 Yoneyama <i>et al.</i> , 2005	Virus encefalitis japonesa Kato <i>et al.</i> , 2006
Virus de la rabia Hornung <i>et al.</i> , 2006	Virus del dengue Loo <i>et al.</i> , 2008
Orthomyxoviridae, ssRNA (-), no segmentado	Virus West Nile Fredericksen <i>et al.</i> , 2008
Influenza A Kato <i>et al.</i> , 2006	Reoviridae, dsRNA, segmentado
Influenza B Loo <i>et al.</i> , 2008	Reovirus Kato <i>et al.</i> , 2008 Loo <i>et al.</i> , 2008
Filoviridae, ssRNA (-), no segmentado	
Ebola Habjan <i>et al.</i> , 2008	
Arenaviridae, ssRNA (-), segmentado	
Lassa Habjan <i>et al.</i> , 2008	
Virus coriomeningitis linfocítica Zhou <i>et al.</i> , 2010	
Bunyaviridae, ssRNA (-), segmentado	
Virus fiebre del Valle Rift Habjan <i>et al.</i> , 2008	
Flaviviridae, ssRNA (+), no segmentado	
Virus hepatitis C Sumpter <i>et al.</i> , 2005 Saito <i>et al.</i> , 2007	
Coronaviridae, ssRNA (+), no segmentado	
Virus hepatitis murino Roth-Cross <i>et al.</i> , 2008	
Caliciviridae, ssRNA (+), no segmentado	
Norovirus murino-1 McCartney <i>et al.</i> , 2008	
Virus ADN	
RNA virus Epstein Barr Samanta <i>et al.</i> , 2006	
Virus del mixoma Wang <i>et al.</i> , 2008	

1.9.2.2. Vías de señalización asociadas a RLRs

Entre los mecanismos de señalización que activan los RLRs, los mejor caracterizados son los asociados a RIG-I, siendo bastante reducido el conocimiento de las respuestas intracelulares que desencadenan MDA5 y LGP2. No obstante, se ha comprobado que tanto RIG-I como MDA5 inducen la producción de IFN mediante una vía de señalización cuyo inicio depende de la proteína adaptadora **IPS-1**, también conocida como MAVS, VISA o Cardif. IPS-1 es una proteína que contiene un dominio CARD y se localiza en la membrana de mitocondrias y peroxisomas. La detección del RNA viral por estas helicinas, induce su unión a IPS-1 mediante **interacciones homotípicas CARD-CARD**, iniciándose una cascada de señalización que termina en la activación de los factores de transcripción **NF- B, IRF3 e IRF7**, responsables de la síntesis de IFN de tipo I y la inducción de un estado celular antiviral (Eisenächer y Krug, 2012; Schmidt *et al.*, 2012). La activación de ambos IRFs depende de su fosforilación por IKK o por TBK1 en la ruta de transducción de la señal. Una vez fosforilados, forman homodímeros y heterodímeros capaces de unirse a las secuencias diana para modular la transcripción de determinados genes. Mientras que la expresión de IRF3 es constitutiva en la mayoría de los tipos celulares estudiados, IRF7 aparece en niveles muy bajos, siendo inducible por la presencia de IFN en un proceso de retroalimentación positiva (Sato *et al.*, 1998). De modo que IRF3 actuaría como un factor de transcripción inmediato, mientras que IRF7 estaría implicado en procesos transcripcionales tardíos (Dixit *et al.*, 2010).

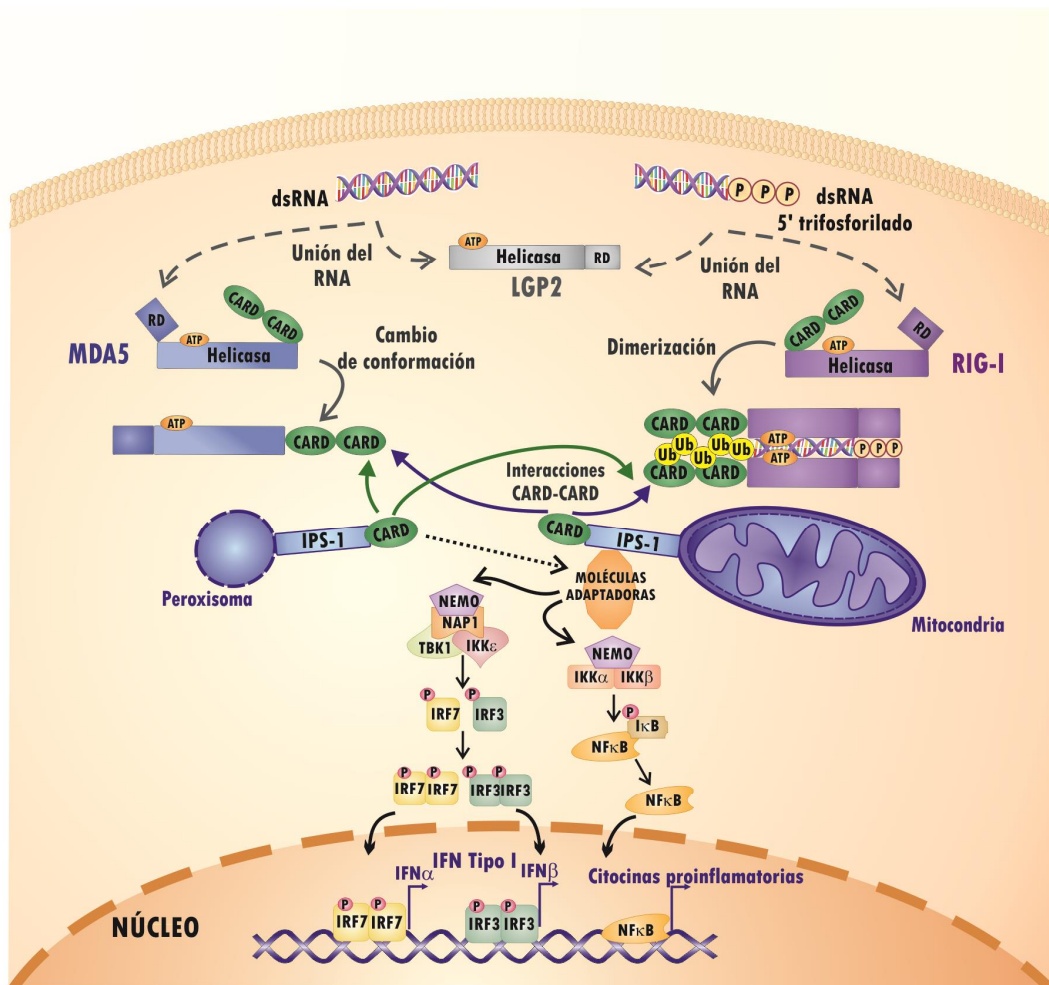


Figura 21. Vías de señalización de los RLRs.

Por otra parte, análisis estructurales y funcionales de RIG-I, han revelado que su señalización depende de un proceso de **autorregulación**, en el que resultan claves las **interacciones intramoleculares** que se establecen entre los dominios CARDs y RD (Saito *et al.*, 2007). En dicho modelo de regulación, se propone que **la unión del ligando** conlleve un **cambio conformacional** en RIG-I que permita que los CARDs se liberen de la represión del RD, permitiendo su interacción con la proteína adaptadora IPS-1, para inducir la producción de IFN y la expresión de los genes de defensa frente a las infecciones virales (Schmidt *et al.*, 2012). Por tanto, la activación de RIG-I depende tanto de las características de la molécula de RNA, como del cambio conformacional que afecta a las interacciones entre los dominios de la propia helicasa, mientras que el inicio de la señalización de MDA5 parece estar controlado por una serie de proteínas específicas. En este sentido, se ha propuesto que **LGP2** pueda actuar como un **modulador** de RIG-I y, posiblemente de MDA5, a través de la interacción con los dominios RD (Saito *et al.*, 2007). La modificación postranslacional de los mediadores de la señalización de los RLRs, como puede ser su ubiquitinización, constituye un mecanismo adicional en la regulación de las respuestas de los RLRs.

Por tanto, la existencia de diferentes sistemas de **control de la señalización** iniciada por los RLRs, podría interpretarse como una evidencia de la necesidad de evitar una **activación excesiva** de la misma, ya que conllevaría una producción descontrolada de citocinas e IFNs de tipo I que podría suponer el desarrollo de **procesos inflamatorios y autoinmunes**. En este sentido, la actividad de RIG-I ha sido asociada con diferentes enfermedades inflamatorias crónicas, tales como nefritis asociada a LES, psoriasis y aterosclerosis (Suzuki *et al.*, 2007; Kitamura *et al.*, 2007; Imaizumi *et al.*, 2007). Además, diferentes estudios han señalado la participación de dicha helicasa en el establecimiento de la **inflamación sinovial en la AR**, relacionando su activación con las hipótesis sobre la etiología de esta enfermedad que proponen como un factor desencadenante a las infecciones por virus o bacterias. En este sentido, para RIG-I se ha observado que, además de actuar como un sensor citoplásmico de RNA viral, su síntesis también puede ser inducida tras la estimulación con componentes bacterianos (Imaizumi *et al.*, 2002, 2006). Tampoco se descarta la posibilidad de que este sensor pueda ser activado, en determinadas circunstancias, por **ácidos nucleicos de origen endógeno**, precipitando el desarrollo de trastornos de tipo autoinmune (Kawasaki *et al.*, 2011). Concretamente, se ha descrito que la presencia de RIG-I en el tejido sinovial de pacientes con AR es mayor que en OA y que su expresión, en FLS de AR en cultivo, aumenta en respuesta a IFN γ y también a TNF α con mediación del IFN γ , siendo estos estímulos inductores de la síntesis de las quimiocinas proinflamatorias CXCL10 y CCL5, respectivamente. De modo que RIG-I podría estar implicado en las reacciones inflamatorias que se localizan en la membrana sinovial de las articulaciones afectadas por la AR (Imaizumi *et al.*, 2008, 2009).

1.10. La interleucina IL-22

En los últimos años la **IL-22** ha emergido como una citocina implicada en el **proceso inflamatorio sinovial**. No obstante, la relativa novedad de su descripción y la complejidad en el análisis de sus efectos funcionales, que incluyen tanto actividades protectoras como proinflamatorias, han determinado que todavía sean numerosas las cuestiones por resolver acerca de su actividad local en las articulaciones afectadas por enfermedades reumáticas.

A continuación se apuntarán las principales características moleculares de la IL-22, así como las actividades biológicas que se le atribuyen, profundizando en la descripción de los datos relativos a su función en los procesos reumáticos articulares.

1.10.1. Características moleculares de la IL-22

La IL-22, descrita por el grupo de Renauld *et al* en el año 2000, pertenece a la familia de citocinas de la IL-10, en la que también se agrupan IL-19, IL-20, IL-24 e IL-26 en base a la similitud en su estructura genética y proteica, así como en la de los receptores a los que se acoplan y en las vías de señalización que desencadenan. Sin embargo, a pesar de los rasgos comunes que comparten los miembros de esta familia, presentan actividades biológicas muy diferentes, pudiendo incluso llegar a ser opuestas al efecto antiinflamatorio e inmunosupresor de la propia IL-10 (Wolk *et al.*, 2010).

La IL-22 ejerce sus efectos a partir de su unión a un **receptor** transmembrana heterodimérico compuesto por las **cadena IL-22R1** e **IL-10R2**. Frente a la expresión ubicua de la cadena IL-10R2, la presencia de **IL-22R1** queda restringida a determinadas **células de origen no inmune**, convirtiéndose éstas en dianas específicas de la IL-22. De modo que, aunque la IL-22 ha sido clasificada como una interleucina, el hecho de que no ejerza un efecto directo sobre las células del sistema inmune, que carecen de IL22-R1 tanto en estado basal como activado, sugiere que se trate de un nuevo tipo de mediador inmune capaz de regular diferentes funciones de ciertas células tisulares (Witte *et al.*, 2010). La expresión de la cadena IL-22R1 ha sido detectada en células de diferentes tejidos, entre las que se incluyen queratinocitos, fibroblastos dérmicos, células epiteliales de bronquios e intestino, miofibroblastos subepiteliales intestinales, hepatocitos, células acinares pancreáticas y sinoviocitos fibroblásticos de pacientes con AR, OA y artritis psoriásica (Witte *et al.*, 2010; Mitra *et al.*, 2012). Además, la capacidad de respuesta de las células frente a IL-22 puede aumentar por el efecto de diferentes estímulos, tal y como se ha comprobado en el caso de los queratinocitos y de los fibroblastos dérmicos, que incrementan la expresión de IL-22R1 e IL-10R2 en presencia de las citocinas proinflamatorias TNF e IFN (Wolk *et al.*, 2004, 2009).

La vía de señalización intracelular principalmente activada por la IL-22, al igual que otros miembros de la familia de la IL-10, es la **JAK/STAT**. La unión de IL-22 a su receptor resulta en una fosforilación de JAK1 y Tyk2, pero no de JAK2, pudiendo activar a tres moléculas STAT: STAT1, STAT3 y STAT5, entre las que la fosforilación en tirosina de STAT3 es la más común (Ouyang *et al.*, 2011). No obstante, también se ha descrito que esta citocina puede inducir una activación de la vía de las MAPK en los queratinocitos (ERK1/2, JNK), en miofibroblastos subepiteliales intestinales (ERK1/2, JNK, p38) y en FLS de pacientes con AR (ERK1/2, p38) (Witte *et al.*, 2010).

La IL-22 es producida por diferentes tipos de células linfoides del sistema inmune innato y del adaptativo. Entre éstas se incluye a las células T de memoria CD4+, concretamente a las subpoblaciones a **Th1**, **Th17**, **Th22**, y a las células natural killer (**NK**) clásicas, **NK-22** y las inductoras de tejido linfóide (**LTi**) (Zhang *et al.*, 2011). Sin embargo, en la mayoría de los estudios *in vivo* realizados sobre la IL-22 no se ha determinado el tipo celular concreto responsable de su secreción, cuya identificación permitiría avanzar en el conocimiento y la comprensión de las diversas funciones biológicas que presenta esta citocina (Zenewicz y Flavell, 2011).

1.10.2. Funciones biológicas de la IL-22

La IL-22 se caracteriza por su **ambivalencia funcional**, ya que si bien se ha reconocido que su función biológica principal es la de aumentar la inmunidad innata, proteger frente al daño tisular y potenciar la regeneración, también se ha observado que en las enfermedades inflamatorias crónicas puede ejercer una función protectora o, por el contrario, altamente patogénica (Sonnerberg *et al.*, 2011). Así, se le atribuye un papel protector en determinados modelos animales de enfermedades inflamatorias agudas como la hepatitis y en procesos inflamatorios crónicos como la enfermedad inflamatoria intestinal, mientras que en enfermedades autoinmunes inflamatorias como la psoriasis, la enfermedad de Crohn o la AR, se presenta como un mediador proinflamatorio (Radaeva *et al.*, 2004; Zenewicz *et al.*, 2007). De modo que se ha sugerido que su efecto biológico final dependa del tipo de tejido que se encuentre afectado y del conjunto de citocinas presentes en el entorno, actuando de manera sinérgica con IL-17, TNF e IFN en un contexto proinflamatorio (Zhang *et al.*, 2011).

Un claro ejemplo de la **naturaleza dual de la IL-22** queda reflejado en el estudio de sus efectos sobre la piel, siendo los queratinocitos uno de los tipos celulares en los que mejor se ha caracterizado la respuesta a la IL-22. Aunque la IL-22 ejerce un papel beneficioso en la **regeneración** de este tejido y en su **defensa** frente a infecciones, también se ha descrito un **efecto patogénico** en la psoriasis. En los queratinocitos esta citocina actúa potenciando su respuesta inmunitaria, al estimular producción de **proteínas antimicrobianas** como las α -defensina 2, α -defensina 3 y de **alarminas** como S100A7, S100A8 y S100A9; reduciendo la expresión de moléculas reguladoras de su diferenciación terminal, como filagrina (FLG), queratina 1 (KRT1) o calicreína 7 (KLK7), y aumentando la síntesis de **proteasas** que facilitan la migración, tales como MMP1 y MMP3. Sin embargo, se ha observado que en la piel de pacientes con psoriasis, los niveles elevados de IL-22 se asocian a una expresión aumentada de la MMP1 y de las alarminas S100A7, S100A8 y S100A9, siendo estas últimas reconocidas como moléculas proinflamatorias en otras enfermedades inflamatorias como la AR y la OA, analizadas con más detalle posteriormente (Wolk *et al.*, 2006). Además, en los pacientes con psoriasis existe una correlación entre los niveles elevados de IL-22 que presentan en plasma y la severidad de la enfermedad, registrándose un descenso de dichos valores tras la aplicación de una terapia de éxito (Wolk *et al.*, 2006; Caproni *et al.*, 2009). Estos resultados van en la misma dirección que los obtenidos en un modelo murino de esta patología, en los que el tratamiento con anticuerpos neutralizantes de IL-22 evita el desarrollo de la enfermedad, reduciendo la acantosis y los infiltrados inflamatorios (Ma *et al.*, 2008).

Asimismo, en pacientes con **enfermedad de Crohn** también aparece una asociación entre una mayor actividad de la enfermedad y niveles elevados de IL-22 en plasma. Además, se ha comprobado que la IL-22 induce un aumento de la expresión de TNF y CXCL8 por las células epiteliales intestinales (Brand *et al.*, 2006).

1.10.2.1. Papel de la IL-22 en AR

Distintos trabajos atribuyen un papel clave a la IL-22 en diferentes procesos patogénicos localizados en las articulaciones afectadas por la AR, tales como inflamación, proliferación sinovial y destrucción de la estructura articular.

En el año 2005 el grupo de Nojima describió la **presencia de IL-22** en el tejido sinovial de pacientes con AR, identificando a los **MLS** y **FLS** como los tipos celulares en los cuales se localiza la expresión de dicha citocina. En este mismo trabajo se demostraba la presencia de **IL-22R1** en los **FLS**, comprobándose que la estimulación *in vitro* con IL-22 induce en ellos un aumento de la **proliferación** y de la producción de CCL2, una quimiocina crítica para el reclutamiento de macrófagos en las articulaciones durante el proceso inflamatorio reumatoide (Ikeuchi *et al.*, 2005).

Posteriormente, se estudió el papel de la IL-22 en el **modelo murino de CIA** y se observó que su nivel en suero de los animales en los que había sido inducida la enfermedad era mayor al de los animales no tratados. Además, mediante la utilización de ratones mutantes carentes de IL-22 se demostró que éstos eran más resistentes a desarrollar artritis, presentado un menor grado de formación de *pannus* y de destrucción ósea, así como un descenso de la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 , IL-6, TNF y de la MMP9. También comprobaron que la IL-22 estimulaba la diferenciación y la actividad de los osteoclastos *in vitro*, lo cual evidenciaba su participación en el proceso de destrucción ósea articular de la artritis (Geboes *et al.*, 2009).

Por tanto, la información aportada por el equipo de Nojima y los resultados obtenidos del modelo de CIA presentaban a la IL-22 como un posible mediador de los procesos articulares en la AR. De hecho, diferentes trabajos de reciente publicación han permitido validar en **humanos** alguna de las **actividades patogénicas** atribuidas a la IL-22 en el modelo murino, siendo aún limitado el conocimiento de sus efectos funcionales en el ambiente articular. Así, el equipo de Skapenko describe que el 50% de los pacientes de AR incluidos en su estudio presentan un nivel elevado de **IL-22 en suero** y que éste está asociado a un desarrollo temprano de **erosiones óseas articulares**. De modo que proponen a la IL-22 como un marcador serológico que podría resultar útil para predecir la evolución radiográfica de la enfermedad e incluso para diseñar nuevas estrategias en el tratamiento de pacientes en fases iniciales de la AR (Leipe *et al.*, 2011).

En esta misma línea, el grupo de Lee, además de haber corroborado que la concentración de IL-22 en suero de pacientes con AR es elevada, ha descrito que ésta es superior a la de pacientes con OA y a la de individuos sanos, y que correlaciona con los niveles séricos de **FR** y de **ACPA** (Kim *et al.*, 2012). Resultados que coinciden con los publicados unos meses después por el grupo de da Rocha Pitta, en los que detectan que los niveles de **IL-22 en suero** de pacientes con AR son superiores a los de individuos control y que dichos valores correlacionan con la actividad de la enfermedad, siendo mayores en los pacientes **FR+** y en los que manifiestan **erosiones óseas** (da Rocha *et al.*, 2012). En el trabajo de Kim *et al.*, además detectan niveles de **IL-22** mayores en el **líquido sinovial** de pacientes con AR que en el de pacientes con OA, existiendo una relación proporcional entre los niveles de dicha citocina y los de **RANKL**, molécula clave en la diferenciación de los osteoclastos. Sus resultados *in vitro* también demuestran que la IL-22 estimula la producción de RANKL en los FLS de AR e induce la **osteoclastogénesis** mediante la activación de las vías de señalización JAK2/STAT3 y p38 MAPK/NF- B (Kim *et al.*, 2012).

Por tanto, a pesar de que los datos obtenidos hasta el momento apuntan hacia un papel patogénico de la IL-22 en el proceso destructivo articular, todavía es escaso el conocimiento del efecto de dicha citocina sobre la funcionalidad de los FLS, células implicadas activamente en el mantenimiento de la sinovitis y la progresión de los procesos destructivos propios de la OA y la AR.

Asimismo, sigue sin conocerse el origen celular concreto de los altos niveles de IL-22 en los pacientes con AR, aunque se ha observado un incremento del número de **células T CD4+** que expresan IL-22 en circulación periférica y una presencia elevada de células **NK-22** en líquido sinovial de dichos pacientes (Zhang *et al.*, 2012; Colin *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2011).

1.11. Las alarminas S100A8 y S100A9

A pesar de que S100A8 y S100A9 fueron identificadas por primera vez, hace más de dos décadas, en los macrófagos del infiltrado sinovial reumatoide (Odink *et al.*, 1987), ha sido en los últimos años cuando se ha profundizado en la investigación de su papel en los procesos destructivos articulares.

1.11.1. Características moleculares de S100A8 y S100A9

Las alarminas S100A8/MRP-8 y S100A9/MRP-14 pertenecen a la familia de las proteínas de unión a calcio S100 y se asocian para formar un **heterodímero funcional S100A8/A9**, conocido como calgranulina o calprotectina. En este complejo, S100A8 se presenta como el componente activo, mientras que S100A9 regula la función y evita su degradación. Dichas alarminas son producidas principalmente por macrófagos activados, habiéndose comprobado que éstos aumentan su secreción en respuesta a mediadores inflamatorios como IL-1, TNF o IFN y que el dímero S100A8/A9, a su vez, induce una respuesta proinflamatoria en leucocitos y células endoteliales (Perera *et al.*, 2010; Gebhardt *et al.*, 2006). Aunque los receptores y las vías de señalización que emplean siguen sin ser completamente conocidos, ambas alarminas han sido identificadas como activadores endógenos del receptor TLR4 (Vogl *et al.*, 2007; Ehrchen *et al.*, 2009; Schelbergen *et al.*, 2012).

1.11.2. S100A8 y S100A9 en la AR y en la OA

Un amplio conjunto de evidencias sugieren la implicación de S100A8 y S100A9 en el proceso inflamatorio sinovial. Estudios histológicos muestran que en las articulaciones afectadas por la **AR** existe una mayor presencia de ambas alarminas en el límite entre el *pannus* y las estructuras articulares sobre las que éste se extiende, coincidiendo con las **zonas de destrucción** del hueso y el cartílago (Youssef *et al.*, 1999; Kane *et al.*, 2003). Además, la **concentración** de estas proteínas también se encuentra aumentada en **líquido sinovial** y en **plasma** de los pacientes con AR, habiéndose descrito una correlación entre dichos niveles y la **severidad de la enfermedad** que podría permitir predecir su progresión radiográfica con un margen de 10 años (Chen *et al.*, 2009; Sunahori *et al.*, 2006; Hammer *et al.*, 2010). Asimismo, en un **modelo experimental murino de AIA**, se ha demostrado que S100A8/S100A9 cumple un papel clave en el proceso inflamatorio y en la destrucción del cartílago articular (van Lent *et al.*, 2008). También en este modelo, se ha descrito que S100A8 es capaz de potenciar la resorción ósea osteoclástica mediante la activación de TLR4 (Grevers *et al.*, 2011) y que la inyección intraarticular de dicha alarmina provoca un aumento de la expresión de citocinas proinflamatorias y MMPs en la capa íntima de la sinovial (van den Berg, 2008). En esta misma línea, recientemente ha sido demostrado que el tratamiento con un anticuerpo anti-S100A9 induce una reducción del 50% del grado clínico en un modelo murino de artritis,

observándose una disminución del infiltrado inflamatorio y de las citocinas presentes en suero y en las articulaciones (Cesareo *et al.*, 2012).

Por otra parte, también se ha atribuido un papel patogénico a las alarminas S100A8 y S100A9 en la **OA**, aunque su conocimiento es mucho más limitado que en la AR y las evidencias de su contribución al avance de la enfermedad están basadas, principalmente, en los efectos que presentan sobre los condrocitos. No obstante, tanto en el **líquido sinovial** como en el **plasma de pacientes con OA** se ha detectado una elevación de los niveles de este heterodímero que, aunque sin llegar a manifestar una correlación significativa, guardan cierta relación con la severidad de los síntomas (Sunahori *et al.*, 2006; van Lent *et al.*, 2012).

En los últimos años han sido diferentes los autores que han descrito la implicación de S100A8 y S100A9 en la **destrucción del cartílago articular**. Recientemente el grupo de van den Berg ha demostrado, mediante el estudio comparativo de dos modelos experimentales murinos de OA, que ambas alarminas contribuyen a los procesos catabólicos del cartílago cuando la activación sinovial participa en el establecimiento de la enfermedad. En este mismo estudio también analizan la expresión de S100A8 y S100A9 en biopsias de tejido sinovial de pacientes con OA en diferentes fases de la enfermedad, detectando una expresión elevada de las mismas en todos los casos que, a su vez, correlaciona con el grosor de las capas íntima y subíntima de la membrana sinovial (van Lent *et al.*, 2012). Asimismo, un trabajo de Schelbergen y colaboradores demuestra que estas proteínas S100 promueven un **fenotipo catabólico en condrocitos** aislados de pacientes con OA, potenciando la liberación de MMP1, MMP3 y MMP9 e inhibiendo la síntesis de moléculas de la matriz como colágeno tipo II y agrecano, en un efecto mediado por la señalización de TLR4 (Schelbergen *et al.*, 2012).

En cuanto a las células responsables del aumento de los niveles de ambas alarminas en los pacientes de AR y OA, **macrófagos sinoviales** han sido identificados como la principal fuente de S100A8 y S100A9, aunque también se ha detectado su expresión en **neutrófilos** del líquido sinovial y en **condrocitos** de pacientes con AR (Sunahori *et al.*, 2006; Zreiqat *et al.*, 2007).

Objetivos

2. OBJETIVOS

Como se ha expuesto previamente, la OA y la AR son dos enfermedades reumáticas heterogéneas en su evolución y sintomatología, cuya progresión conlleva la destrucción de las estructuras articulares y, por consiguiente, la discapacidad funcional de las mismas. Aunque siguen sin conocerse los mecanismos patogénicos concretos responsables del daño articular con el que progresan ambas enfermedades, se atribuye una participación activa a las células residentes en los tejidos afectados. Entre estas células destacan los FLS, que manifiestan una alteración de sus propiedades y adoptan un estado activado en el que dejan de desempeñar funciones homeostáticas para convertirse en importantes mediadores de la respuesta inflamatoria sinovial y la destrucción articular.

Las citocinas proinflamatorias del entorno sinovial han sido identificadas como factores que estimulan y amplifican el comportamiento anómalo de los FLS, siendo capaces de modular su capacidad patogénica. Asimismo, la inmunidad innata parece estar directamente implicada en su activación, ya que además de haberse demostrado la expresión y funcionalidad de algunos PRRs en estas células, se ha descrito la presencia de potenciales ligandos de tipo exógeno y endógeno en las articulaciones afectadas.

En los últimos años, el neuropéptido VIP ha emergido como un potencial agente terapéutico en las enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes debido su capacidad inmunomoduladora y a sus efectos antiinflamatorios. Trabajos previos de nuestro grupo han demostrado que VIP es capaz de reducir la respuesta inflamatoria de células sinoviales y FLS aislados de pacientes con OA y con AR, ejerciendo una acción inhibitoria sobre la expresión y señalización de TLR2 y TLR4.

En base a los antecedentes reseñados, nos proponemos profundizar en el estudio de VIP y de los receptores que median su efecto antiinflamatorio en los FLS de pacientes con OA y con AR. Nos planteamos, además, ampliar el análisis de los mecanismos de la inmunidad innata y de las citocinas proinflamatorias que potencialmente participan en la activación del comportamiento patogénico de dichas células. Por último, también abordamos el estudio de las respuestas de los FLS relacionadas con la polarización de las células Th a nivel articular, para así identificar su contribución a la actividad del sistema inmune adaptativo en el proceso patogénico. Consideramos que estas aproximaciones experimentales podrían contribuir a la optimización del diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a combatir el progreso de la inflamación y destrucción articular.

Los objetivos de la presente Tesis Doctoral, siendo el objeto de estudio los sinoviocitos fibroblásticos aislados de la membrana sinovial de pacientes con artrosis y con artritis reumatoide, se resumen en:

- 1. Caracterizar la expresión y regulación del sistema de neuropéptidos VIP/PACAP y de sus receptores VPAC1, VPAC2 y PAC1.**
- 2. Estudiar la expresión y funcionalidad de los PRRs responsables del reconocimiento de moléculas de dsRNA (TLR3, RIG-I y MDA5) y ssRNA (TLR7).**
- 3. Analizar la capacidad moduladora de VIP sobre la expresión y señalización de los sensores de RNA.**
- 4. Examinar el efecto de los mediadores proinflamatorios del ambiente sinovial sobre la expresión de IL-22 y de IL-22R1.**
- 5. Determinar el papel de la IL-22 en los procesos patogénicos articulares mediados por los sinoviocitos fibroblásticos, analizando su efecto sobre la producción de MMPs y la expresión de las alarminas S100A8 y S100A9.**
- 6. Evaluar el efecto del entorno sinovial sobre la capacidad de los FLS para responder a IL-17, examinando la expresión de los receptores IL-17RA e IL-17RC bajo la acción de diferentes mediadores proinflamatorios.**
- 7. Valorar la contribución de los FLS al contenido en citocinas del microambiente articular implicadas en polarización de las subpoblaciones de células T helper hacia Th1 o Th17, analizando el efecto de diversos estímulos sobre su producción de IL-12 e IL-23.**
- 8. Testar la acción moduladora de VIP sobre la expresión de IL-17RA, IL-17RC y de las citocinas IL-12 e IL-23 en los sinoviocitos fibroblásticos sometidos a diferentes condiciones inflamatorias.**

Artículos

ARTÍCULO 1

Juarranz Y, Gutiérrez-Cañas I, Santiago B, Carrión M, Pablos JL, Gomariz RP.

Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts.

Arthritis Rheum. 2008 Apr;58(4):1086-95.

Differential Expression of Vasoactive Intestinal Peptide and Its Functional Receptors in Human Osteoarthritic and Rheumatoid Synovial Fibroblasts

Yasmina Juarranz,¹ Irene Gutiérrez-Cañas,¹ Begoña Santiago,² Mar Carrión,¹ José L. Pablos,² and Rosa P. Gomariz¹

Objective. Vasoactive intestinal peptide (VIP) has shown potent antiinflammatory effects in murine arthritis and ex vivo in human rheumatoid arthritis (RA) synovial cells. To investigate the potential endogenous participation of this system in the pathogenesis of RA, we analyzed the expression and regulation of VIP and its functional receptors in human fibroblast-like synoviocytes (FLS) from patients with osteoarthritis (OA) and patients with RA.

Methods. The expression of VIP was studied by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR), enzyme immunoassay, and immunofluorescence in cultured FLS, and by immunohistochemical analysis in synovial tissue. The expression and function of the potential VIP receptors in FLS were studied by RT-PCR, determination of intracellular cAMP production, cell membrane adenylate cyclase (AC) activity, and interleukin-6, CCL2, and CXCL8 production in response to VIP or specific agonists and antagonists.

Results. VIP expression was detected in human FLS at the messenger RNA and protein levels, and it was significantly decreased in RA FLS compared with OA FLS. VIP receptor type 1 (VPAC₁) was the dominant

AC-coupled receptor in OA FLS, in contrast with RA FLS, in which VPAC₂ was dominant. Tumor necrosis factor α -treated OA FLS reproduced the VIP and VPAC receptor expression pattern of RA FLS. The antagonistic effects of VIP on FLS proinflammatory factor production were reproduced by VPAC₁- and VPAC₂-specific agonists in OA FLS and RA FLS, respectively.

Conclusion. VIP expression is down-regulated in RA and in tumor necrosis factor α -treated FLS, suggesting that down-regulation of this endogenous antiinflammatory factor may contribute to the pathogenesis of RA. In RA FLS, VPAC₂ mediates the antiinflammatory effects of VIP, suggesting that VPAC₂ agonists may be an alternative to VIP as antiinflammatory agents.

The vasoactive intestinal peptide (VIP)/pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) system consists of 2 peptides and 3 receptors: VIP receptor type 1 (VPAC₁), VPAC₂, and PACAP type 1 (PAC₁) receptor. These receptors belong to family 2 of the G protein-coupled receptors, which in recent years have shown remarkable antiinflammatory and immunomodulatory properties (1–3). VPAC₁ is constitutively expressed in macrophages and lymphocytes and binds VIP and PACAP with equal affinity (1,3). VPAC₂ has also been described in lymphocytes and macrophages as an inducible receptor after T cell receptor triggering or lipopolysaccharide (LPS) stimulation (1,3). The best-characterized effects of VIP/PACAP on immune cells are mediated by the adenylate cyclase (AC) pathway coupled to these receptors. Finally, the PAC₁ receptor is the PACAP-specific receptor, although at high concentrations VIP is a heterologous ligand (4). Endogenous VIP and PACAP can be produced by both neural and immune cells, but their regulation and participation in the pathogenesis of human inflammation are not known.

Supported by Universidad Complutense de Madrid grant 910/012 and Ministerio de Ciencia y Tecnología grant SAF2005-1438. Drs. Gutiérrez-Cañas and Santiago's work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria grant FIS05/0060.

¹Yasmina Juarranz, PhD, Irene Gutiérrez-Cañas, PhD, Mar Carrión, MSc, Rosa P. Gomariz, PhD: Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ²Begoña Santiago, PhD, José L. Pablos, MD, PhD: Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain.

Drs. Pablos and Gomariz contributed equally to this work.

Address correspondence and reprint requests to Yasmina Juarranz, PhD, Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. E-mail: yashina@bio.ucm.es.

Submitted for publication June 18, 2007; accepted in revised form December 14, 2007.

Different studies of murine models of arthritis and other inflammatory diseases have consistently demonstrated the potential of exogenous VIP to interfere with both adaptive and innate components of auto-immune inflammatory responses (5–10). Although clinical trials of VIP or related neuropeptides in human inflammatory diseases have not been performed, our previous studies demonstrated that exogenous VIP modulates different proinflammatory pathways *ex vivo* in human rheumatoid arthritis (RA) synovial cells (11,12). The detection of several neuropeptides, including VIP, in human arthritic joints suggests that endogenous VIP might play a regulatory role in response to joint inflammation (13,14). Results of previous studies point to variable inflammation-regulated expression of VIP as well as the different VIP receptors in murine cells, but information regarding human inflammatory cells is scarce (15).

Fibroblast-like synoviocytes (FLS) are an abundant synovial cell population and play essential roles in RA pathogenesis by contributing to inflammation and joint destruction (16,17). These cells produce a variety of mediators such as chemokines, cytokines, and cell-surface molecules that contribute to the chronic inflammatory process and to bone and cartilage destruction. According to previous studies by our group and by other investigators, VIP antiinflammatory signaling is functional in human FLS, but the ability of these cells to synthesize VIP or to regulate VIP or VIP receptor expression under inflammatory conditions has not been investigated (11,12). Alternatively, because VIP and related neuropeptides are short-lived peptides, identification of specific antiinflammatory signaling receptors in relevant human cellular models is needed to develop antiinflammatory VIP agonists. Therefore, we studied the expression and regulation of VIP and PACAP neuropeptides and their potential receptors in human osteoarthritis (OA) FLS and RA FLS.

PATIENTS AND METHODS

Patients and FLS cultures. Synovial tissue samples were obtained from 9 patients with RA and 7 patients with OA at the time of knee prosthetic replacement surgery. All patients with RA fulfilled the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) 1987 revised criteria for the diagnosis of RA (18). The study was performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of the Hospital 12 de Octubre. FLS cultures were established from homogenized synovium in 10% fetal calf serum-

Dulbecco's modified Eagle's medium. The purity of the FLS used in the experiments was $\geq 95\%$ by flow cytometric analysis. FLS were used between passages 3 and 8. In some experiments, FLS were cultured in the presence or absence of 10 nM tumor necrosis factor α (TNF α) (Genzyme, Cambridge, UK) or 10 nM VIP (Neosystems, Strasbourg, France), VPAC₁ selective agonist [K¹⁵, R¹⁶, L²⁷]VIP(1–7)/GRF(8–27) (19), VPAC₁ antagonist [D-Phe², K¹⁵, R¹⁶, L²⁷]VIP(1–7)/GRF(8–27) (20), VPAC₂ selective agonist (RO 25-1553) (21), or PAC₁ selective agonist (maxadilan) (22) for 24 hours (GL Biochem Ltd., Shanghai, China).

Culture supernatants were harvested and stored at -20°C for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or enzyme immunoassay (EIA). RNA was also obtained from FLS cultures (1×10^6 cells/ml) using the Ultraspec RNA Isolation System (Biotex, Houston, TX) and was stored at -80°C .

For membrane preparation, FLS were harvested with a rubber policeman and pelleted by low-speed centrifugation. The supernatant was discarded and the cells lysed in 1 mM NaHCO₃ and immediately frozen in liquid nitrogen. After thawing, the lysate was first centrifuged at 800g for 10 minutes. The supernatant was further centrifuged at 20,000g for 15 minutes. The pellet was resuspended in 1 mM NaHCO₃ and used immediately as a crude membrane preparation.

Determination of VIP and VIP receptor expression in FLS. VIP, PACAP, and VPAC₁, VPAC₂, or PAC₁ receptor subtype messenger RNA (mRNA) expression in cultured FLS was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA (2 μg) was reverse transcribed using 6- μg random hexamer primers and 200 units SuperScript II reverse transcriptase in the buffer supplied, with 10 mM dithiothreitol and 40 units RNase OUT (all from Invitrogen, Carlsbad, CA) and 0.5 mM dNTP. Reverse transcriptase products (2 μl) were PCR-amplified with specific primers for β -actin, VIP, PACAP, and the VPAC₁, VPAC₂, or PAC₁ receptor subtypes (Table 1). The PCR products were analyzed in agarose gels.

Single-step relative quantitative RT-PCR analysis was also performed using SYBR Green PCR Master Mix and an RT-PCR kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Briefly, reactions were performed in 20 μl with 50 ng RNA, 10 μl 2 \times SYBR Green PCR Master Mix, 6.25 units SuperScript II reverse transcriptase, 10 units RNase OUT (Invitrogen), and 0.1 μM primers. The sequences of the primers used and the accession numbers of the genes analyzed are summarized in Table 1. For relative quantification, we compared the amount of target normalized to an endogenous reference, using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, as previously described (11).

The levels of VIP in concentrated FLS culture supernatants were also measured by EIA, using a commercial kit (Phoenix Pharmaceuticals, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's instructions. The minimum detectable concentration was 0.12 ng/ml of sample, with intraassay variation and interassay variation of $<5\%$ and 14% , respectively.

To confirm VIP protein expression in cultured FLS and in synovial tissue sections, we performed immunofluorescence and immunohistochemistry studies using a specific anti-VIP rabbit polyclonal antibody (Chemicon, Temecula, CA). The specificity of this antibody has been previously reported (23). OA FLS or RA FLS were cultured onto glass coverslips,

Table 1. Primer sequences for RT-PCR amplification of the indicated genes*

Gene	GenBank accession no.	Sequence position	Primers	Sequence
β -actin	E00829	1435–1535	h β -actin	Forward: 5'-AGAAGGATTCTATGTGGGCG-3' Reverse: 5'-CATGTCGTCCAGTTGGTGAC-3'
VIP	NM36634	538–638	hVIP	Forward: 5'-ACGTCACTCAGATGCAGTCTTCAC-3' Reverse: 5'-TCGTCTCTTTCCATTCAGAATT-3'
PACAP	NM001117	502–1078	hPACAP	Forward: 5'-AAACAAAGGACGCCGAATAG-3' Reverse: 5'-AGACTCACTGGGAAAGAATGC-3'
VPAC ₁	NM004624	2120–2220	hVPAC ₁	Forward: 5'-CCCCTGGGTCAGTCTGGTG-3' Reverse: 5'-GAGACCTAGCATTGCTGGTG-3'
VPAC ₂	NM003382	3672–3772	hVPAC ₂	Forward: 5'-TGGTTGGGTGTGGGCAG-3' Reverse: 5'-GGAGAAACCAGTCAGTCCG-3'
PAC ₁	NM001118	966–1365	hPAC ₁	Forward: 5'-GCCTGTACCTCTTCACTCGC-3' Reverse: 5'-CTTCCCTTTTGTGACATTC-3'

* RT-PCR = reverse transcription–polymerase chain reaction; VIP = vasoactive intestinal peptide; PACAP = pituitary adenylate cyclase–activating peptide; VPAC₁ = VIP receptor type 1; PAC₁ = PACAP type 1.

fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized for 10 minutes with 0.5% Triton X-100 in phosphate buffered saline at room temperature. The coverslips were incubated with anti-VIP antibody for 30 minutes at 37°C, followed by a 1-hour incubation with an Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen). Coverslips were counterstained with 1 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole to visualize nuclear bodies, mounted, and examined under a fluorescence microscope.

Tissue specimens from patients with OA and patients with RA were snap-frozen in OCT compound and stored at –80°C. Frozen sections (8 μ m) were fixed with 4% paraformaldehyde. Endogenous peroxidase was quenched in 3% H₂O₂ in methanol for 20 minutes. Cryosections were incubated with anti-VIP rabbit polyclonal antibody, and immunostaining was performed following a standard indirect avidin–biotin–horseradish peroxidase method (Vector, Burlingame, CA). Color was developed with diaminobenzidine (Vector), and slides were counterstained in Gill's hematoxylin.

Determination of cAMP and AC activity in FLS cultures. Levels of cAMP were determined by means of an EIA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). OA FLS and RA FLS were cultured in the presence of 100 nM VIP, VPAC₁ agonist, or VPAC₂ agonist for 24 hours. The cells were then homogenized in 5% trichloroacetic acid. After centrifugation, cAMP levels in the supernatants were measured according to the manufacturer's instructions. The protein concentration was determined by the Bradford method, using bovine serum albumin as a standard. Results are expressed in picomoles of cAMP per microgram of protein.

AC activity was measured as described elsewhere (24), with minor modifications. Briefly, membranes (4.5 μ g) were incubated with 1.5 mM ATP, 10M MgSO₄, an ATP-regenerating system (7.5 mg/ml phosphocreatine and 1 mg/ml creatine kinase), 2 mM 3-isobutyl-1-methyl xanthine, 2 mM EDTA, and 2 mg/ml bacitracin, and the substances were tested in 0.1 ml of 25 mM triethanolamine HCl buffer (pH 7.4). After 15 minutes at 30°C, the reaction was stopped by heating the mixture for 3 minutes. After refrigeration, 0.2 ml of alumina slurry was added, and the suspension was centrifuged. The supernatant was obtained for assay of cAMP (25).

Cytokine and chemokine determinations. The amounts of interleukin-6 (IL-6), chemokine (CC motif) ligand 2 (CCL2; monocyte chemoattractant protein 1 [MCP-1]), and chemokine (CXC motif) ligand 8 (CXCL8; IL-8) in the supernatants of FLS cultures treated with 100 nM VIP, VPAC₁ agonist, or VPAC₂ agonist for 24 hours were determined with a human capture ELISA, as previously described (11). Both the intra-assay and interassay variability for cytokine and chemokines determination were <5%.

Statistical analysis. Results are expressed as the mean \pm SEM. The significance of the results was analyzed using Student's 2-tailed *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

VIP expression by OA FLS and RA FLS. Constitutive VIP mRNA expression was uniformly detected by electrophoretic analysis of RT-PCR products in all 6 OA FLS lines, whereas it was detected in only 3 of 9 RA FLS lines (Figure 1A, top, and results not shown). The identity of the PCR products was verified by sequencing them, and the integrity of cDNA templates was verified by β -actin RT-PCR. PACAP mRNA expression was detected in neither OA FLS nor RA FLS, whereas it was detected in a human tonsil specimen used as positive control (data not shown). To confirm lower expression of VIP mRNA by RA FLS, we performed a relative quantitative real-time RT-PCR analysis of VIP mRNA expression in all FLS cell lines. Ten-fold lower VIP mRNA expression was observed in RA FLS compared with OA FLS (Figure 1A, bottom).

The expression of VIP protein by FLS was confirmed by immunofluorescence labeling of cultured FLS,

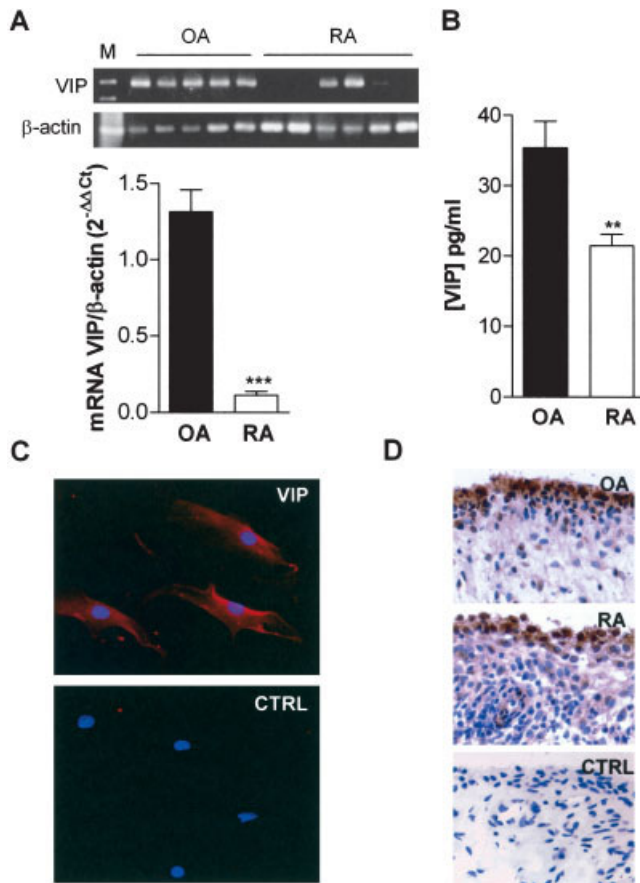


Figure 1. Differential expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) by osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLS). **A**, VIP mRNA expression in OA FLS and RA FLS. **Top**, Electrophoretic analysis of reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) products. M = 10-bp ladder. **Bottom**, VIP mRNA expression in OA FLS and RA FLS as measured by relative quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of β -actin in each sample (see Patients and Methods). Values are the mean and SEM of triplicate determinations ($n = 7$ OA FLS and 9 RA FLS lines). *** = $P < 0.001$ versus OA FLS. **B**, Presence of VIP in the supernatants of OA and RA FLS cultures under basal conditions, determined by enzyme immunoassay after 24 hours of culture. Values are the mean and SEM results from 2 independent experiments performed in triplicate ($n = 7$ OA FLS and 9 RA FLS lines). ** = $P < 0.01$ versus OA FLS. **C**, Immunofluorescence labeling of VIP in cultured OA FLS (red). Cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue nuclei). **D**, Immunoperoxidase staining of VIP in OA and RA synovial sections (hematoxylin counterstained). CTRL = control. (Original magnification $\times 450$ in **C**; $\times 300$ in **D**.)

which displayed clear VIP cytoplasmic immunolabeling (Figure 1C). Immunohistochemical analysis of OA and RA synovial membrane sections also showed VIP immunoperoxidase labeling of lining synoviocytes (Figure

1D). Because these techniques do not allow for quantitative analyses, VIP protein expression was determined in the supernatants of OA FLS and RA FLS cultures by EIA (Figure 1B). This analysis confirmed VIP protein expression and its secretion by FLS cultures, with significantly lower levels in RA FLS compared with OA FLS. Therefore, these data pointed to a deficit of VIP mRNA and protein expression in RA FLS compared with OA FLS.

VIP/PACAP receptor expression and function in OA FLS and RA FLS. To investigate the potentially functional receptors for VIP in these cells, we first performed an RT-PCR analysis of the expression of PAC₁, VPAC₁, and VPAC₂ mRNA in OA FLS and RA FLS. PAC₁ receptor mRNA was detected in human tonsil-positive control but not in OA FLS and RA FLS lines (results not shown). In contrast, VPAC₁ and VPAC₂ mRNA expression was variably detected by RT-PCR in OA FLS and RA FLS (Figures 2A and B, top). Relative quantitative real-time RT-PCR analysis showed significantly decreased VPAC₁ mRNA expression in RA FLS compared with that in OA FLS (Figure 2A, bottom) and, in contrast, significantly increased VPAC₂ mRNA expression in RA FLS compared with that in OA FLS (Figure 2B, bottom).

Although cAMP-independent signaling (phospholipase C, phospholipase D, [Ca²⁺]_i, etc.) is associated with VPAC₁ and VPAC₂, cAMP production represents the most prominent signaling pathway of VIP in VPAC receptor-mediated biologic responses (26). Thus, the functional activity of VIP/PACAP receptors was studied by determining AC activity in OA FLS membranes and RA FLS membranes (Figure 2C) and the intracellular levels of cAMP in intact cells after treatment with VIP or VPAC₁ or VPAC₂ agonists (Table 2). The mean \pm SEM basal values for AC activity in OA FLS and RA FLS were 4.2 ± 0.4 and 7.4 ± 4.0 pmoles cAMP/minute/mg protein, respectively. VIP stimulated AC activity in a dose-dependent manner in OA FLS and RA FLS. The order of potency in each membrane type was 4.2 nM and 3 nM , respectively (Table 3). In OA FLS membranes, the potency for each VIP/PACAP receptor agonist was VPAC₁ agonist > VPAC₂ agonist > PAC₁ agonist; in RA FLS membranes, the potency was VPAC₂ agonist > VPAC₁ agonist > PAC₁ agonist (Figure 2C, top, and Table 3). In intact cells, stimulation of FLS with 100 nM VPAC₁ agonist or VPAC₂ agonist significantly increased intracellular levels of cAMP in OA FLS and RA FLS, respectively (Table 2). Stimulation with maxadilan, the specific agonist for PAC₁ receptor, was much

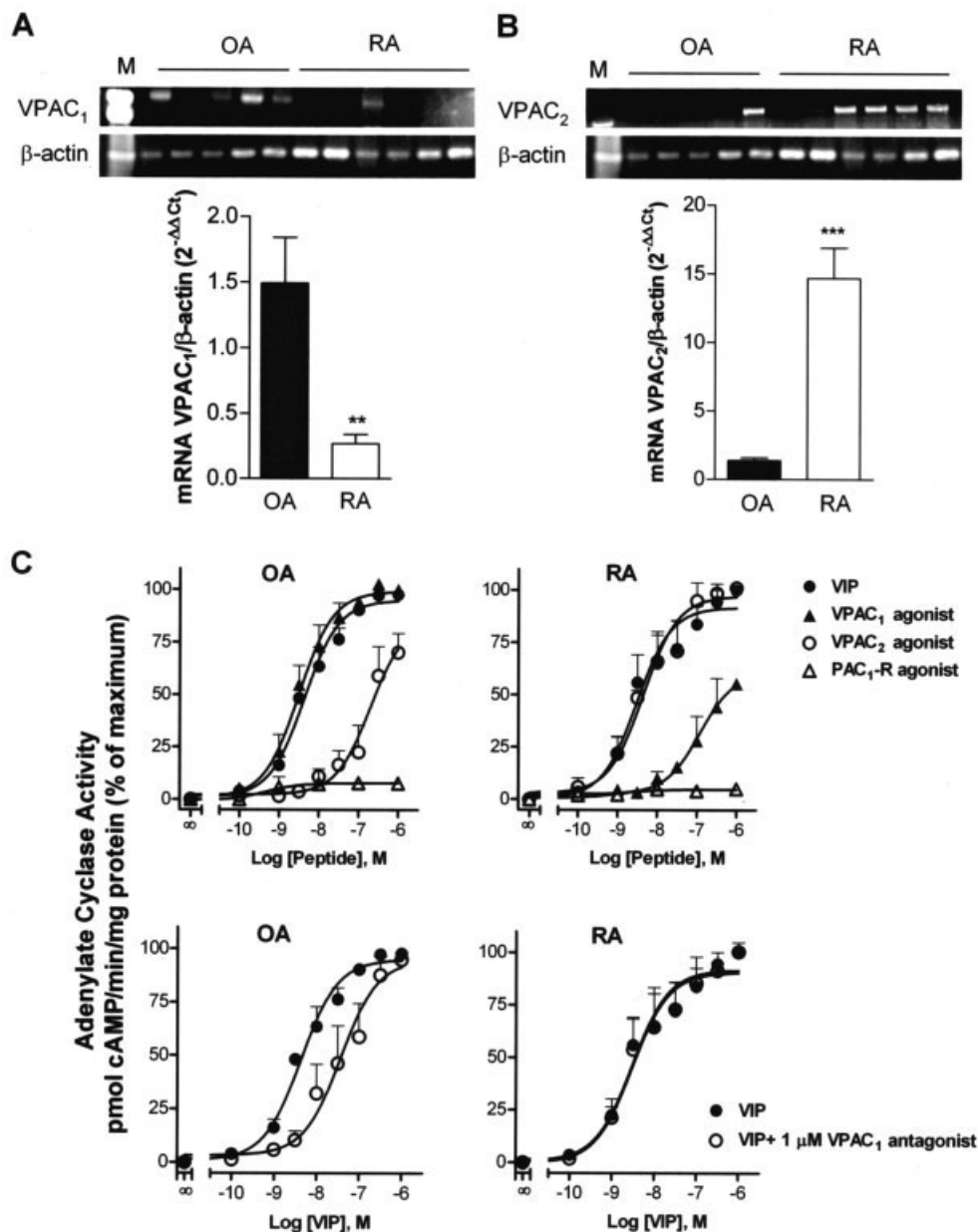


Figure 2. Differential VIP receptor expression and function in OA and RA FLS. **A** and **B**, VIP receptor type 1 (VPAC₁) and VPAC₂ mRNA expression in OA FLS and RA FLS. **Top**, Electrophoretic analysis of RT-PCR products. **Bottom**, VPAC₁ (**A**) and VPAC₂ (**B**) mRNA expression in OA FLS and RA FLS as measured by relative quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of β-actin in each sample. Values are the mean and SEM of triplicate determinations ($n = 7$ OA FLS and 9 RA FLS). ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$, versus OA FLS. **C**, Effect of VIP and specific agonists on adenylyl cyclase activity in OA FLS and RA FLS membranes. **Top**, Dose-effect curves of VIP, VPAC₁ agonist, VPAC₂ agonist, and pituitary adenylyl cyclase-activating peptide type 1 receptor (PAC₁-R) agonist. **Bottom**, VIP dose-effect curve in the absence or presence of 1 μM VPAC₁ antagonist. Values are the mean and SEM results from duplicate determinations ($n = 3$ –4 different OA FLS and RA FLS cell lines). See Figure 1 for other definitions.

Table 2. Effect of VIP, VPAC₁ agonist, and VPAC₂ agonist on intracellular cAMP levels in OA FLS and RA FLS*

	OA	RA
Basal	0.59 ± 0.24	3.95 ± 0.87
VIP, 100 nM	13.8 ± 5.20†	10.5 ± 2.31†
VPAC ₁ agonist, 100 nM	14.0 ± 8.28†	5.93 ± 1.54
VPAC ₂ agonist, 100 nM	5.75 ± 3.48	10.2 ± 3.04†

* Values are pmoles cAMP/μg of protein. Results are the mean ± SEM of duplicate determinations in 3 different fibroblast-like synovio-cyte (FLS) lines. VIP = vasoactive intestinal peptide; VPAC₁ = VIP receptor type 1; OA = osteoarthritis; RA = rheumatoid arthritis. † *P* < 0.05 versus basal.

less efficient than was stimulation with VIP, corroborating our negative data on PAC₁ receptor expression in FLS.

In order to confirm the results obtained with receptor agonists, FLS were treated with VIP in the presence of a specific VPAC₁ antagonist. The VPAC₁ antagonist was able to inhibit the effect of VIP on AC activity in OA FLS (*K_i* = 128 nM) but was incapable of inhibiting it in RA FLS (Figure 2C, bottom).

Table 3. Potency of VIP, VPAC₁ agonist, VPAC₂ agonist, and PAC₁ agonist in adenylate cyclase stimulation in OA FLS and RA FLS membranes*

	OA	RA
VIP	4.2 ± 0.78	3 ± 1.2
VPAC ₁ agonist	3.1 ± 0.36	120 ± 13.5†
VPAC ₂ agonist	200 ± 7†	4.4 ± 1.45
PAC ₁ agonist	>1,000†	>1,000†

* Values (50% maximum response concentration) are expressed in nM and correspond to the agonist concentration that induced a half-maximal response. Results are the mean ± SEM of at least 3 determinations in 3 different FLS lines. PAC₁ = pituitary adenylate cyclase-activating peptide type 1 receptor (see Table 2 for other definitions).

† The maximal response was lower than that of VIP (partial agonist).

To determine whether VPAC₁ or VPAC₂ was also dominant, based on our previous observation of VIP inhibition of proinflammatory factor synthesis in FLS (11), we analyzed this effect in OA FLS and RA FLS treated with VPAC₁ or VPAC₂ agonist. VIP and VPAC₁ agonist significantly inhibited IL-6 release by

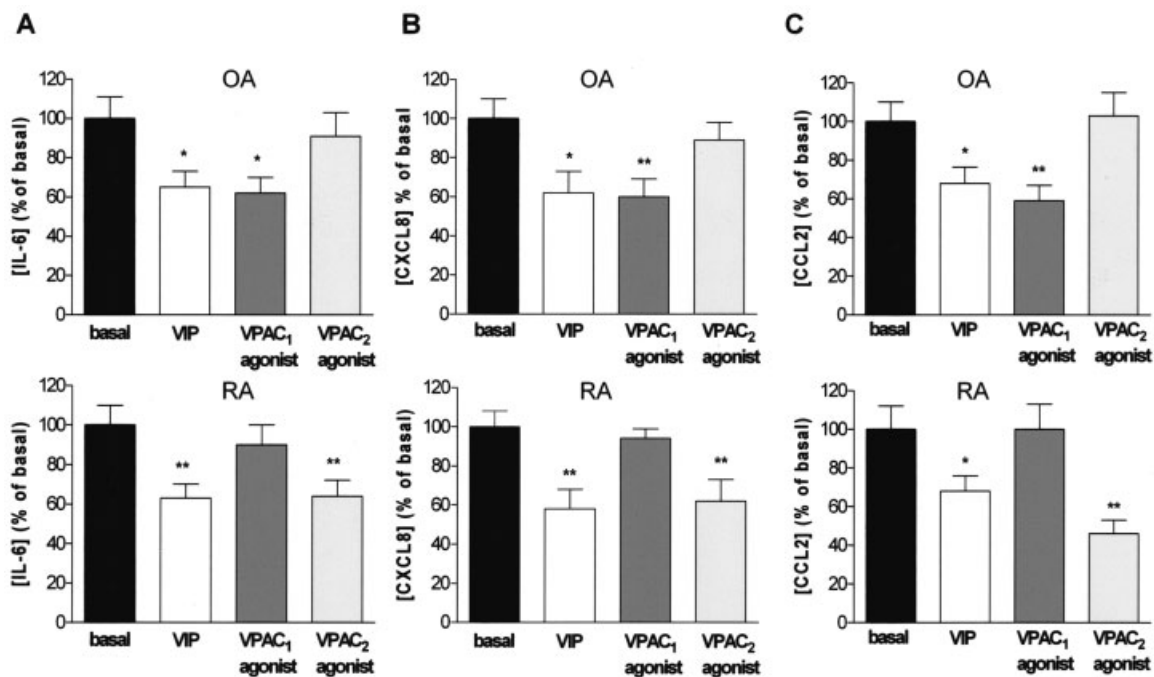


Figure 3. Effect of VIP, VIP receptor type 1 (VPAC₁) agonist, and VPAC₂ agonist on interleukin-6 (IL-6) and chemokine production in FLS. The supernatants of OA FLS and RA FLS cultures under basal unstimulated conditions and after treatment with 10 nM VIP, VPAC₁ agonist, or VPAC₂ agonist for 24 hours were collected, and levels of IL-6 (A), CXCL8 (B), and CCL2 (C) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Values are the mean and SEM results from 3 independent experiments performed in triplicate, which included FLS lines from 3 patients with OA and 4 patients with RA. * = *P* < 0.05; ** = *P* < 0.01, versus basal. See Figure 1 for other definitions.

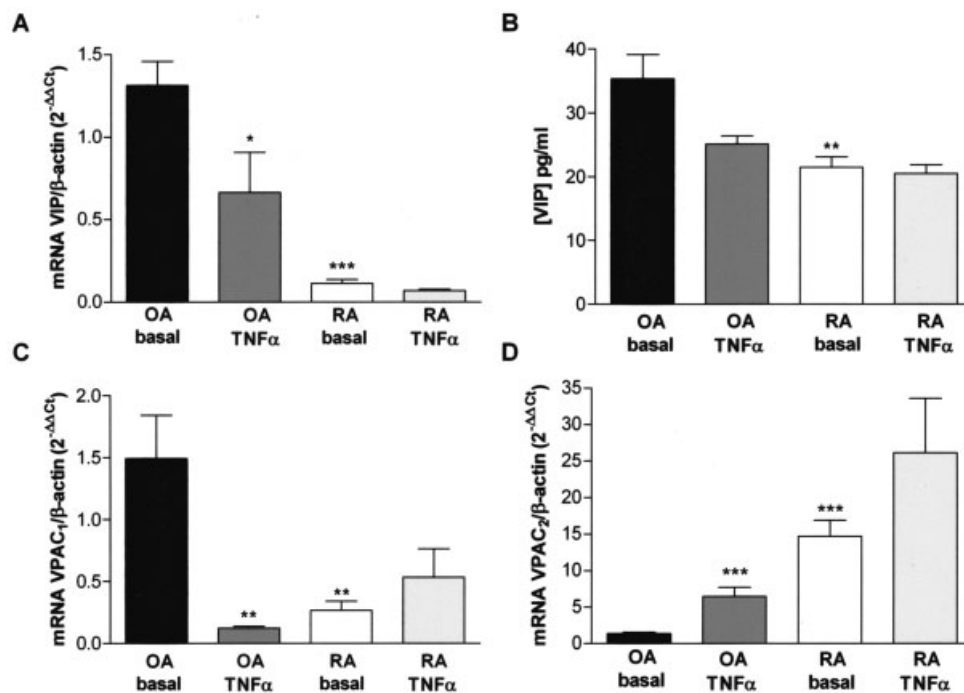


Figure 4. VIP and VIP receptor expression in FLS treated with 10 nM tumor necrosis factor α (TNF α) for 24 hours. **A**, Expression of VIP mRNA in OA and RA FLS was measured by relative quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of β -actin in each sample. **B**, The presence of VIP in supernatants from OA FLS and RA FLS cultures in basal and TNF α -stimulated conditions was determined by enzyme immunoassay. **C** and **D**, Expression of mRNA for VIP receptor type 1 (VPAC₁) (**C**) and VPAC₂ (**D**) in OA FLS and RA FLS under basal and TNF α -stimulated conditions was measured by relative quantitative real-time RT-PCR and corrected for mRNA expression of β -actin in each sample. Values are the mean and SEM results from triplicate determinations ($n = 7$ OA FLS lines and 8 RA FLS lines). * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$, versus OA basal. See Figure 1 for other definitions.

OA FLS cultures, whereas VIP and VPAC₂-specific agonist had the same effect in RA FLS (Figure 3A). VIP and VPAC₁ agonist also significantly decreased CXCL8 (IL-8) and CCL2 (MCP-1) chemokine synthesis in OA FLS, whereas VIP and VPAC₂ agonist significantly decreased it in RA FLS (Figures 3B and C).

Taken together, these results are consistent with VPAC₁ receptor expression and functional coupling to AC and antiinflammatory effects in OA FLS, whereas VPAC₂ is the receptor expressed and coupled to AC and antiinflammatory effects in RA FLS.

Expression of VIP and VIP receptors in TNF α -treated FLS. To obtain further evidence of the regulation of VIP and VIP receptor expression in FLS in the context of inflammation, we studied VIP mRNA and protein expression in OA FLS and RA FLS after treatment with the proinflammatory cytokine TNF α . TNF α induced a significant reduction of VIP mRNA

expression compared with basal levels in OA FLS (Figure 4A). At the protein level, a similar trend was observed, although the response was poorer compared with the observed mRNA changes (Figure 4B). The inhibitory effect of TNF α was specific, because treatment with LPS had the opposite effect, strongly inducing VIP expression in both OA FLS and RA FLS (results not shown).

Treatment of OA FLS with TNF α significantly reduced mRNA expression of VPAC₁ receptor, to a level similar to that detected constitutively in RA FLS. In contrast, treatment with TNF α did not significantly modify VPAC₁ mRNA expression compared with its basal levels in RA FLS (Figure 4C). Furthermore, relative quantitative real-time RT-PCR analysis showed that TNF α induced VPAC₂ receptor mRNA expression in OA FLS compared with basal levels (Figure 4D). Taken together, these results show that TNF α treatment

of OA FLS induced a pattern of VIP and VIP receptor expression similar to the constitutive expression observed in RA FLS.

DISCUSSION

An abundant number of studies have consistently demonstrated potent immunomodulatory and anti-inflammatory effects of exogenous administration of VIP (and related neuropeptides) in a variety of animal models of inflammatory disease, providing a solid basis for its potential use as a therapeutic agent (1–3,6–9,27). Several studies in the murine model of collagen-induced arthritis have shown that VIP or PACAP potently inhibits inflammatory and autoimmune components, protecting the joints from structural damage (5,6,28). Our previous findings in human synovial cells confirm some antiinflammatory effects of VIP under both constitutive and TNF α - or Toll-like receptor 4–stimulated conditions (12,29). A less developed concept is the potential endogenous participation of these neuropeptides in the pathogenesis of inflammation, either as endogenous mediators counterbalancing proinflammatory signaling or as permissive factors, if they are down-regulated during inflammatory responses.

Our present data using human FLS as a cellular model are the first to demonstrate that VIP can be produced by human fibroblasts, and that VIP expression is down-regulated in a chronic inflammatory condition or after short-term exposure to the proinflammatory cytokine TNF α . In this model, down-regulation of VIP under proinflammatory conditions would facilitate proinflammatory signaling in RA FLS. Because human synovial tissue is innervated by both sensory and sympathetic nerves, potential changes in the neural expression of neuropeptides under conditions of painful inflammation could also contribute to local VIP synthesis. Previous data suggest that neural VIP expression is also down-regulated in RA synovium, resulting in a global deficit of VIP production (30,31).

Our present study contributes to whole mapping of the VIP/PACAP peptides and the receptor family in RA FLS and OA FLS. A striking observation is the switch from the dominance of constitutive VPAC₁ expression and function in control OA FLS to dominance of inducible VPAC₂ in either RA FLS or ex vivo TNF α -treated FLS. According to our findings, these seem to be the only expressed and signaling receptors in FLS; furthermore, the antiinflammatory effects of VIP on IL-6 or chemokine synthesis in this cellular model were fully reproduced by specific VPAC₁ or VPAC₂

agonists, in a disease-specific manner. Previous data reported by Takeba et al (32) had already suggested that VPAC₂ was the only receptor expressed and functional in FLS, based on data limited to RA FLS. Previous data in rodent and human myeloid and lymphoid cells have also shown a different distribution and regulation of VPAC₁ and VPAC₂ (33,34). Monocytes and T cells also constitutively express VPAC₁, whereas VPAC₂ is inducible by specific cell activation (35–37). VPAC₁ receptor has also been preferentially detected in CD34⁺, CD38[–] primitive hematopoietic stem cells (38). All of these data indicated that in several systems, VPAC₂ could represent a marker of cell activation or differentiation, explaining its predominant presence in RA FLS or TNF α -treated OA FLS.

The genomic organization of human VPAC₁ and VPAC₂ is very similar, but little is known about the transcriptional factors that control specific VPAC receptor expression in the different tissues studied (26). Some transcriptional repressors have been described in the case of VPAC₁, but little is known about VPAC₂ transcriptional regulation (39,40). Therefore, the inflammation-related mechanisms involved in the switch of VPAC receptor expression observed in FLS as well as in other inflammatory cell types remain to be elucidated.

VPAC receptor-associated signal transduction involves the stimulation of AC, which triggers a protein kinase A pathway. This represents the major signaling pathway in different biologic responses. Several studies have highlighted the therapeutic potential of cAMP agonists for the treatment of arthritis (41,42). Our data confirm the functional coupling of VIP receptors to AC in OA FLS and RA FLS. Specific agonists for each receptor subtype are equivalent to VIP in terms of activating the dominant receptor (VPAC₁ or VPAC₂) in OA FLS or RA FLS. This fact was confirmed by studies of AC activity, and, more importantly, by cytokine and chemokine synthesis. Because RA appears to be a more rational target disease than OA for the development of antiinflammatory neuropeptides, the use of stable VPAC₂ receptor agonists is an attractive alternative to the use of parenteral short-lived neuropeptides (43). In this regard, the VPAC₂ agonist used in this study (RO25-1553) was recently tested in patients with asthma, without significant toxicity (44).

In summary, our study shows inflammation-associated down-regulation of the antiinflammatory neuropeptide VIP in resident RA fibroblasts and dissects the regulation of VIP functional receptors in this

context, underscoring VPAC₂ receptor as a potential target of therapy in RA.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Juarranz had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study design. Juarranz, Gomariz.

Acquisition of data. Juarranz, Gutiérrez-Cañas, Santiago, Carrión.

Analysis and interpretation of data. Juarranz, Pablos, Gomariz.

Manuscript preparation. Juarranz, Pablos, Gomariz.

Statistical analysis. Juarranz, Gomariz.

REFERENCES

- Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martinez C. VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy [review]. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1070:51–74.
- Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 2007;7:52–63.
- Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J, Delgado M. Immunology of VIP: a review and therapeutic perspectives [review]. *Curr Pharm Des* 2001;7:89–111.
- Harmar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, et al. International Union of Pharmacology: XVIII. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Pharmacol Rev* 1998;50:265–70.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by down-regulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 2001;7:563–8.
- Juarranz Y, Abad C, Martinez C, Arranz A, Gutierrez-Canas I, Rosignoli F, et al. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R1034–45.
- Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, et al. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124:961–71.
- Li H, Mei Y, Wang Y, Xu L. Vasoactive intestinal peptide suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T helper 1 responses. *J Clin Immunol* 2006;26:430–7.
- Lodde BM, Mishiba F, Wang J, Cotrim AP, Afiore S, Tak PP, et al. Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006;65:195–200.
- Rosignoli F, Torroba M, Juarranz Y, Garcia-Gomez M, Martinez C, Gomariz RP, et al. VIP and tolerance induction in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1070:525–30.
- Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutierrez-Canas I, Palao G, Galindo M, et al. Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:416–22.
- Gutierrez-Canas I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martinez C, Galindo M, et al. VIP downregulates expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:527–32.
- Lygren I, Ostensen M, Burhol PG, Husby G. Gastrointestinal peptides in serum and synovial fluid from patients with inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis* 1986;45:637–40.
- Lygren I, Ostensen M, Burhol PG, Husby G. Concentration of substance P, neurokinin A, calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide in synovial fluid from knee joints in patients suffering from rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1991;20:326–35.
- Martinez C, Delgado M, Abad C, Gomariz RP, Ganea D, Leceta J. Regulation of VIP production and secretion by murine lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1999;93:126–38.
- Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:669–75.
- Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol* 2001;22:199–204.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24.
- Gourlet P, Vandermeers A, Vertongen P, Rathe J, De Neef P, Cnudde J, et al. Development of high affinity selective VIP1 receptor agonist. *Peptides* 1997;18:1539–45.
- Gourlet P, De Neef P, Cnudde J, Waelbroeck M, Robberecht P. In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor. *Peptides* 1997;18:1550–60.
- Gourlet P, Vertongen P, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, Rathe J, De Neef P, et al. The long-acting vasoactive intestinal polypeptide agonist Ro 25-1553 is highly selective of the VIP2 receptor subclass. *Peptides* 1997;18:403–8.
- Moro O, Lerner EA. Maxadilan, the vasodilator from sand flies, is a specific pituitary adenylate cyclase activating peptide type I receptor agonist. *J Biol Chem* 1997;272:966–70.
- Shen H, Watanabe M, Tomasiewicz H, Rutishauser U, Magnuson T, Glass JD. Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *J Neurosci* 1997;17:5221–9.
- Houslay MD, Metcalfe JC, Warren GB, Hesketh TR, Smith GA. The glucagon receptor of rat liver plasma membrane can couple to adenylate cyclase without activating it. *Biochim Biophys Acta* 1976;435:489–94.
- Gilman AG. A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970;67:305–12.
- Laburthe M, Couvineau A, Marie JC. VPAC receptors for VIP and PACAP [review]. *Receptors Channels* 2002;8:137–53.
- Abad C, Gomariz RP, Waschek JA. Neuropeptide mimetics and antagonists in the treatment of inflammatory disease: focus on VIP and PACAP. *Curr Top Med Chem* 2006;6:151–63.
- Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP, Delgado M. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits collagen-induced arthritis: an experimental immunomodulatory therapy. *J Immunol* 2001;167:3182–9.
- Juarranz Y, Gutierrez-Canas I, Arranz A, Martinez C, Abad C, Leceta J, et al. VIP decreases TLR4 expression induced by LPS and TNF- α treatment in human synovial fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1070:359–64.
- Mapp PI, Kidd BL, Gibson SJ, Terry JM, Revell PA, Ibrahim NB, et al. Substance P-, calcitonin gene-related peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroscience* 1990;37:143–53.
- Gronblad M, Konttinen YT, Korkala O, Liesi P, Hukkanen M, Polak JM. Neuropeptides in synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Rheumatol* 1988;15:1807–10.
- Takeba Y, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T. Evidence for neural regulation of inflammatory synovial cell functions by secreting calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:2418–29.
- Gomariz RP, Garrido E, Leceta J, Martinez C, Abalo R, Delgado

- M. Gene expression of VIP receptor in rat lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;203:1599–604.
34. Lara-Marquez ML, O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Shah MH, Karacay B. Selective gene expression and activation-dependent regulation of vasoactive intestinal peptide receptor type 1 and type 2 in human T cells. *J Immunol* 2001;166:2522–30.
 35. Delgado M, Martinez C, Johnson MC, Gomariz RP, Ganea D. Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1996;68:27–38.
 36. Delgado M, Ganea D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit nuclear factor- κ B-dependent gene activation at multiple levels in the human monocytic cell line THP-1. *J Biol Chem* 2001;276:369–80.
 37. Delgado M, Munoz-Elias EJ, Gomariz RP, Ganea D. VIP and PACAP inhibit IL-12 production in LPS-stimulated macrophages: subsequent effect on IFN γ by T cells. *J Neuroimmunol* 1999;96:167–81.
 38. Kawakami M, Kimura T, Kishimoto Y, Tatekawa T, Baba Y, Nishizaki T, et al. Preferential expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors VPAC1 in human cord blood-derived CD34+CD38– cells: possible role of VIP as a growth promoting factor for haematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia* 2004;18:912–21.
 39. Pei L. Molecular cloning of a novel transcriptional repressor protein of the rat type I vasoactive intestinal peptide receptor gene. *J Biol Chem* 1998;273:19902–8.
 40. Dorsam G, Goetzl EJ. Vasoactive intestinal peptide-1 (VPAC-1) is a novel gene target of the hemolymphopoietic transcription factor Ikaros. *J Biol Chem* 2002;277:13488–93.
 41. Ross SE, Williams RO, Mason LJ, Mauri C, Marinova-Mutafchieva L, Malfait AM, et al. Suppression of TNF α expression, inhibition of Th1 activity, and amelioration of collagen-induced arthritis by rolipram. *J Immunol* 1997;159:6253–9.
 42. Francischi JM, Yokoro CM, Poole S, Tafuri WL, Cunha FK, Teixeira MM. Anti-inflammatory and analgesic effect of the phosphodiesterase 4 inhibitor rolipram in a rat model of arthritis. *Eur J Pharmacol* 2000;399:243–9.
 43. Groneberg DA, Rabe KF, Fischer A. Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors. *Eur J Pharmacol* 2006;133:182–94.
 44. Linden A, Hansson L, Andersson A, Palmqvist M, Arvidsson P, Lofdahl CG, et al. Bronchodilation by an inhaled VPAC(2) receptor agonist in patients with stable asthma. *Thorax* 2003;58:217–21.

ARTÍCULO 2

Carrión M, Juarranz Y, Pérez-García S, Jimeno R, Pablos JL, Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I.

RNA sensors in human osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: immune regulation by vasoactive intestinal peptide.

Arthritis Rheum. 2011 Jun;63(6):1626-36.

RNA Sensors in Human Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts

Immune Regulation by Vasoactive Intestinal Peptide

Mar Carrión,¹ Yasmina Juarranz,¹ Selene Pérez-García,¹ Rebeca Jimeno,¹ José L. Pablos,²
Rosa P. Gomariz,¹ and Irene Gutiérrez-Cañas¹

Objective. The aim of this study was to analyze both the constitutive and induced expression and function of double-stranded RNA (dsRNA; Toll-like receptor 3 [TLR-3], retinoic acid-inducible gene I [RIG-I], and melanoma differentiation-associated gene 5 [MDA5]) and single-stranded RNA (ssRNA; TLR-7) receptors in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLS), by studying the transcription factors involved and the subsequent effects on antiviral interferon- β (IFN β), the proinflammatory CXCL8 chemokine, and matrix metalloproteinase 3 (MMP-3). An additional goal was to study the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP).

Methods. The expression of TLR-3, TLR-7, RIG-I, and MDA5 in cultured FLS was studied by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence, and Western blotting. Transcription factors were studied using the ELISA-based TransAM transcription factor kit. The expression of IFN β , CXCL8 (interleukin-8), and MMP-3 was analyzed by RT-PCR and ELISA.

Results. FLS expressed TLR-3, TLR-7, RIG-I, and MDA5. The expression of TLR-3 and RIG-I was higher in RA FLS, while the expression of TLR-7 and MDA5 was higher in OA FLS. Stimulation with poly(I-C) induced the activation of IFN regulatory factor 3 (IRF-3), NF- κ B, and activator protein 1 (AP-1) c-Jun as well as the subsequent production of IFN β , CXCL8, and MMP-3. VIP reduced the activation of IRF-3 and the production of IFN β in both OA and RA FLS. Imiquimod induced the activation of NF- κ B, AP-1 c-Fos, and AP-1 c-Jun and the synthesis of CXCL8 and MMP-3. VIP significantly diminished MMP-3 production only in imiquimod-treated RA FLS.

Conclusion. The results of this study revealed a prominent function of FLS in the recognition of both dsRNA and ssRNA, which may be present in the joint microenvironment. This study also advances the healing function of the endogenous neuroimmune peptide VIP, which inhibited TLR-3-, RIG-I-, MDA5-, and TLR-7-mediated stimulation of antiviral, proinflammatory, and joint destruction mediators.

Supported by the Instituto de Salud Carlos III (grant PI080025 and RETICS Program grant RD08/0075, RIER) within VI PNDE I+D+I 2008/2011, by FEDER, and by Universidad Complutense de Madrid–Banco Santander Central Hispano (grant GR58/08). Ms Carrión is recipient of a predoctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación.

¹Mar Carrión, MSc, Yasmina Juarranz, PhD, Selene Pérez-García, MSc, Rebeca Jimeno, MSc, Rosa P. Gomariz, PhD, Irene Gutiérrez-Cañas, PhD: Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain; ²José L. Pablos, MD, PhD: Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain.

Address correspondence to Rosa P. Gomariz, PhD, Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, José Antonio Novais 2, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. E-mail: gomariz@bio.ucm.es.

Submitted for publication September 8, 2010; accepted in revised form February 3, 2011.

The immune system fights disease through the development of innate and adaptive immune responses. The innate immune system senses the occurrence of infection via the presence of pattern recognition receptors that recognize conserved microbial pathogen-associated molecular patterns as well as endogenous ligands derived from the host. Pattern recognition receptor stimulation produces the expression of proinflammatory cytokines, interferons (IFNs), and costimulatory molecules, which link innate and adaptive immunity (1,2).

There are 2 classes of pattern recognition receptors: transmembrane and cytosolic. Toll-like receptors (TLRs) are transmembrane receptors and are the first

pattern recognition receptors known. Ten TLRs have been identified in humans and are expressed on the cell surface (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, and TLR-10) and in endosomes (TLR-3, TLR-7, TLR-8, and TLR-9) (3). Helicase retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors (RLRs) are cytosolic pattern recognition receptors that comprise RIG-I and melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) (4,5). TLR-3, RIG-I, and MDA5 recognize double-stranded RNA (dsRNA). In the cytoplasm, RIG-I binds short dsRNA (length <2 kb) (6,7), whereas MDA5 recognizes complex dsRNA (length >2 kb) (8). The 3 receptors are activated by the synthetic dsRNA poly(I-C) (9). TLR-7 recognizes single-stranded RNA (ssRNA) in endosomes and is activated by the synthetic antiviral compound imiquimod (10). The 4 receptors detect a wide range of RNA viruses, after which TLRs and RLRs initiate signaling cascades that lead to activation and subsequent nuclear translocation of 3 families of transcription factors: IFN regulatory factor 3 (IRF-3) and IRF-7, NF- κ B, and activator protein 1 (AP-1) (2).

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory/autoimmune disease affecting 1% of the population worldwide (11). Fibroblast-like synoviocytes (FLS) are resident cells involved in RA pathogenesis, with functions in both innate and adaptive immunity (12). RA is caused by the interaction of individual genetic predisposition, environmental factors, and dysregulated immune responses. Among environmental factors, infectious agents are present as pattern recognition receptor ligands that comprise both exogenous factors (bacterial and viral components) (12,13) and endogenous factors (host messenger RNA [mRNA], heat-shock proteins, fibronectin) (14,15). In addition, the expression of TLR-2, TLR-4, and TLR-3 is increased in RA synovial tissue (16–20).

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is a molecule shared by the neuroendocrine immune network that is considered a potential candidate for treatment of inflammatory and autoimmune diseases (21–26). Since VIP was described as a beneficial endogenous mediator in collagen-induced arthritis (27), intense interest has been focused on translational research in humans. The prospective therapeutic effects of VIP in human RA cells *ex vivo* have been confirmed (19,20,28–30). VIP and its receptors VPAC₁ and VPAC₂ are expressed in FLS from patients with osteoarthritis (OA) and patients with RA, with a differential expression in both pathologies pointing to a role in the physiopathology of rheumatic diseases (31). The aim of this study was to examine both the expression and function of RNA receptors in FLS and the action of VIP, by studying the

transcription factors involved and the subsequent effects on antiviral, proinflammatory, and matrix-degrading enzyme molecules.

PATIENTS AND METHODS

Patients and FLS cultures. Synovial tissue samples were obtained from patients with RA and patients with OA at the time of knee replacement surgery. All patients with RA fulfilled the American College of Rheumatology 1987 revised criteria for the classification of RA (32). The study was performed according to the recommendations of the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of the Hospital 12 de Octubre. FLS cultures were established from homogenized synovium in 10% fetal calf serum (FCS)–Dulbecco's modified Eagle's medium (33).

Cultured FLS were used between passages 3 and 9. TLR-3 synthetic ligand poly(I-C) and TLR-7 synthetic ligand imiquimod (both obtained from Invitrogen) were used at 20 μ g/ml and 15 μ g/ml, respectively. Stimulated FLS were cultured in the presence or absence of 10 nM VIP (Neosystem).

Preparation of nuclear and cytoplasmic extracts. FLS were cultured in 150-mm petri dishes with TLR-specific ligands in the presence or absence of VIP. A Nuclear Extract Kit (Active Motif) was used for preparing nuclear and cytoplasmic extracts. Briefly, cells were scraped into phosphate buffered saline (PBS) containing phosphatase and protease inhibitors, centrifuged, resuspended in hypotonic buffer, and then kept on ice for 15 minutes. After the addition of detergent, lysates were centrifuged at 14,000g for 30 seconds at 4°C. Supernatants containing cytoplasmic extracts were collected and stored at –80°C. The pellets were resuspended in complete lysis buffer and shaken vigorously. After incubation at 4°C and centrifugation at 14,000g for 10 minutes at 4°C, supernatants were collected and stored at –80°C. Protein content was measured using a QuantiPro BCA Assay Kit (Sigma-Aldrich).

Semiquantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. FLS were cultured in 100-mm petri dishes with TLR-specific ligands in the presence or absence of VIP. The expression of TLR-3, TLR-7, RIG-I, MDA5, and IFN β mRNA in cultured FLS was analyzed by RT-PCR. The treatment period was 24 hours for TLR-3 and TLR-7 and 2 hours for RIG-I, MDA5, and IFN β . Total RNA was obtained from FLS cultures using TRI Reagent (Sigma-Aldrich). Total RNA (2 μ g) was reverse transcribed using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Complementary DNA (2 μ l) was PCR-amplified with specific primers for β -actin, TLR-3, and TLR-7. The PCR products were analyzed in agarose gels, and the correct size and sequence of the amplified products were checked. Semiquantitative real-time PCR analysis was also performed with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) for TLR-3 and TLR-7, using β -actin as reference. The sequence of primers used was as follows: for β -actin, forward 5'-AGAAGGATTCCTATGTGGCG-3', reverse 5'-CATGTCGTCCCAGTTGGTGAC-3'; for TLR-3, forward 5'-ACAACCTAGCACGGCTCTGGA-3', reverse 5'-ACCTCAACTGGGATCTCGTCA-3'; for TLR-7, forward 5'-TGGAATTGCCCTCGTTGTT-3', reverse 5'-GTCAGCG-CATCAAAAGCATT-3'. For RIG-I, MDA5, and IFN β ,

TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) was used, with manufacturer-predesigned primers. For relative quantification, we compared the amount of target normalized to an endogenous reference (β -actin), using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Immunocytochemical detection of TLR-3 and TLR-7.

We performed immunocytochemistry studies using a specific mouse anti-TLR-3 monoclonal antibody and a rabbit anti-TLR-7 polyclonal antibody (both from Imgenex). The specificity of these antibodies has previously been reported. OA or RA FLS were cultured onto glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 0.5% Triton X-100 in PBS at room temperature. Cells were blocked with PBS containing 5% FCS for 15 minutes. Coverslips were incubated for 1 hour at 37°C with primary antibody, at a dilution of 1:100 (for TLR-3) or 1:50 (for TLR-7). After washing, cells were incubated for 1 hour with Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-mouse IgG antibody for TLR-3 and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody for TLR-7 (both from Invitrogen). Coverslips were counterstained with 1 μ g/ml DAPI to visualize nuclear bodies, mounted with ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen), and examined under a fluorescence microscope.

Western blot analysis of TLR-3 and TLR-7. FLS were cultured and collected, rinsed twice with cold PBS and 1 mM sodium orthovanadate, and pelleted. Proteins were extracted from FLS in ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% Nonidet P40, 30 mM NaF, 5 mM ethylenediamine tetraacetate, 1 mM dithiothreitol, 0.1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail). Protein extracts (80 μ g) were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked with Tris buffered saline (pH 7.6) containing 5% bovine serum albumin and 0.1% Tween 20 and then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: rabbit anti-human TLR-7 (1:200; Acris) and mouse anti-human TLR-3 (2 μ g; Imgenex), with mouse anti- β -actin (1:10,000; Sigma-Aldrich) used as a loading control. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000 dilution) was used for detection. Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence Western blot analysis system (Pierce). Protein bands were analyzed with a Bio-Rad gel documentation system, using the Bio-Rad Quantity One program, and normalized against the intensity of β -actin.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IFN β , CXCL8 (IL-8), and matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) in culture supernatants. FLS were cultured in 6-well plates with TLR-specific ligands in the presence or absence of VIP for 6 hours (for IFN β) and 24 hours (for CXCL8 and MMP-3). Culture supernatants were concentrated with Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter devices (Millipore) for IFN β and MMP-3. Levels of IFN β in concentrated FLS culture supernatants were measured using a VeriKine Human IFN- β ELISA kit (PBL InterferonSource). Levels of CXCL8 were determined with a human capture ELISA, as previously described (31). The amount of MMP-3 was determined with a human instant ELISA kit (Bender MedSystems). Both the intraassay and interassay variability were <5% for CXCL8, <8% for IFN β , and <10% for MMP-3.

ELISA of RIG-I and MDA5 in cytoplasmic extracts.

Eighty micrograms of cytoplasmic extracts of FLS treated with poly(I-C) for 2 hours was isolated as described above, and levels of RIG-I and MDA5 were measured using a sandwich ELISA kit (Apotech; Enzo Life Sciences).

Transcription factor activity assay. Nuclear IRF-3, IRF-7, NF- κ B, AP-1 c-Jun, and AP-1 c-Fos activity was quantified using an ELISA-based TransAM kit (Active Motif) according to the manufacturer's protocol. Briefly, the nuclear protein extracts (3–10 μ g/well) were added to a 96-well plate that was immobilized with oligonucleotide containing IRF-3, IRF-7, NF- κ B, and AP-1 elements, respectively. Transcription factor contained in nuclear extracts bound specifically to this oligonucleotide during incubation for 1 hour at room temperature. Primary antibody was then added to each well for 1 hour followed by secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody for 1 hour. After adding developing solution and stopping the colorimetric reaction, the transcription factor activity was determined by reading absorbance at 450 nm.

Statistical analysis. Results are expressed as the mean \pm SEM. The significance of the results was analyzed using Student's 2-tailed *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Characterization of ssRNA and dsRNA receptor expression in FLS. We initially studied the constitutive expression of the membrane receptors TLR-3 (dsRNA receptor) and TLR-7 (ssRNA receptor) on cultured FLS. We observed constitutive mRNA expression of TLR-3 and TLR-7 in both OA and RA FLS. We detected mRNA by means of classic PCR, where we confirmed the identity of PCR products by electrophoretic analysis and subsequent sequencing (data not shown). To quantify the expression, we performed real-time PCR and used β -actin as a reference gene. The pattern was different in both pathologies: the expression of TLR-3 mRNA was 2.9-fold higher in RA FLS than in OA FLS, whereas the expression of TLR-7 mRNA was 2.7-fold higher in OA FLS than in RA FLS (Figure 1A). When comparing TLR-3 expression with TLR-7 expression, we observed that the expression of TLR-3 in OA FLS was less than twice as high as that of TLR-7, whereas the expression of TLR-3 in RA FLS was almost 6 times higher than that of TLR-7.

We then detected TLR-3 and TLR-7 at the protein level by means of Western blotting (Figure 1B). This expression presented great heterogeneity, and we did not observe significant differences between RA FLS and OA FLS. Immunocytochemical analysis showed expression of both TLR-3 and TLR-7 in perinuclear areas, corresponding endosomal localization in the cytoplasm (Figure 1C), with partial colocalization of both receptors (Figure 1C). We observed no staining when isotype controls were used (data not shown). We also studied the constitutive expres-

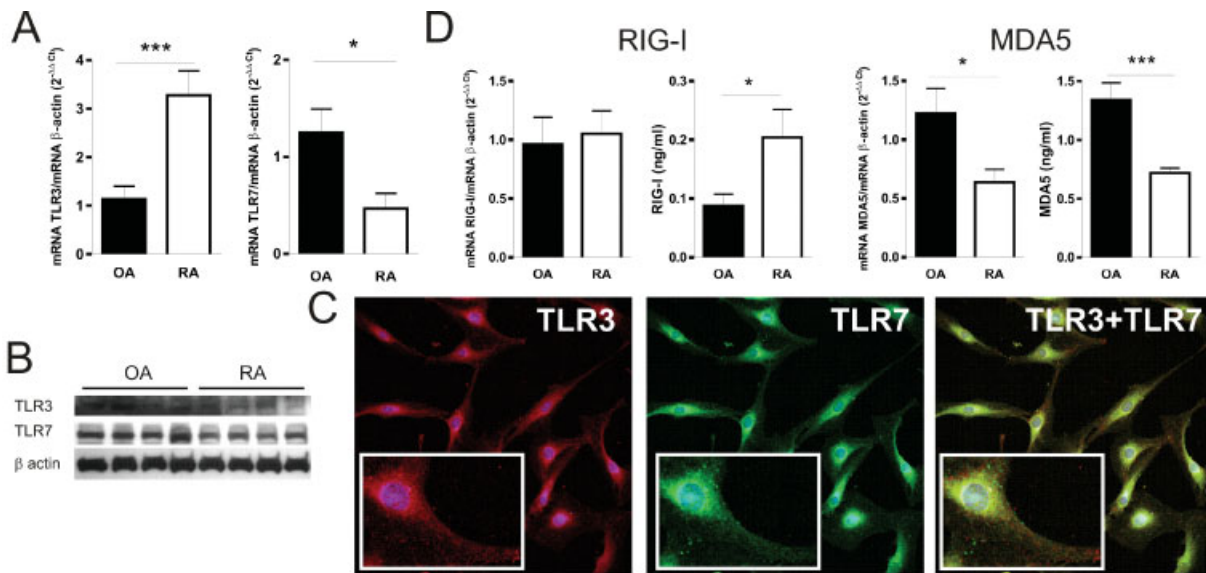


Figure 1. Characterization of Toll-like receptor 3 (TLR-3), TLR-7, retinoic acid-inducible gene I (RIG-I), and myeloid differentiation-associated gene 5 (MDA5) expression in osteoarthritis (OA) fibroblast-like synoviocytes (FLS) and rheumatoid arthritis (RA) FLS. **A**, TLR-3 and TLR-7 mRNA expression was measured by real-time polymerase chain reaction (PCR), using β -actin as the reference gene. **B**, Protein expression of TLR-3, TLR-7, and β -actin was determined by Western blotting, using total protein extracts. **C**, Protein expression and intracellular localization of TLR-3 and TLR-7 were analyzed by immunofluorescence staining. Nuclei were counterstained with DAPI (blue), and receptors were stained with Alexa Fluor 488 (red) and Alexa Fluor 594 (green) for TLR-3 and TLR-7, respectively. Boxed areas show larger-magnification views of individual nuclei. Original magnification $\times 450$. **D**, RIG-I and MDA5 mRNA expression was determined by real-time PCR, using β -actin as the reference gene. Protein expression was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay. Results in **B** and **C** are representative of 3 independent experiments. Values in **A** and **D** are the mean \pm SEM results for at least 8 FLS lines measured in triplicate, with basal OA mRNA expression as the referent. * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.001$.

sion of cytosolic RIG-I and MDA5 and detected similar expression of RIG-I mRNA in OA FLS and RA FLS, whereas the expression of RIG-I in RA FLS was significantly higher than that in OA FLS at the protein level, although the expression measured by ELISA was poor (Figure 1D). We observed higher gene expression of MDA5 in OA FLS compared with RA FLS, which was confirmed at the protein level by ELISA (Figure 1D). When comparing the expression of RIG-I and MDA5 mRNA, that of RIG-I was higher in both OA FLS and RA FLS after poly(I-C) stimulation (Table 1). In summary, TLR-3 and RIG-I were overexpressed in RA FLS (although RIG-I was overexpressed only at the protein level), whereas TLR-7 and MDA5 were overexpressed in OA FLS.

Differential induction of TLR-3, TLR-7, RIG-I, and MDA5 in FLS by poly(I-C) or imiquimod. In order to mimic the effect of endogenous RNAs present in the joint, we examined the effect of the agonists poly(I-C) and imiquimod on the expression of these receptors. Stimulation with poly(I-C) significantly increased TLR-3, RIG-I, and MDA5 gene expression in FLS,

Table 1. Relative induced expression of single-stranded RNA and double-stranded RNA sensor mRNA in fibroblast-like synoviocytes*

	OA	RA
TLR-3		
Basal	1.13 \pm 0.13	1.01 \pm 0.05
Poly(I-C)-stimulated	16.62 \pm 2.30 \dagger	9.03 \pm 0.67 \dagger
RIG-I		
Basal	1.02 \pm 0.13	1.04 \pm 0.10
Poly(I-C)-stimulated	5.79 \pm 0.62 \dagger	16.51 \pm 2.52 \dagger
MDA5		
Basal	1.06 \pm 0.15	0.98 \pm 0.13
Poly(I-C)-stimulated	2.21 \pm 0.40 \ddagger	9.02 \pm 1.37 \dagger
TLR-7		
Basal	1.25 \pm 0.25	1.07 \pm 0.10
Imiquimod-stimulated	2.87 \pm 0.51 \S	2.20 \pm 0.44 \ddagger

* Values are the mean \pm SEM from at least 3 individual experiments performed in triplicate. Osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes were stimulated for 24 hours with poly(I-C) 20 μ g/ml or imiquimod 15 μ g/ml, and mRNA expression was determined by relative real-time quantitative polymerase chain reaction and corrected for mRNA expression of β -actin in each sample. The amount of target normalized to β -actin was compared using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. TLR-3 = Toll-like receptor 3; RIG-I = retinoic acid-inducible gene I; MDA5 = myeloid differentiation-associated gene 5.

$\dagger P < 0.001$ versus basal.

$\ddagger P < 0.01$ versus basal.

$\S P < 0.05$ versus basal.

although with different intensities (Table 1 and Figure 2). Although the increase in TLR-3 mRNA expression was higher in OA FLS than in RA FLS, the increase in RIG-I and MDA5 mRNA expression was higher in RA FLS than in OA FLS. Analysis of protein in cytoplasmic extracts showed a significant increase in RIG-I only in poly(I-C)-stimulated OA FLS and a trend toward higher expression of MDA5 in RA FLS (Figure 2). Stimulation with imiquimod increased TLR-7 mRNA expression, with similarly low, although significant, intensity in both OA FLS and RA FLS. Although poly(I-C) is the main inducer of RIG-I and MDA5 responses, a recent study showed up-regulated TLR-7-induced expression of both cytoplasmic receptors in human plasmacytoid dendritic cells (DCs) (34). Surprisingly, in FLS, imiquimod was able to significantly induce MDA5 at both the protein and mRNA levels, and a similar tendency was observed for RIG-I expression (data not shown). Regarding TLR-3 and TLR-7, we did not detect significant differences at the protein level (data not shown). Thus, agonists up-regulated the expression of the ssRNA and dsRNA receptors tested, in both OA and RA FLS.

Effect of VIP on poly(I-C)- and imiquimod-stimulated expression of TLR-3, TLR-7, RIG-I, and MDA5. Because we previously observed that VIP exerts its immunomodulatory action on TLR-2 and TLR-4 by down-regulating their expression in human FLS (20), we next studied the effect of VIP after stimulation with poly(I-C) and imiquimod. VIP significantly inhibited the expression of RIG-I mRNA stimulated with poly(I-C) in OA FLS and RA FLS. This effect was observed only at the protein level in OA FLS, where the unstimulated expression of RIG-I was less than that in RA FLS, and enhanced expression was observed only in OA FLS after poly(I-C) stimulation (Figure 2A). In the case of MDA5 mRNA, we observed a nonsignificant decrease in expression in both OA and RA FLS; a similar tendency was detected at the protein level in RA FLS. In OA FLS, poly(I-C) was not able to increase MDA5 expression, and the basal expression of MDA5 was higher than that in unstimulated RA FLS (Figure 2B). TLR-3 and TLR-7 agonist-enhanced expression and imiquimod-enhanced expression of RIG-I and MDA5 were not altered by VIP treatment (data not shown). Taken together, these data indicate that, with the exception of the VIP-mediated decrease in RIG-I expression, the potential action of VIP was not mediated by reduced expression of the receptors studied.

Different patterns of nuclear translocation of transcription factors in FLS following stimulation with poly(I-C) or imiquimod. Stimulation of ssRNA and dsRNA receptors leads to the activation of different

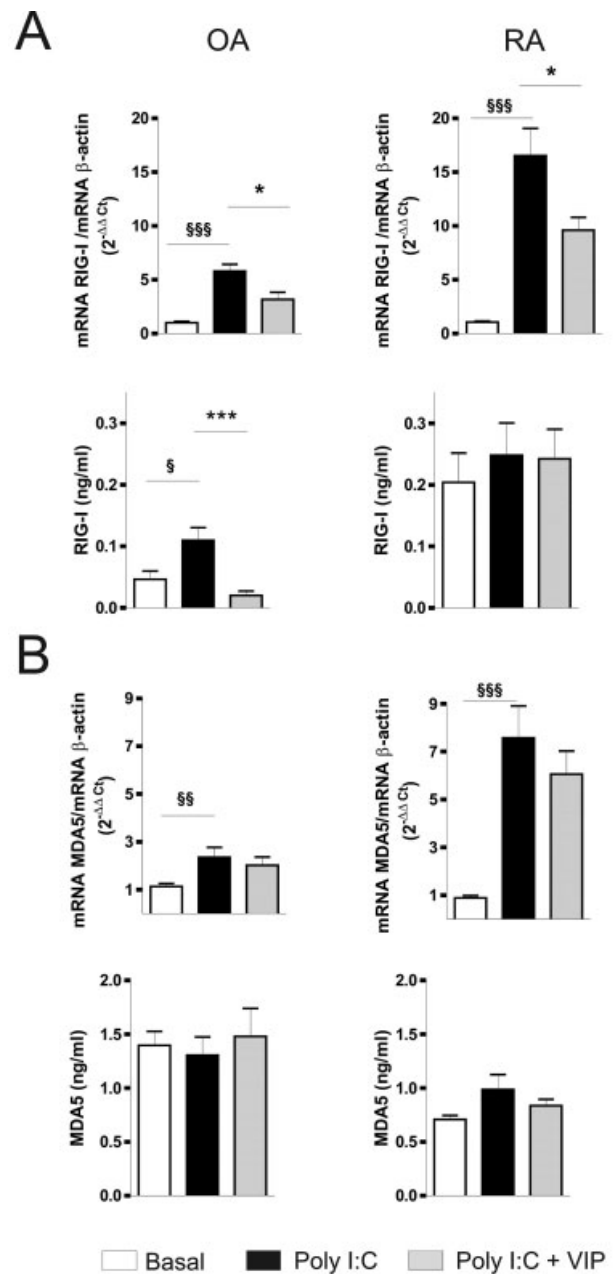


Figure 2. Characterization of induced expression of RIG-I and MDA5 after poly(I-C) stimulation, and analysis of vasoactive intestinal peptide (VIP) treatment. Messenger RNA and protein expression of RIG-I (A) and MDA5 (B) from OA and RA FLS was measured by real-time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively. Messenger RNA and protein expression of both genes was analyzed under 3 conditions: basal, stimulation with poly(I-C), and treatment with poly(I-C) plus VIP. Values for the relative expression of both genes were corrected using mRNA expression of β -actin. Values are the mean \pm SEM results from at least 3 FLS lines measured in triplicate, with basal OA or RA mRNA expression as the referent. * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.001$; § = $P < 0.05$; §§ = $P < 0.01$; §§§ = $P < 0.001$. See Figure 1 for other definitions.

Table 2. Intensity of transcription factor stimulation in OA and RA fibroblast-like synoviocytes*

Transcription factor/ stimulation	OA	RA
IRF-3		
Poly(I-C), 90 minutes	15.02 ± 1.66	10.89 ± 1.67
NF-κB		
Poly(I-C), 1 hour	9.86 ± 1.07	75.88 ± 26.4†
Imiquimod, 1 hour	4.22 ± 0.62	38.29 ± 13.02†
c-Jun		
Poly(I-C), 90 minutes	3.95 ± 0.95	3.91 ± 0.83
Imiquimod, 90 minutes	3.65 ± 1.31	4.64 ± 0.92
c-Fos		
Imiquimod, 2 hours	36.79 ± 8.42	67.65 ± 1.09‡

* Values are the mean ± SEM results from triplicate experiments. Binding of the indicated active nuclear transcription factor to an oligonucleotide was determined using a TransAM kit. Osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes were treated with 20 μg/ml poly(I-C) or 15 μg/ml imiquimod. After stimulation for the periods of time indicated, cells were re-collected, and nuclei were isolated. The amount of active transcription factor was normalized to the levels in basal lysates; IRF-3 = interferon regulatory factor 3.

† $P < 0.05$ versus OA.

‡ $P < 0.01$ versus OA.

transcription factors, such as IRF-3, IRF-7, NF-κB, and AP-1, which induce the production of type I IFNs and inflammation mediators (2). We thus next studied the time course of translocation to the nucleus of these transcription factors after the recognition of the synthetic analogs.

We observed different timing of activation in poly(I-C)- and imiquimod-treated OA FLS (data not shown). Poly(I-C)-induced activation of NF-κB p65 and AP-1 c-Jun was observed within 5 minutes of treatment, whereas activation of IRF-3 was observed after 60 minutes. The highest activation of IRF-3 and AP-1 c-Jun was observed after 90 minutes, while maximum NF-κB p65 activation was reached after 120 minutes. No activation of AP-1 c-Fos was observed after poly(I-C) treatment (data not shown). After the highest activation was achieved, prolonged treatment diminished transcription factor activation, which disappeared when treatment lasted 24 hours (data not shown).

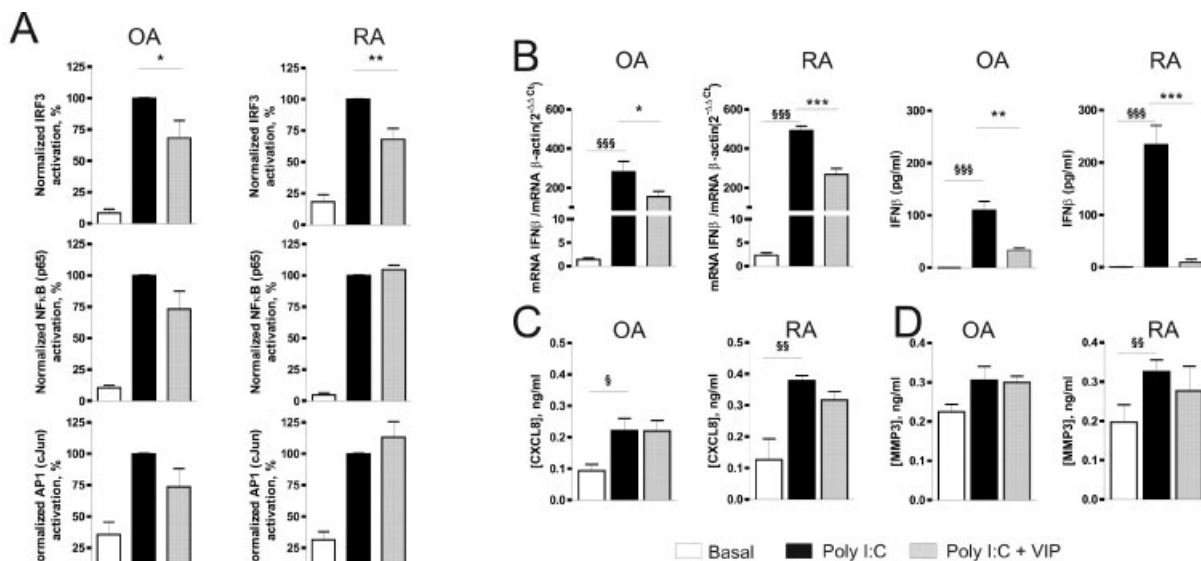


Figure 3. Determination of induced activation of interferon (IFN) regulatory factor 3 (IRF-3), NF-κB, activator protein 1 (AP-1), IFNβ, CXCL8, and matrix metalloproteinase 3 (MMP-3) by poly(I-C) stimulation (for the indicated periods of time), and analysis of vasoactive intestinal peptide (VIP) treatment in OA and RA FLS. **A**, Activation of IRF-3 (90 minutes), NF-κB p65 (120 minutes), and AP-1 c-Jun (90 minutes) in OA and RA FLS was determined with the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based TransAM kit, using nuclear protein extract. Transcription factor activity was normalized to the levels in poly(I-C)-stimulated nuclear extracts (% of stimulated FLS). **B**, Messenger RNA (2 hours) and protein (6 hours) expression of IFNβ from OA and RA FLS was analyzed by real-time PCR using β-actin as the reference gene and ELISA, respectively. **C** and **D**, The presence of CXCL8 and MMP-3, respectively, in the supernatants of OA and RA FLS cultures was determined by ELISA. Every assay was done under 3 conditions: basal, stimulation with poly(I-C), or treatment with poly(I-C) plus VIP. Values are the mean ± SEM from at least 3 FLS lines measured in triplicate. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; § = $P < 0.05$; §§ = $P < 0.01$; §§§ = $P < 0.001$. See Figure 1 for other definitions.

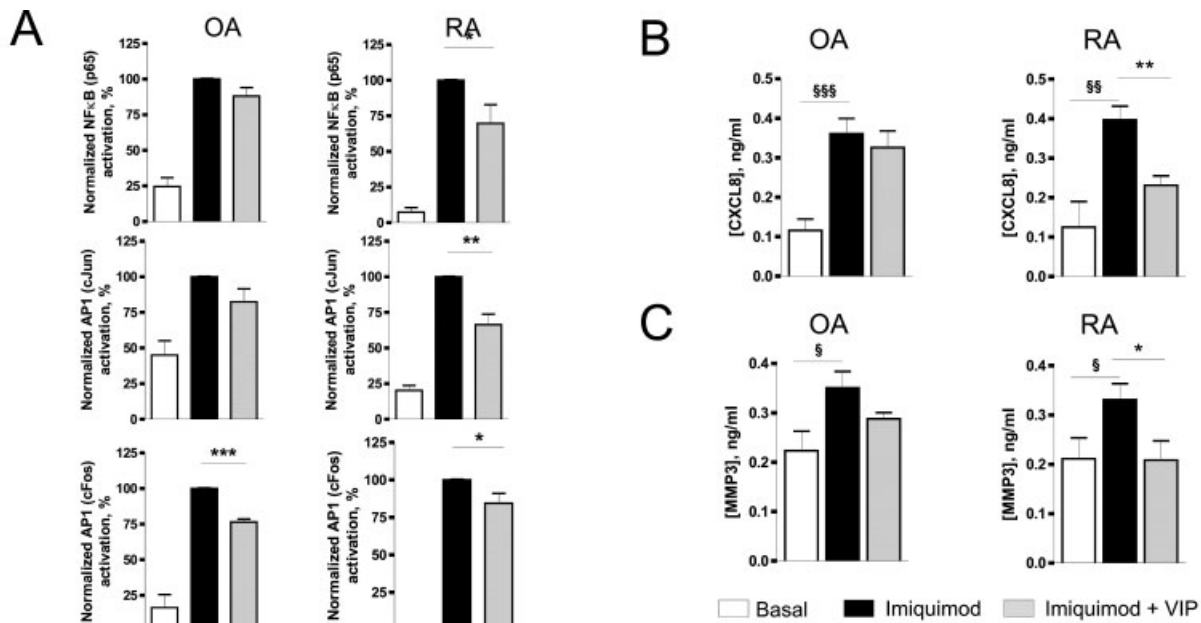


Figure 4. Determination of induced activation of NF- κ B, AP-1, CXCL8, and MMP-3 protein expression by imiquimod stimulation and analysis of VIP treatment in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) fibroblast-like synoviocytes (FLS). **A**, Activation of NF- κ B p65 (60 minutes), AP-1 c-Jun (90 minutes), and AP-1 c-Fos (120 minutes) in OA and RA FLS was determined with the ELISA-based TransAM kit, using nuclear protein extract. Transcription factor activity was normalized to the levels in imiquimod-stimulated nuclear extracts (% of stimulated FLS). **B** and **C**, The presence of CXCL8 and MMP-3, respectively, in the supernatants of OA and RA FLS cultures was determined by ELISA. Activation of NF- κ B p65 and AP-1 c-Jun and c-Fos and protein expression of CXCL8 and MMP-3 were analyzed under 3 conditions: basal, treatment with imiquimod, or treatment with imiquimod plus VIP. Values are the mean \pm SEM from at least 3 FLS lines measured in triplicate. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$; § = $P < 0.05$; §§ = $P < 0.01$; §§§ = $P < 0.001$. See Figure 3 for other definitions.

Imiquimod produced less and earlier activation of NF- κ B p65 than poly(I-C) stimulation. The highest activation of NF- κ B p65 was observed at 60 minutes before AP-1 c-Jun and c-Fos. Moreover, imiquimod triggered the activation of both AP-1 c-Jun and AP-1 c-Fos, with maximum activation observed at 90 minutes and 120 minutes, respectively. AP-1 c-Jun was activated sooner and with more intensity with imiquimod than with poly(I-C), which was not able to activate AP-1 c-Fos. IRF-3 was not activated by imiquimod, and we did not observe IRF-7 translocation after imiquimod or poly(I-C) treatment, even when treatment was prolonged to 2, 4, 6, or 24 hours (data not shown).

Knowing the maximum activation time, we studied the different stimulation intensity in OA FLS and RA FLS. All of the transcription factors studied were activated more strongly in RA FLS, except for IRF-3 and AP-1 c-Jun, for which activation was similar (Table 2). These differences were statistically significant for NF- κ B and AP-1 c-Fos. In summary, we observed maximum transcription factor activation in FLS between 60 minutes and 120 minutes, and poly(I-C) strongly

activated IRF-3 and NF- κ B, whereas AP-1 was more strongly activated by imiquimod.

Effect of VIP on transcription factor activation after poly(I-C) or imiquimod treatment. We investigated whether the potential immunoregulatory role of VIP could be mediated by its effect on nuclear translocation of these transcription factors. VIP significantly diminished poly(I-C)-induced activation of IRF-3 in both OA FLS and RA FLS, but it had little if any effect on the other transcription factors examined in the presence of poly(I-C) (Figure 3A). In imiquimod-treated FLS, VIP decreased activation of every transcription factor (NF- κ B, AP-1 c-Jun, and AP-1 c-Fos), with a significant reduction in all of them in RA FLS and significant inhibition only for AP-1 c-Fos in OA FLS (Figure 4A). Taken together, these results indicate that, after stimulation of dsRNA receptors, VIP produced similar effects in both OA FLS and RA FLS in reducing IRF-3 translocation, whereas after the engagement of ssRNA receptors, VIP was more effective in RA FLS than in OA FLS in terms of down-regulating transcription factors.

Effect of VIP on agonist-stimulated production of IFN β , CXCL8, and MMP-3. Transcription factor activation in response to synthetic agonists has consequences in the production of antiviral agents such as IFN β , proinflammatory chemokines such as CXCL8, and MMPs involved in joint destruction, such as MMP-3. First, we studied the expression of IFN β , which is augmented in response to IRF-3 activation. Poly(I-C) treatment produced a significant increase in IFN β mRNA expression, by almost twice as much in RA FLS compared with OA FLS (Figure 3B, left panels). To determine whether treatment with poly(I-C) could result in increased IFN β secretion by these cells, we measured it by means of ELISA. We did not detect unstimulated IFN β in the supernatants of FLS, but this protein was detected in both OA FLS and RA FLS supernatants after 6 hours of culture, with double secretion in RA FLS compared with that in OA FLS (Figure 3B, right panels). In addition, after poly(I-C) treatment, VIP significantly decreased IFN β mRNA expression, in both OA FLS and RA FLS. At the protein level, VIP significantly reduced IFN β secretion in both RA and OA FLS and nearly eliminated it in RA FLS supernatants (Figure 3B). In contrast, after imiquimod treatment, there was no increase in IFN β , IFN α 1, or IFN α 4 expression at either the mRNA or protein level (data not shown).

CXCL8 is one of the chemokines secreted in response to NF- κ B activation. Therefore, we measured the secretion of CXCL8 in FLS supernatants. Stimulation with poly(I-C) significantly augmented CXCL8 secretion in FLS, but VIP still did not have any effect on this increase (Figure 3C). Imiquimod also significantly enhanced CXCL8 secretion in both RA and OA FLS, and VIP significantly reduced this secretion in RA FLS but not in OA FLS. AP-1 is a key transcription factor for MMP-3 gene expression in FLS. Both poly(I-C) and imiquimod stimulation significantly increased MMP-3 secretion in FLS, except in poly(I-C)-treated OA FLS, where this increase was not significant. VIP significantly diminished MMP-3 production only in imiquimod-treated RA FLS, and a tendency toward diminished production was noted in poly(I-C)-treated RA FLS and imiquimod-treated OA FLS (Figures 3D and 4C). In summary, VIP treatment variably reduced inflammation mediators such as CXCL8, the matrix-degrading enzyme MMP-3, and antiviral IFN β .

DISCUSSION

Rheumatic diseases are a diverse group of disorders, with an unknown etiology and poorly understood

pathogenesis, involving the musculoskeletal system. The innate immune pathways in FLS play a crucial role not only in the initiation but also in the perpetuation of rheumatic diseases. This study is the first to show the constitutive expression, activation, and function of RIG-I, MDA5, and TLR-7 in FLS and also confirms the presence and functionality of TLR-3 described previously by other investigators. Since the initial description of TLR-2 in 2003 (16), it has been generally accepted that the expression of TLRs 2, 3, 4, and 7 and RIG-I is increased in the synovial tissue of patients with RA compared with healthy controls and patients with OA (15,35,36). However, the data regarding their constitutive expression and their activation in isolated FLS are dissimilar, and the differences between both pathologies are not as apparent.

A recent study demonstrated a tendency toward higher basal expression of TLR-3 mRNA in RA FLS when compared with OA FLS, normal FLS, and skin fibroblasts (37), whereas our results demonstrated that these differences are significant at the mRNA level and with great heterogeneity between OA FLS and RA FLS at the protein level. In contrast with a previous study (36), we detected constitutive expression of RIG-I in FLS, which was increased at the protein level in RA FLS. Interestingly, MDA5 and RIG-I have been involved in the induction of apoptosis, and MDA5 has been involved in growth cell suppression (38), 2 pivotal functions of FLS that contribute to RA pathogenesis. The presence of TLR-7 in synovial tissue has been described previously (18,39). This report is the first to describe the constitutive and imiquimod-stimulated expression of TLR-7 in isolated FLS and its coexpression with TLR-3.

TLR-3 stimulation activates the TRIF-dependent signaling pathways activating NF- κ B and AP-1 transcription factors, which induce production of inflammation mediators and MMPs. TRIF also participates in the activation of IRF-3 and IRF-7, which regulate type I IFN, chiefly inducing production of IFN β . IFN β gene transcription is complex and requires IRF-3, NF- κ B, and activating transcription factor 2/c-Jun complexes or enhanceosomes (40).

We observed that poly(I-C) induced the translocation of NF- κ B p65, AP-1 c-Jun, and IRF-3 in FLS. NF- κ B p65 activation was significantly stronger in RA FLS than in OA FLS. Activation of IRF-7 and AP-1 c-Fos was not detected. In a recent study, Sweeney et al observed a primary role of IRF-3 not only in the inhibition of IFN-regulated genes but also in the inhibition of AP-1-regulated genes, while being irrelevant in

the presence of IRF-7 for the production of IFN β and other proinflammation mediators (41). Those investigators reported inducible IRF-7 protein expression at 2 hours that continued for 24 hours. We did not observe the translocation of IRF-7 to the nucleus in our cultures even after 24 hours, confirming the unrelated role of this factor in poly(I-C) stimulation, although we cannot rule out insufficient activation of IRF-3 as a requirement for IRF-7 activation. NF- κ B p65 and AP-1 c-Jun were activated rapidly (in 5 minutes), whereas activation of IRF-3 was observed after 60 minutes, consistent with the results of studies by Sweeney et al (41). Our results confirm those of previous studies of the main role played by IRF-3, NF- κ B p65, and AP-1 c-Jun as components of the enhanceosome for IFN β synthesis, as well as for the production of mediators such as CXCL8 and MMP-3 that are involved in joint destruction (12).

Although dsRNA has arthritogenic properties, TLR-3-knockout mice experienced the development of arthritis, supporting the finding that other receptors such as cytoplasmic receptors are involved in the induction of inflammation (42). Both RIG-I and MDA5 stimulation with poly(I-C) activated IRF-3 and NF- κ B, thus sharing signaling pathways with TLR-3. Although our study provides the first description of the basal expression of cytoplasmic receptors and activation of MDA5 in FLS, the final contribution of TLR-3, RIG-I, and MDA5 to the activation of transcription factors could not be dissected and remains to be elucidated. IRF-3 is involved in the production of the antiviral IFN β , NF- κ B mediates the synthesis of the proinflammatory chemokine CXCL8, and AP-1 is involved in the production of MMP-3. Poly(I-C) induced an increase in gene and protein expression of IFN β , CXCL8, and MMP-3 in RA FLS compared with OA FLS. Again, we cannot dissect the contribution of RIG-I and MDA5 in the production of IFN β and CXCL8. The system is further complicated by the fact that IRF-3 is also involved in the production of MMP-3 and CXCL8 gene expression (41).

TLR-7 responses require myeloid differentiation factor 88, which activates NF- κ B and MAP kinase, as well as IRF-7 signaling in plasmacytoid DCs for the production of type I IFNs, particularly IFN α (2). High levels of this receptor have been reported in plasmacytoid DCs, monocytes, and B cells (34), along with the involvement of various transcription factors such as AP-1 c-Jun and IRF-7. The molecular pathways of TLR-7-mediated activation in FLS have not been characterized to date. Treatment with imiquimod produced activation of NF- κ B, AP-1 c-Jun, and AP-1 c-Fos in FLS, with the consequent up-regulation of CXCL8 and

MMP-3, whereas IRF-7 was not detected in the nucleus on any occasion studied, nor was production of IFN α 1, IFN α 4, and IFN β observed. The up-regulation of CXCL8 has also been reported in human plasmacytoid DCs after treatment with the same agonists (34). It is of interest that we observed an increase in both gene expression and protein production of RIG-I and MDA5 after imiquimod treatment, in accordance with the TLR-7-mediated gene overexpression observed in human plasmacytoid DCs (34), showing the ability of the innate immune system to intensify itself. We also report here, for the first time, the TLR-7-mediated production of MMP-3. Thus, in FLS, TLR-7 stimulation leads to the production of mediators of inflammation and joint destruction, together with amplification of the dsRNA cytoplasmic receptors.

We previously reported the VIP-mediated down-regulated expression of TLR-2 and TLR-4 in RA FLS associated with reduced production of IL-6, CXCL8, and CCL2 (43). In the current study, we showed a VIP-mediated decrease in the expression of RIG-I and MDA5 receptors and no effect of VIP on TLR-3 and TLR-7. VIP treatment reduced the poly(I-C)-induced activation of IRF-3 and consequently the production of IFN β in FLS. The role of IFN β in rheumatic diseases is controversial. It decreases the expression of inflammation mediators produced by synoviocytes, but clinical trials with IFN β have demonstrated negligible effectiveness (44). Moreover, autoimmunity is precipitated by the overproduction of type I IFN and inflammatory cytokines. Roelofs et al reported that in RA tissue, TLR-3/TLR-7 signaling through IFN β /IL-18 expression contributes to the activation of TLR-4, maintaining the proinflammatory cascade (39). The VIP-mediated decrease in IFN β could also contribute to the previously reported VIP-mediated inhibition of TLR-4 expression and the inhibition of proinflammation mediators in FLS.

The effect of VIP on imiquimod-treated FLS was limited to RA, resulting in reduced activation of NF- κ B, AP-1 c-Jun, and AP-1 c-Fos and a decrease in CXCL8 and MMP-3 production. The effect of VIP on FLS is mediated by 2 protein G-coupled receptors, VPAC $_1$ and VPAC $_2$, with overexpression of VPAC $_2$ in RA FLS (31). An important point to note is that imiquimod triggered a potent up-regulation of VPAC $_2$ gene expression in macrophages (45). In accordance with our results, the VIP-mediated inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression through the inhibition of poly(I-C)-induced AP-1 activation in Schwann cells has been reported (46). The precise ligands for the pattern recognition receptors studied in rheumatic diseases have not been identified. Virus occurrence was mainly studied

in RA, where dsRNA such as cytomegalovirus, a ligand for TLR-3, and Epstein-Barr virus, a ligand for RIG-I that induces anti-cyclic citrullinated protein antibodies in patients with RA, were identified, and ssRNA, such as parvovirus B19, were also observed (13,47,48). However, endogenous ligands, such as the necrotic debris present in the joint microenvironment as a result of inflammation (14), and high levels of circulating (49) and synovial fluid nucleic acids (50) could also contribute to both the initiation and maintenance of disease.

Understanding the molecular mechanisms regulating the induction of inflammation and joint destruction mediators, as well as type I IFNs by pattern recognition receptors, is crucial for the development of novel therapeutic immune modulators. In recent years, it has been demonstrated that among these, VIP could be an excellent candidate.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Gomariz had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Gomariz, Gutiérrez-Cañas.

Acquisition of data. Carrión, Pérez-García, Jimeno.

Analysis and interpretation of data. Carrión, Juarranz, Pablos, Gomariz, Gutiérrez-Cañas.

REFERENCES

- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:353–64.
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J* 2009;420:1–16.
- Beutler B. Interferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature* 2004;430:257–63.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730–7.
- Beutler B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev* 2009;227: 248–63.
- Schmidt AT, Schwerd W, Hamm JC, Hellmuth S, Cui M, Wenzel FS, et al. 59-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signalling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12067–72.
- Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, et al. Recognition of 59-triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 2009;31:25–34.
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, et al. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol* 2009;83:10761–9.
- Ranjith-Kumar CT, Murali A, Dong W, Srisathiyarayanan D, Vaughan R, Ortiz-Alcantara J, et al. Agonist and antagonist recognition by RIG-I, a cytoplasmic innate immunity receptor. *J Biol Cell* 2009;284:1155–65.
- Wilkins C, Gale M Jr. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr Opin Immunol* 2009;22:1–7.
- Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356–61.
- Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010;233:233–55.
- Toussiot E, Roudier J. Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. *Joint Bone Spine* 2007;74:418–26.
- Brentano F, Schorr O, Gay RE, Gay S, Kyburz D. RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3. *Arthritis Rheum* 2005;52:2656–65.
- Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, et al. Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2006;176:7021–7.
- Seibl R, Birchler T, Loeliger S, Hossle JP, Gay RE, Saurenmann T, et al. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 2003;162:1221–7.
- Radstake TR, Roelofs MF, Jenniskens YM, Oppers-Walgreen B, van Riel PL, Barrera P, et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon- γ . *Arthritis Rheum* 2004;50:3856–65.
- Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, van Lieshout AW, Sprong T, van den Hoogen FH, et al. The expression of Toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid synovium is increased and costimulation of Toll-like receptors 3, 4, 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2005;52: 2313–22.
- Gutierrez-Canas I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martinez C, Galindo M, et al. VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:527–32.
- Arranz A, Gutierrez Canas I, Carrion M, Juarranz Y, Pablos JL, Martinez C, et al. VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signalling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mol Immunol* 2008;45:3065–73.
- Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, et al. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003;124:961–71.
- Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev* 2004;56: 249–90.
- Li H, Mei Y, Wang Y, Xu L. Vasoactive intestinal peptide suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T helper 1 responses. *J Clin Immunol* 2006;26:430–7.
- Lodde BM, Mishiba F, Wang J, Cotrim AP, Afiore S, Tak PP, et al. Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006;65: 195–200.
- Said SI, Hamidi SA, Dickman KG, Szema AM, Lyubsky S, Lin RZ, et al. Moderate pulmonary arterial hypertension in the male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation* 2007; 115:1260–8.
- Jimeno R, Gomariz RP, Gutierrez-Canas I, Martinez C, Juarranz Y, Leceta J. New insights into the role of VIP on the ratio of T-cell subsets during the development of autoimmune diabetes. *Immunol Cell Biol* 2010;88:734–45.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by down-regulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 2001;7:563–8.
- Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutierrez-Canas I, Palao G, Galindo M, et al. Vasoactive intestinal peptide modulates

- proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:416–22.
29. Juarranz Y, Gutierrez-Canas I, Arranz A, Martinez C, Abad C, Leceta J, et al. VIP decreases TLR4 expression induced by LPS and TNF α treatment in human synovial fibroblasts. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1070:359–64.
 30. Gutierrez-Canas I, Juarranz Y, Santiago B, Martinez C, Gomariz RP, Pablos JL, et al. Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 2008;22:312–7.
 31. Juarranz Y, Gutierrez-Canas I, Santiago B, Carrion M, Pablos JL, Gomariz RP. Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2008;58:1086–95.
 32. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315–24.
 33. Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Torres C, Brehmer MT, Blanco FJ, et al. Synovocyte-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2003;170:2147–52.
 34. Birmachou W, Gleason RM, Bulbulian BJ, Riter CL, Vasilakos JP, Lipson KE, et al. Transcriptional networks in plasmacytoid dendritic cells stimulated with synthetic TLR7 agonists. *BMC Immunology* 2007;8:26.
 35. Brentano F, Kyburz D, Gay S. Toll-like receptors and rheumatoid arthritis. In: McCoy CE, O'Neill LA, editors. *Methods in molecular immunology: Toll-like receptors*. Vol. 517. Secaucus (NJ): Springer; 2009. p. 329–43.
 36. Imaizumi T, Arikawa T, Sato T, Uesato R, Matsumiya T, Yoshida H, et al. Involvement of retinoic acid-inducible gene-I in inflammation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clin Exp Immunol* 2008;153:240–4.
 37. Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP, 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;58:3684–92.
 38. Barral PM, Sarkar D, Su ZZ, Barber GN, DeSalle R, Racaniello VR, et al. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA5: key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther* 2009;124:219–34.
 39. Roelofs MF, Wenink MH, Brentano F, Abdollahi-Roodsaz S, Oppers-Walgreen B, Barrera P. Type I interferons might form the link between Toll-like receptor (TLR) 3/7 and TLR4 mediated synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA). *Ann Rheum Dis* 2008;68:1486–93.
 40. Panne D, Maniatis T, Harrison SC. An atomic model of the interferon- β enhanceosome. *Cell* 2007;129:1111–23.
 41. Sweeney SE, Kimbler TB, Firestein GS. Synovocyte innate immune responses: II. Pivotal role of regulatory factor 3. *J Immunol* 2010;184:7162–8.
 42. Zare F, Bokarewa M, Nenonen N, Bergstrom T, Alexopoulou L, Flavell RA. Arthritogenic properties of double-stranded (viral) RNA. *J Immunol* 2004;172:5656–63.
 43. Gomariz RP, Gutierrez-Canas I, Arranz A, Carrion M, Juarranz Y, Leceta J, et al. Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics. *Curr Pharm Design* 2010;16:1063–80.
 44. Van Holten J, Pavelka K, Vencovsky J, Stahl H, Rozman B, Genovese M, et al. A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon- β in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:64–9.
 45. Herrera JL, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Montesinos R, Quintana FJ, Najmanovich R, Pozo D. Toll-like receptors stimulation differentially regulates vasoactive intestinal peptide type 2 receptor in macrophages. *Cell Mol Med* 2009;13:3209–17.
 46. Lee H, Park K, Kim JS, Lee SJ. Vasoactive intestinal peptide inhibits Toll-like receptor 3-induced nitric oxide production in Schwann cells and subsequent sensory neuronal cell death in vitro. *J Neuro Res* 2009;87:171–8.
 47. Sawada S, Takei M, Inomata H, Nozaki T, Shimiraiwa H. What is after cytokine-blocking therapy? A novel therapeutic target-synovial Epstein-Barr virus for rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2007;6:126–30.
 48. Pratesi F, Tommasi C, Anzilotti C, Chimenti D, Migliorini P. Deiminated Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:733–41.
 49. Galeazzi M, Morozzi G, Piccini M, Chen J, Bellisai F, Fineschi S, et al. Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmun Rev* 2003;2:50–5.
 50. Magnusson M, Zare F, Tarkowski A. Requirement of type I interferon signalling for arthritis triggered by double-stranded RNA. *Arthritis Rheum* 2006;54:148–57.

ARTÍCULO 3

Mar Carrión, Yasmína Juarranz, Carmen Martínez, Ana M. Ortiz, Isidoro González-Álvaro, José L. Pablos, Irene Gutiérrez-Cañas, Rosa P. Gomariz

Upregulation of IL-22/IL-22R1 by inflammatory mediators and expression of S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.

Biochemical Pharmacology (Enviado).

Upregulation of IL-22/IL-22R1 by inflammatory mediators and expression of S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts

Mar Carrión^a, Yasmina Juarranz^a, Carmen Martínez^b, Ana M. Ortiz^c, Isidoro González-Álvarez^c, José L. Pablos^d, Irene Gutiérrez-Cañas^a, Rosa P. Gomariz^{a,*}

^aDepartamento de Biología Celular, Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid, C/ José Antonio Nováis, 2. Ciudad Universitaria, 28040 – MADRID- SPAIN

^bDepartamento de Biología Celular, Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal. Ciudad Universitaria, 28040 – MADRID-SPAIN

^cServicio de Reumatología. Hospital Universitario de la Princesa. Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa, C/ Diego León, 62, 28006 – MADRID-SPAIN

^dServicio de Reumatología, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (I+12), Avda. de Córdoba, s/n, 28041 – MADRID-SPAIN

ARTICLE INFO

Keywords:
Inflammation
Rheumatic diseases
IL-22
IL-22R1
Alarmins

ABSTRACT

Fibroblast-like synoviocytes (FLS) play a crucial role in the pathogenesis of synovitis in rheumatic diseases contributing actively to inflammation and joint erosion. Targeting FLS activation represents an approach to the development of therapeutic strategies. Our aim was to investigate whether the microenvironment of inflamed joints could modulate the expression of IL-22 and IL-22R1 on human osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) FLS. Besides, we examined the IL-22 effect on FLS mediated joint destruction as well as on their IL-17 related responses.

We described that IL-22 and IL-22R1 were expressed constitutively in FLS and, we demonstrated, for the first time, that S100A8 and S100A9 alarmins were synthesized in FLS. Our results revealed that proinflammatory cytokines and TLR ligands increased the expression of IL22/IL-22R1 axis in FLS, with the subsequent amplification of joint inflammation and destruction. IL-22 leads to the enhancement of FLS proliferation together with the up-regulation of MMP1 and S100A8/A9 production. We reported that STAT3 phosphorylation was induced in FLS after IL-22 treatment and that IL-22 stimulatory effect on S100A8/A9 expression was mediated by JAK2 and JAK3 signalling pathways. Besides, we showed an inhibitory action of IL-22 on IL-23 and IL-17RC expression in RA-FLS as well as on IL-17RA in OA-FLS. Our results point that therapies based on the pharmacological disruption signalling of IL-22 could be beneficial for the treatment of rheumatic diseases. It is also of interest that the restricted expression of IL-22R1 to non-lymphoid cells, could lead to a reduction of side effects mediated by immune responses.

1. Introduction

IL-22 belongs to the IL-10 superfamily of cytokines within the IL-20 subfamily that includes IL-19, IL-20, IL-24 and IL-26. IL-22 signals through a heterodimeric receptor complex composed of the IL-22R1 and IL10-R2 chains [1], mainly activating the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). Unlike the ubiquitous presence of IL-10R2 chain, IL-22R1 expression is restricted to non-immune cells determining them as specific IL-22 targets [2, 3].

IL-22/IL-22R1 interactions are recognized as key participants in the antimicrobial defence, regeneration and protection against damage, however its role in inflammatory disorders is still controversial and either protective or highly pathogenic functions have been described [4]. IL-22 has shown to be protective during the development of hepatitis [5] and inflammatory bowel disease [6], whereas in psoriasis an inflammatory role has been found [7].

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, inflammatory and autoimmune disease that primary attacks synovial joints, ending up in articular destruction [8]. Recent studies suggest a correlation between IL-22 and arthritis. Although IL-22 and its receptor have been identified in the synovium of RA patients,

the precise involvement of this cytokine in the disease pathophysiology remains to be established. The scarce reports of IL-22 in RA pathogenesis have been mainly obtained in relation to T cell lineage. In this sense, increased numbers of T helper (Th) 17 cells are detected in peripheral blood mononuclear cells and joints of RA patients, which are one of the IL-22-expressing cell subsets identified [9-11].

FLS are leading cells in the establishment and progression of arthritis because of their ability to invade into cartilage and to produce a variety of mediators involved in joint inflammation and destruction [12]. This pathogenic behavior is activated and enhanced in response to multiple pathways, including pro-inflammatory mediators and Toll-like receptor (TLR) agonists [13].

In 2005 Ikeuchi *et al* described, for the first time, the presence of IL-22 and its specific receptor in synovial tissue and RA-FLS, as well as its role in proliferation and MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) stimulation [14]. In the mouse CIA (Collagen-Induced Arthritis) model, IL-22 promoted inflammation and joint destruction [15]. Besides high IL-22 levels in synovial fluid of RA patients have been found to be correlated with radiographic disease progression [16, 17].

In this study we examined the IL-22/IL-22R1 axis in FLS of osteoarthritis (OA) and RA patients, two rheumatic diseases with a wide distribution among human population. The hypothesis tested was that the expression of IL-22 and its receptor in FLS would be modulated by inflammatory cytokines and TLR ligands present in joint microenvironment. Besides IL-22 would stimulate the aggressive behavior of FLS and would modulate their molecular contribution to the IL-17/IL-23 axis.

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4971; fax: +34 91 394 4981.

E-mail addresses: marcarrion@bio.ucm.es (M. Carrion), yashina@bio.ucm.es (Y. Juarranz), cmmora@bio.ucm.es (C. Martínez), lanult@yahoo.es (A. M. Ortiz), isidoro.ga@ser.es (I. González-Álvarez), jl.pablos@h12o.es (J. L. Pablos), irgutier@pdi.bio.es (I. Gutiérrez-Cañas), gomariz@bio.ucm.es (R. P. Gomariz)

ARTÍCULO 4

Mar Carrión, Selene Pérez-García, Rebeca Jimeno, Yasmína Juarranz, Isidoro González- Álvaro José Luis Pablos, Irene Gutiérrez-Cañas, Rosa P. Gomariz

Inflammatory mediators alter IL-17 receptors, IL-12 and IL-23 expression in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Immunomodulation by VIP.

Neuroimmunomodulation (Aceptado). DOI: 10.1159/000350892

Inflammatory mediators alter IL-17 receptors, IL-12 and IL-23 expression in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Immunomodulation by VIP

Mar Carrión^a, Selene Pérez-García^a, Rebeca Jimeno^a, Yasmina Juarranz^a, Isidoro González-Álvaro^b José Luis Pablos^c, Irene Gutiérrez-Cañas^a, Rosa P. Gomariz^{a*}

^aDepartamento de Biología Celular, Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain. ^bServicio de Reumatología. Hospital Universitario de la Princesa. Instituto de Investigación Sanitaria la Princesa, Madrid, Spain. ^cServicio de Reumatología, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (I+12), Madrid, Spain

Key Words

IL-17R · IL-12 · IL-23 · synovial fibroblast · VIP · rheumatic diseases

Abstract

Aims: To assess the fibroblast-like synoviocytes (FLS) contribution to inflammatory joint microenvironment under different pathogenic stimuli and their potential to respond to IL-17. To determine whether the neuroimmunomodulatory peptide VIP is able to modulate IL-17 receptor and related cytokines. **Methods:** We study in osteoarthritis (OA) and rheumatoid arthritis (RA) FLS the effect of proinflammatory cytokines (TNF α , IL-17) and Toll-like receptors (TLR) ligands (poly(I:C), LPS) on IL-17 receptors expression and on the production of IL-12 and IL-23, involved in Th1/Th17 differentiation. The effect of VIP was also determined. IL-17RA, IL-17RC, IL-12p35 and IL-23p19 expression was measured by Real Time PCR. IL-12 and IL-23 protein levels were measured by ELISA in supernatant cultures. **Results:** TNF α , LPS and poly(I:C) induced an increase of IL-17RA in RA-FLS, whereas TNF α , TNF α plus IL-17 and poly(I:C) enhanced IL-17RC transcripts in FLS. VIP diminished the TNF α and poly(I:C) up-regulated expression of IL-17RA in RA-FLS. TNF α , LPS and poly(I:C) increased IL-12 and IL-23 in cells derived from patients

presenting both pathologies. However, IL-17A decreased IL-12 and augmented IL-23. VIP reduced IL-12p35 mRNA up-regulated by poly(I:C) and IL-23p19 transcripts in LPS treated FLS. **Conclusions:** Inflammatory cytokines and TLR ligands modulate IL-17 receptors, IL-12 and IL-23 what could be favouring the cross-talk between FLS and Th1/Th17 cells. The ability of VIP to counteract the enhancing effect of proinflammatory molecules on IL-17 receptors and IL-12 family of cytokines corroborates and amplifies the beneficial effect of this endogenous neuroimmunopeptide in rheumatic diseases.

Irene Gutiérrez-Cañas and Rosa P. Gomariz share senior authorship.

Introduction

Numerous Rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) are two chronic inflammatory diseases characterized by synovitis that leads to joint destruction and functional impairment [1,2]. Development of RA is associated to distinctive modifications of the synovium such as neoangiogenesis,

Rosa P. Gomariz
Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología
Complutense University, Antonio Novais n° 2, Ciudad Universitaria
ES-28040 Madrid (Spain)
Tel. +34 91 394 4971, Fax +34 91 394 4981, E-Mail gomariz@bio.ucm.es

REVISIÓN

Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, Arranz A, Carrión M, Juarranz Y, Leceta J, Martínez C.

Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics.

Curr Pharm Des. 2010;16(9):1063-80.

Peptides Targeting Toll-Like Receptor Signalling Pathways for Novel Immune Therapeutics

Rosa P. Gomariz*, Irene Gutiérrez-Cañas, Alicia Arranz, Mar Carrión, Yasmina Juarranz, Javier Leceta and Carmen Martínez¹

Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain, ¹Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain

Abstract: Toll-like receptors (TLRs) are a family of key proteins that permit mammals to detect microbes and endogenous molecules, which are present in body fluids, cell membranes and cytoplasm. They confer mechanisms to the host for maintaining homeostasis, activating innate immunity and inducing signals that lead to the activation of adaptive immunity. TLR signalling induces the expression of pro-inflammatory and anti-viral genes through different and intricate pathways. However, persistent signalling can be dangerous and all members of the TLR family are involved in the pathogenesis of acute and chronic inflammation, autoimmunity, allergy, cancer and aging. The pharmaceutical industry has begun intensive work developing novel immunotherapeutic approaches based on both activation and inhibition of TLR triggering. Further, clinical trials are pending to evaluate TLR agonists as novel vaccine adjuvants and for the treatment of infectious diseases, allergic diseases and asthma. Since systemic, metabolic and neuroendocrine changes are elicited by inflammation, TLR activity is susceptible of regulation by hormones and neuroendocrine factors. Neuroendocrine mediators are important players in modulating different phases of TLR regulation contributing to the endogenous control of homeostasis through local, regional and systemic routes.

Vasoactive intestinal peptide (VIP) is an important signal molecule of the neuroendocrine-immune network that has recently emerged as a potential candidate for the treatment of inflammatory and autoimmune disorders by controlling innate and adaptive immunity. This review shows current advances in the understanding of TLR modulation by VIP that could contribute to the use of this natural peptide as a therapeutic tool.

Keywords: TLR, neuropeptides, VIP, autoimmunity, inflammation, immunotherapy, drug design.

OVERVIEW

The immune system traditionally comprises both innate and adaptive immunity. However, as with every biological pathway studied, these two systems are not isolated but instead are interconnected and modify each other. Innate immunity uses pattern-recognition receptors (PRRs) which are present in body fluids, cell membranes and cytoplasm. These PRRs recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) which are present in a variety of microbial invaders, such as bacteria, fungi, protozoa and viruses.

Toll-like receptors (TLRs) are the best-characterised PRRs. They were discovered on account of their homology with the *Drosophila* toll protein (Toll), which is able to induce innate immune responses [1]. They belong to the interleukin (IL)-1 receptor/TLR superfamily of proteins which all contain cytoplasmic Toll/IL-1 receptor (TIR) domains that mediate interactions between TLRs and TIR-containing adapters. They differ from IL-1R in that TLRs possess leucine-rich repeats (LRRs) at their ectodomain whereas IL-1R has Ig-like domains. The TIR domain has three conserved boxes, two of which are implicated in signalling but the function of the third box is not fully understood [2]. LRRs mediate the recognition of different PAMPs present on their ligands (Table 1). Finally, TLRs have a transmembrane domain implicated in their cellular localization and changes in this domain lead to different location of the receptor [3, 4].

Apart from TLRs that are transmembrane PRRs, there are also cytosolic PRRs such as nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), RIG-I-like helicases (RLHs) and interferon (IFN) stimulatory DNA (ISD) sensor. They have important roles in the innate immune response following virus infection or when bacteria achieve entry to the cytosol, or even as a redundancy system when ligands achieve avoidance of transmembrane TLRs responses [5].

These cytosolic PRRs can be subdivided into two subgroups according to their mechanism of activation. The first class, including NLR family members Nod1 and Nod2, Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like helicases (RLHs) and apparently the ISD sensor, act by direct detection of cytosolic PAMPs, starting several signalling cascades. The second class comprises members of NLRs that are involved in the formation and activation of protein complexes called inflammasomes, which are implicated in activating caspase1 cascade, leading to IL-1 β secretion [6].

Currently, 13 members of the TLR family are known in mammals, 10 of which are present in humans. They can be classified into two subfamilies according to their cellular localization; TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 and TLR10 are expressed on the cell surface while TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9 are found on intracellular compartments, such as endosomes and endoplasmic reticulum [7]. TLRs recognize both natural and synthetic ligands in such a way that each TLR, alone or by dimerization, recognizes different bacterial, fungal and viral PAMPs. Apart from these exogenous ligands, it is broadly accepted that they also recognize endogenous ligands, including extracellular matrix molecules (Table 1) [8-11].

TLR SIGNALLING

Once TLRs encounter their ligand, usually they dimerize (homo- or hetero-) and interact with adapter proteins by their TIR domain, since these adapters also have TIR domains. So far, four adapters are known to be required for different TLRs. The myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) is the universal adapter as it is used by all TLRs with the exception of TLR3. In fact, the signalling pathways activated by TLRs are classified into MyD88-dependent and MyD88-independent pathways. The other adapters are MyD88 adapter-like protein (Mal), also designated TIR domain containing adapter protein (TIRAP); TIR domain-containing adapter protein-inducing IFN β (TRIF), also called TIR-containing adapter molecule-1 (TICAM-1); TRIF-

*Address correspondence to this author at the Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain; Tel: +34-913944971, Fax: +34-3944981; E-mail: gomariz@bio.ucm.es

Table 1. Human TLRs, Adapters, Accessory Molecules and Ligands

TLR	Adapters	Accessory Molecules	Ligands	
			Exogenous	Endogenous
TLR1	MyD88/TIRAP	PRAT4A gp96	Triacyl lipopeptide	
TLR2	MyD88/TIRAP	CD14 CD36 RP105/MD-1 gp96	PGN, LTA, Zymosan Lipopeptides (Pam ₃ CSK ₄), Porins, Glycolipids, Atypical LPS, Lipoarabinomannan, GIPLs	Hsp60, Hsp70, gp96, EDN, HMGB1, Biglycan, Hyaluronan
TLR3	TRIF	CD14 Unc93B gp96	Double-stranded RNA (virus), Poly (I:C)	mRNA
TLR4	MyD88/TIRAP TRIF/TRAM	CD14 HMGB1 MD-2 RP105/MD-1 PRAT4A gp96	LPS, Taxol, Hsp60, Pertussis Toxin, Envelope Proteins (virus), Fusion Proteins, Hyphae, GILPs	Hsp22, α -A Crystallin, Fibrinogen, Fibronectin A, Heparan Sulphate, Hyaluronan Fragments, Surfactant Protein A, β -Defensin 2-Fusion Protein
TLR5	MyD88	gp96	Flagellin	
TLR6	MyD88/TIRAP	CD14 CD36	Diacyl Lipopeptides, LTA, Zymosan	
TLR7	MyD88	Unc93B PRAT4A gp96	ssRNA, Imiquimod, Resiquimod (R848), Synthetic Poly U RNA, Certain siRNAs	RNA Immune Complex siRNAs Encapsulated
TLR8	MyD88		ssRNA, Resiquimod (R848)	siRNAs encapsulated
TLR9	MyD88	HMGB1 LL37 Unc93B gp96	CpG ODN, Pigment Hemozoin	DNA Immune Complex, Chromatin Immune Complex
TLR10	Unknown		Not Determined	

related adaptor molecule (TRAM), also known as TICAM-2, and TIR domain-containing protein (TIRP).

TRIF is the sole adapter used by TLR3, and the other TLR that uses this adapter is TLR4, that activates the MyD88 independent pathway using TRIF coupled to TRAM. On the other hand, TLR4, which was the first TLR described, needs TIRAP to activate the MyD88-dependent pathway. The remaining TLRs only activate the MyD88-dependent pathway using (TLR1, 2, 6) or not using (TLR5, 7, 8, 9) TIRAP (Table 1) [12, 13]. The last adapter described was sterile α and Heat-armorillo motifs (SARM) which, unlike the others, is not required for TLRs' signalling: on the contrary, it has been found that human SARM is a negative regulator of TRIF-dependent signalling, as we will describe later [14].

In addition, some accessory molecules are required for microbial recognition, signalling and modulation of TLR responses (Table 1). Some of them directly interact with TLR ligands, CD14 being an essential protein for LPS signalling through TLR4. Others,

e.g. MD-2, are present on the cell surface or, e.g. Unc93B [15], in the endoplasmic reticulum.

Both MyD88-dependent and MyD88-independent signalling also activate different transcription factors. Thus, all TLRs activate nuclear factor (NF)- κ B and activator protein-1 (AP-1), inducing the production of proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF) α , IL-6, IL-1 and chemokines, such as CCL2 or CXCL8. Some TLRs also activate interferon regulatory factor 3 (IRF3) and/or IRF7, leading to the production of type I IFNs such as IFN β and IFN α s [16-18].

When a TLR binds MyD88 by its TIR domain, alone or with TIRAP, it recruits members of the Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK) family, notably IRAK4, which once activated, phosphorylates IRAK1, leading to release of both proteins from MyD88 and binding to TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) [16] Fig. (1). Of two further IRAKs, IRAK2 is critical in late-phase TLR responses but functions redundantly with

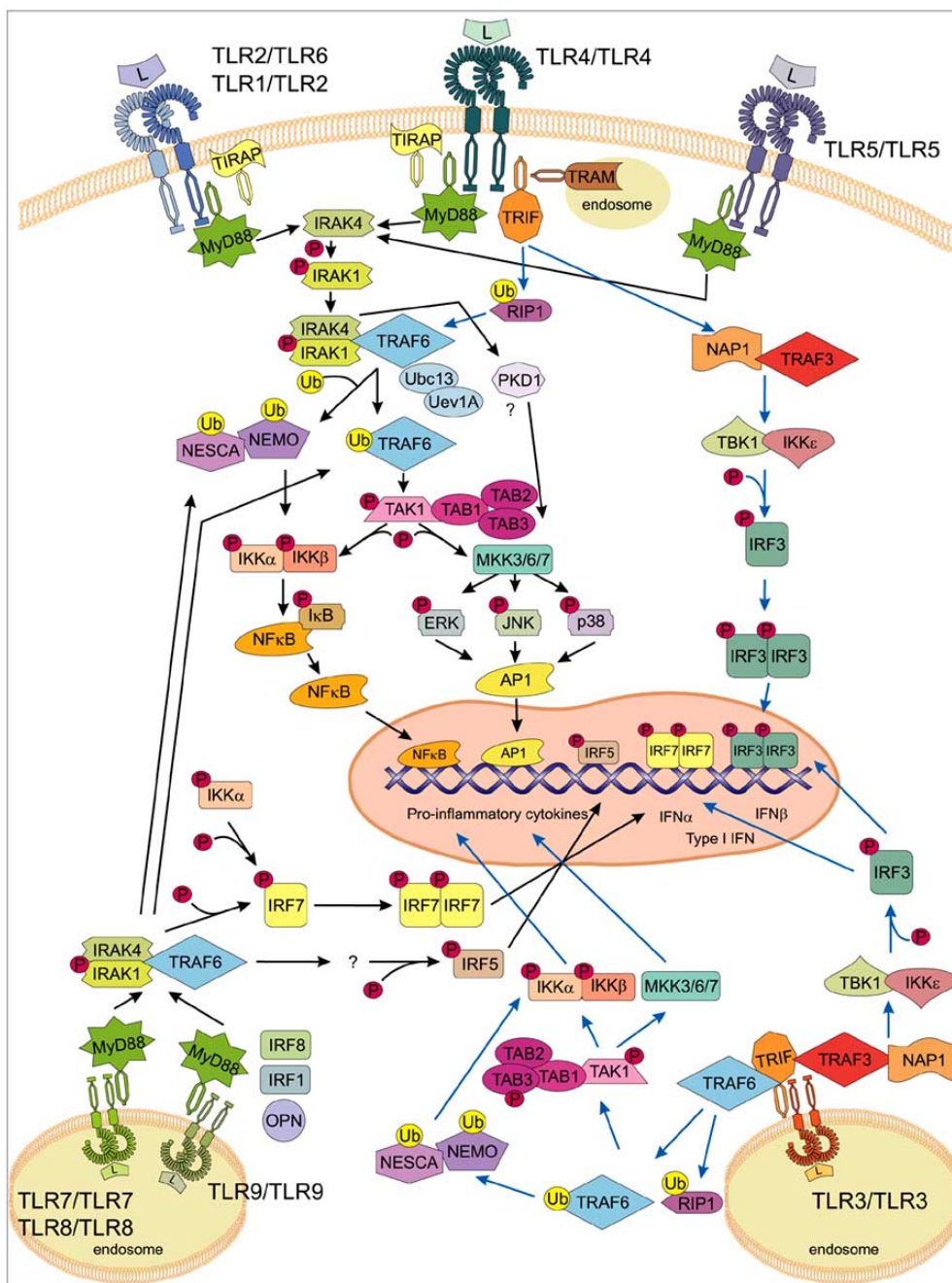


Fig. (1). TLR signalling pathways. Both superficial and endosomal signalling pathways are schematized. MyD88- and TRIF- dependent pathways are indicated by black and blue arrows, respectively. For abbreviations and explanation see text.

IRAK1 in the initial response and has been shown to be critical in TLR4 signalling, where it controls cytokine and chemokine expression in TLR4-induced septic shock [19, 20]. The other is IRAK-M, which is a negative regulator of TLR signalling [21]. TRAF6 is an E3 ubiquitin ligase that stimulates the synthesis of lysine 63-linked polyubiquitin chains when it is bound to an E2 enzyme complex that consists of Ubc13 and Uev1A; these polyubiquitin chains are formed on target proteins, including NF-κB essential modifier (NEMO) and TRAF6 itself [22]. It has recently been described that NESCA, a NEMO-interacting protein, is also polyubiquitinated and interacts with NEMO, being implicated in the NEMO-mediated NF-κB activation pathway [23]. The next step in this cascade is the autophosphorylation and activation of transforming growth factor β (TGFβ)-activated kinase 1 (TAK1), the catalytic subunit which is complexed to a regulatory

unit; namely TAK1-binding subunit (TAB1) and either of two structurally related proteins, TAB2 and TAB3. TAK1 functions as a mitogen-activated protein kinase (MAPK) KK and is able to activate two downstream pathways. IKK complex formed by two catalytic subunits, IKKα and IKKβ with a regulatory unit, NEMO (IKKγ), which is responsible for phosphorylation of IκB, is necessary for its degradation and the subsequent nuclear translocation of the transcription factor NF-κB, normally located in the cytoplasm. TAK1 also couples to MKK3-MKK6 and MKK7, the respective upstream kinases for p38 and JNK, which regulate AP-1 transcription activity [16, 22, 24] Fig. (1). Latterly, it has been shown that protein kinase D1 is activated by all TLRs except TLR3 in such a way that IRAK4 and IRAK1 are involved but not TRAF6, and MyD88-dependent activation of MAPKs and transcription factors depends upon PKD1 [25].

The pathway described above is initiated by all TLRs that couple MyD88, but another pathway launched by this adapter is used only by TLR7, TLR8 and TLR9 and seems to be cell-specific, occurring in mouse and human plasmacytoid dendritic cells. This pathway leads to type I interferon production and contributes to antiviral defence. In this case MyD88 binds to TRAF6 and forms a complex with IRAK4 and IRF7 where IRF7 is phosphorylated through IRAK1. Another protein, IKK α , is capable of phosphorylating IRF7, so both, IRAK1 and IKK α , work together, but their functional relationship remains unclear. IRF7 dimerizes and translocates to the nucleus after being phosphorylated in a process in which phosphatidylinositol-3 kinase is also crucial [26]. Other proteins involved in this pathway include osteopontin, IRF1 and IRF8 which have been described in TLR9. In addition in TLR7, 8 and 9, TRAF3 associates with IRAK1 for IRF7 activation. Finally IRF5, which binds MyD88 and TRAF6 in conventional dendritic cells following stimulation with the three of them, and translocates to the nucleus after phosphorylation. IRF7 activation results in type I IFN production, notably of IFN α [17, 18, 27-29] Fig. (1).

So far we have been describing MyD88-dependent pathways but, as indicated, there is a MyD88-independent pathway that starts with TRIF and so is also called the TRIF-dependent pathway. TRIF is able to switch on NF- κ B and IRFs and is used on its own by TLR3 and with the bridging adapter TRAM by TLR4. TRIF binds TRAF6 and TRAF3, each inducing one transcription factor. When TRAF6 is bound to TRIF, another protein, the receptor-interacting protein 1 (RIP1), is polyubiquitinated and promotes interaction with TAK1, which in turn activates IKK α and IKK β , the latter having an essential role in subsequent NF- κ B activation. TAK1 also activates MAPKs JNK, p38 and ERK. On the other hand, TRIF binds to TRAF3; which links TRIF to the TRAF family member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1 (TBK1) (also known as NF- κ B-activating kinase or NAK), an ubiquitously expressed protein. NAK associated protein 1 (NAP1) is also known to form a complex with TRIF and is needed for inducing the oligomerization and activation of TBK1. TRIF also binds to IKK ϵ (also named IKKi) whose expression is inducible. Both kinases (TBK1 and IKK ϵ) phosphorylate IRF3 which in turn homodimerizes and is translocated to the nucleus, where it induces production of type I IFN, mainly IFN β , serving as an antiviral defense. Interestingly, both kinases are not essential for IFN α production in response to TLR7 or TLR9 ligands [18, 27, 30, 31] Fig. (1).

All in all, TLR signalling activation triggers microbicidal pathways and inflammation, as well as the initiation of adaptive immune responses.

TLRs, HARMONIZING HOMEOSTASIS AND PATHOGENESIS

Inflammation has been commonly defined as the first step in the initiation of the innate immune system. It is a multistep response which includes both proinflammatory mediators and antimicrobial effectors that have to be sufficiently lethal to kill pathogens quickly, avoiding collateral injury to the host. Data obtained in recent years, demonstrates that inflammation is a complex response, not just to infection but also to other conditions of homeostatic imbalance that can lead to the development of diverse diseases. All in all, inflammation generates high morbidity and mortality rates in humans. Thus, excessive acute inflammation leads into pathogenesis and septic shock at worst [32]. Recently, several diseases which include autoimmunity and cancer have been associated with a chronic inflammatory response [33-35].

Although we still do not know what provokes chronic inflammation, genetic predisposition, environmental factors and exposure to infectious agents, as well as the failure of endogenous anti-inflammatory mechanisms, have been proposed to be involved in the etiology of autoimmune diseases. Chronic inflammation produces the breaking of self-tolerance by generating autoimmune

disorders such as systemic lupus erythematosus (SLE), psoriasis, rheumatoid arthritis (RA), inflammatory bowel disease (IBD), atherosclerosis and type 1 diabetes [9].

Other sources of evidence, from epidemiological to molecular studies, also show a relationship between inflammation and cancer. Several aspects of chronic inflammation raise the possibility of developing cancer. These include microbial infections, such as the infection with *Helicobacter pylori* associated with gastric cancer; inflammatory conditions of unknown origin, such as prostatitis associated with prostate cancer, and even autoimmunity, bearing in mind that IBD is associated with colon cancer [36, 37]. The micro-environment of most cancers shares a number of properties with chronic inflammation, such as inflammatory cells and mediators, angiogenesis and tissue remodeling. More recently, inflammatory mediators have even been found to be involved in metastasis [38].

TLRs have been involved in homeostasis, such as in the gastrointestinal tract. Under healthy conditions, the host is exposed to PAMPs without showing signs of inflammation due to higher tolerance to PAMPs, and the protection conferred by optimal activation of TLRs [39]. A deregulation of the expression and function of TLRs causes several disorders, including inflammatory bowel disease [39] and chronic liver diseases [40].

Because TLRs have been involved in homeostasis and disease, activation of TLRs must be tightly regulated. It is essential to activate innate immune responses rapidly, enhancing adaptive immunity. However, persistent signalling can be dangerous and all members of the TLR family are involved in the pathogenesis of acute and chronic inflammation, autoimmunity and cancer. Recently, TLR has even been found to be involved in metastasis. Thus, versican, a proteoglycan of the cellular matrix, activates both secretion of TNF α by myeloid cells and formation of TLR2/TLR6 complexes that strongly stimulate Lewis lung carcinoma metastatic growth [38]. Moreover, TLR deregulation seems to be the origin of other pathologies such as allergy, a disease characterized by the activation of the adaptive immune response against innocuous non-self antigens [6, 41]. Signalling by TLRs is even involved in aging [42]. Thus, recent information suggests that TLRs may have an important function in the development, progression and resolution of major common pathologies (Table 2).

Inflammatory TLR signals might be distinguished from homeostatic TLR signals by their amplitude and qualitative nature, by cell type-specific responses, by the cellular location of PAMP/TLR interactions, or by other extracellular signals that change the cellular understanding of such signals. Among these general mechanisms, perhaps most attention has been focused on proteins that regulate the intracellular strength, duration, and/or character of PAMP-triggered signalling.

DRUG DESIGN TARGETING TLRs

Although regulation by TLRs is implicated in the pathogenesis of a large number of diseases, its use as a novel therapeutic strategy is very multifaceted. Increasing numbers of novel immunotherapeutic approaches have been developed based on both activation and inhibition of TLR triggering.

Since the finding of human TLRs, the pharmaceutical industry has been intensively involved in the development of a set of tools to control the activity of these receptors, the major targets being the development of vaccine adjuvants and a search for new immunotherapies [68, 94, 99-103]. Clinical trials are being developed for treating infectious diseases, allergic diseases and asthma, and for using TLRs as vaccine adjuvants.

The use of TLR agonists as vaccine adjuvants is the area providing the most advanced clinical data. Vaccines are defined as substances that trigger the host immune system promoting adaptive immune responses of sufficient magnitude and duration directed at preventing different pathologies. There are two components in

Table 2. Studies Implicating Mammalian Toll-Like Receptors with Diseases

	Disease	Toll-Like Receptor Targets	References
Infection-Induced Inflammation	Septic Shock	TLR1, 2, 4	[43-49]
	Lethal Encephalitis	TLR3	[50]
	Malaria	TLR9	[51]
	Periodontitis	TLR4	[52]
	Candidiasis	TLR2	[53]
	Ocular Inflammatory Disease	TLR4	[54]
	Respiratory Syncytial Virus (RSV)	TLR3	[55]
	Pyelonephritis	TLR4, 11	[56]
	Hepatitis B	TLR3, 4, 5, 7, 9	[40]
	Hepatitis C	TLR2, 3, 4, 6, 7	[40]
Chronic Inflammation	Asthma	TLR2, 4, 6, 9, 10	[57-63]
	Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)	TLR2, 3, 4	[55, 64]
Autoimmune Diseases	Multiple Sclerosis	TLR2, 3, 4, 9	[9, 55, 65-67]
	Systemic Lupus Erythematosus (SLE)	TLR3, 5, 7, 9	[55, 68-71]
	Type I Diabetes	TLR1, 2, 3, 7, 9	[9, 55, 68, 72, 73]
	Autoimmune Myocarditis	TLR2, 3, 4, 8, 9	[9, 68, 74]
	Atherosclerosis	TLR2, 4	[9, 75,76]
	Autoimmune Hepatitis	TLR3, 9	[9, 40, 55, 77]
	Hashimoto's Autoimmune Thyroiditis	TLR3	[55, 78]
	Psoriasis	TLR7, 9	[55, 79, 80]
	Inflammatory Bowel Disease	TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9	[55, 68, 81-86]
	Rheumatoid Arthritis	TLR2, 3, 4	[9, 68, 87, 88]
	Kidney Disease	TLR2, 3, 4, 7, 9	[9, 68, 89-91]
Others	Cancer and Metastasis	TLR1, 2, 4, 5, 7, 9, 10	[7, 35, 38, 40, 68, 92, 93, 94]
	Allergy	TLR2, 4, 7, 8, 9	[68, 95-97]
	Aging	TLR1, 2, 9	[9, 42, 98]

vaccine formulation, the antigen and the adjuvant, the latter critical to initiating an (antigen-specific) adaptive immune response.

TLR agonists have been used for therapeutic purposes without their mechanism of action having been identified. While TLRs have just been discovered, their ligands have been identified as adjuvant components for a long time. The most evident paradigm is in the use of vaccines containing live attenuated or inactivated microorganisms, which generate competent immunogenicity by stimulation of innate immune responses via signalling by TLRs and successive activation of the adaptive immune response. Another example is imiquimod, used topically to treat genital warts and basal cell carcinoma, that ultimately has been identified as an agonist for TLR7 [103].

Moreover, ordinary adjuvants may fulfil two different activities for inducing an efficient adaptive immune response with soluble antigens. One is a depot activity, which serves to concentrate the antigen to release it into the draining lymph node, and as a result, triggers adaptive immunity. The other action is the establishment of

the innate immune response with the appropriate TLR leading to the activation of antigen-presenting cells [6]. Both properties contribute to transfer immunogenicity. Currently, alum (aluminium hydroxide gel) is the only adjuvant approved for use in human vaccines. Alum has the depot activity but holds a minimal quantity of TLRs.

We now know that TLR agonists act as effective adjuvants, signalling the initiation of efficient adaptive immune responses and promoting the development of both humoral and cellular responses, including cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses [104, 105].

Some TLR (TLR2, 3, 4, 5 and 9) agonists are currently in the early or late phases of being tested and several have demonstrated excellent safety and efficacy profiles [103]. Compared to alum, this new generation of adjuvants appears superior including their capacity to induce CTL responses. The most advanced studies for their application as adjuvants come from an agonist of TLR9, which is in Phase III for the hepatitis B virus infection [106].

Another use of TLRs agonists is for treatment of infectious diseases, autoimmune diseases, allergy and asthma [100, 101, 103].

Although most of the molecules under development are agonists, also TLR antagonists are being investigated for the treatment of several diseases such as sepsis, RA, SLE and multiple sclerosis where a TLR overexpression has been described. Thus, pharmaceutical industry is extending the use of TLR antagonists for treatment of these diseases, the most advanced (Phase III) being as an antagonist for the treatment of sepsis [103].

HOST NEGATIVE REGULATORS OF TLR SIGNALLING

Although strong pro-inflammatory and antiviral responses after TLRs stimulation may be beneficial, TLR signalling needs to be fine-tuned to achieve an effective response against dangerous exogenous and endogenous factors, limiting a pathological reaction and restoring the immune balance.

Therefore, several mechanisms have evolved which negatively regulate TLR-induced cellular responses at multiple levels of the signalling cascade. Targeting such genes and/or proteins may be of interest for therapeutic use to prevent or treat TLR mediated pathogenesis [79].

These mechanisms act at different levels: as extracellular regulators (soluble TLR2 and TLR4), as transmembrane protein regulators (RP105, ST2L, RP105, SIGGIR, TRAILR), as negative regulators of adapter molecules (soluble MyD88, SARM, SOCS1, Fliih), as factors affecting effector proteins (IRAK-M, IRAK2 (c,d), TRAF4, TOLLIP, A20, β -arrestins 1 and 2, LIND, FLN29, CYLD, SHIP-2) and finally as molecules affecting transcription factors (Pin-2, PI3K, ATF-3, Bcl3) (Table 3) [107].

Mechanisms to achieve a reduction in TLR signalling include decreasing TLR transcription, proteolytic degradation of TLR4, TLR 9 and TIRAP after marking for degradation by the E3 ubiquitin ligase Triad3A or a suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1), expression of inhibitory TIR-domain-containing receptors such as ST2 and SIGIRR or LRR-domain-containing receptors such as RP105, and expression of non-functional signalling molecules such as MyD88s, IRAK-M, IRAK2c and IRAK2d (Table 3) [115, 117].

Future challenges must include more profound studies of these negative regulators; because it has been recently reported the essential role of SIGIRR in the regulation of Th2 response *in vivo* through its impact on IL-33-ST2-mediated signalling [112].

Since many aspects the biology of TLRs and signalling pathways have been summarized in excellent reviews [32, 134, 135], this article will focus on current knowledge of the role of endogenous host peptides in regulating the function of TLRs.

ENDOGENOUS REGULATORS OF TLR SIGNALLING

Defence against pathogens involves many of the components that comprise local, systemic and neuroendocrine systems. The TLRs are the best-studied group of receptors responsible for initiating inflammatory cytokine production, antimicrobial peptides and other factors initiating changes in tissue physiology leading to microbial clearance. This local response also activates a systemic response in most cases. Inflammatory cytokines produced by macrophages, mainly IL-1, IL-6 and TNF α , activate the acute phase response in the liver that induces multiple metabolic and neuroendocrine changes in the body. Thus, local, systemic and neuroendocrine systems must be tightly coordinated in order to maintain homeostasis during the defence response. The interdependence of these players is illustrated by the neuroendocrine effects of inflammatory cytokines, by the presence of receptors for hormones and neuropeptides in cells of the immune system and by the presence of TLRs in neurons, glial cells and neuroendocrine cells. For example, TLR1-4 and 6 have been detected in pituitary cells, where LPS stimulation induces the expression of pro-opiomelanocortin [136],

TLR2 and TLR4 are expressed in the adrenal gland [137, 138] and several TLRs are functional in entero-endocrine cells [139]. The functional significance of these findings is illustrated by the adrenal insufficiency frequently associated with sepsis that often terminates in a fatal outcome, establishing the importance of the control of the HPA axis by TLRs. On the other hand, local TLR expression and its regulation by neuroendocrine factors are responsible for the particular characteristic of the innate and adaptive immune responses in different locations. Pro-inflammatory responses in the skin, tolerogenic responses in the intestine and anti-inflammatory responses in the eye are determined mainly by their neuroendocrine environments.

Positive and Negative Regulation by Neuroendocrine Mediators

Control of TLR activity may be achieved mainly by controlling the number of receptors (regulating their transcription and degradation) or interfering with their signalling pathways [115].

Neuroendocrine mediators have been shown to play an important role in modulating both aspects of TLR regulation contributing to the endogenous control of homeostasis among the different players implicated in defence mechanisms. Neuroendocrine regulation may occur through local, regional and systemic routes [140]. The local component is represented by the peripheral nervous system that releases sensory neuropeptides such as substance P, corticotrophin released hormone (CRH), calcitonin gene-related peptide (CGRP) or endogenous opioids. Sympathetic and parasympathetic innervations deliver both neurotransmitters such as adrenaline and acetyl-choline, and neuropeptides such as neuropeptide Y or vasoactive intestinal peptide (VIP) and represent the regional component. Neuroendocrine responses also control inflammation at a systemic level by the hypothalamic pituitary adrenal (HPA) axis through the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. Other neuropeptides implicated are cholecystokinin (CCK), somatostatin, melanocyte-stimulating hormone (MSH) or gastrin.

The extraneural source of these mediators must be also considered, since cells of the immune system have been shown to synthesize neuropeptides such as VIP, somatostatin or substance P. While sensory neuropeptides have generally been considered pro-inflammatory, most of the cited factors are considered anti-inflammatory. However, although extensive literature deals with the neural regulation of inflammation, some debate exists about its biological significance. The pro- or anti-inflammatory properties of different factors have been determined by their effects on the production of cytokines, chemokines or nitric oxide after stimulation with the TLR4 ligand LPS, but fewer studies have been performed on the effects on TLRs and its signalling mechanisms. However, signalling mechanisms of neuropeptides and TLRs show several points of interaction.

Mechanisms of Negative Regulation

The best known signalling pathway activated by TLRs is associated with the MyD88 adapter. Key points in this pathway are TRAF6 activation by ubiquitination, IKK phosphorylation and activation of NF- κ B and MAPK. Actually, many genes induced by TLR activation are controlled by both NF- κ B and AP-1.

Neuropeptides exert their effects mostly through binding and activating G-protein coupled receptors (GPCR) followed by, depending on the class of G-protein involved, PKA, PLC, PKC, PI3K or Akt activation. cAMP-PKA has been described as the major intracellular signalling pathway involved in most of the effects exerted by anti-inflammatory neuropeptides such as VIP and MSH [141]. cAMP up-regulates the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 via PKA-mediated phosphorylation of CREB and subsequent formation of the transcription machinery complex at the IL-10 promoter cAMP responsive element (CRE) site [142]. However, CREB phosphorylation is mediated by both PKA and ERK [143] and, as we mention below, different pathways

Table 3. Host Negative Regulators of TLR Signalling

	Regulator	Affected TLR	Possible Mechanism	References
Extracellular Regulators	Soluble TLR2	TLR2	- CD14 Binding - TLR2 Antagonist	[108]
	Soluble TLR4	TLR4	- Blocks Interaction of TLR4 and MD2	[109]
Transmembrane Protein Regulators	ST2	TLR2, 4, 9	- Sequesters MyD88 and TIRAP	[110]
	SIGIRR	TLR4, 9	- Interact with TRAF6 and IRAK. - Regulates Th2 Response	[111, 112]
	RP105	TLR4	- RP105/MD1 Interacts with TLR4/MD2 and Sequestering LPS- Binding Sites	[113]
	TRAILR	TLR2, 3, 4	- Stabilizes IKB α	[114]
	TRIAD3A	TLR4, 9	- Ubiquitinates TLRs	[115]
Regulator of Adapter Molecules	MyD88 short	TLR4	- MyD88 Antagonist	[116, 117]
	SARM	TLR3, 4	- Interacts with TRIP Inhibiting its Signalling.	[14, 118]
	SOCS1	TLR2, 4	- Suppresses IRAK - Induces TIRAP Polyubiquitination	[118]
	Fliih	TLR4	- Blocks the Interaction of TLR4 and MyD88	[119]
Factors Affecting Effector Proteins	IRAKM	TLR4, 9	- Inhibits Phosphorylation IRAK1	[21]
	IRAK2 (2c, 2d)	TLR4	- Its Overexpression Inhibits NFkB Activation.	[120]
	TRAF4	TLR2, 3, 4, 9	- Interacts with TRAF6, TRIF and IRAK1	[121]
	Tollip	TLR2, 4	- Autophosphorylates IRAK1	[122]
	A20	TLR2, 3, 4	- Deubiquitination TRAF6	[123]
	β -Arrestins 1, 2	TLR4	- Inhibits Autopolyubiquitination TRAF6 and Stabilizes IKB α .	[124]
	LIND/ABIN-3	TLR4	- Inhibits Activation of NFkB without Affecting IKK β	[125]
	FLN29	TLR4	- Interacts with TRAF6	[126]
	CYLD	TLR2	- Inhibits Activation of TRAF6 and TRAF7	[127]
	SHP-2	TLR3, 4	- Suppresses TBK1 Phosphorylation	[128]
Molecules Affecting Transcription Factors	Pin-1	TLR3, 4	- Interacts with pIRF3 in Ser339 Inducing its Degradation	[129, 130]
	PI3K	TLR2, 4, 9	- Suppresses p38, JNK, ERK1/ERK2 and NFkB	[131]
	ATF3	TLR4	- Binds to Sites of Histones Acetilation, Inhibiting Binding of NFkB	[132]
	Bcl3	TLR4	- Blockade of NFkBp50 Ubiquitination	[115, 133]

are implicated in the signalling by a single receptor. cAMP inhibits NF- κ B nuclear translocation and interference with TLR signalling has been described for the anti-inflammatory action of arginine vasopressin in such a way that PKA activates protein phosphatase 2A (PP2A), which dephosphorylates NF- κ B and prevents its nuclear translocation [144] Fig. (2). The mechanism of the TLRs' suppression signal of the anti-inflammatory neuropeptide CGRP, however, is not dependent on the blocking of the NF- κ B or MAPK pathways but on the up-regulation of the transcriptional repressor, inducible cAMP early repressor (ICER), which binds to a composite CRE/KB element in certain promoters [145]. On the other

hand, PKA activation has been shown to inhibit ERK and p38 activation, interfering with the MAPK signalling pathway initiated by TLRs, a mechanism that has been found in the anti-inflammatory properties of MSH [146].

Other anti-inflammatory mechanisms initiated by GPCR by neuropeptides are cAMP-independent and compromise signalling pathways initiated by arrestins that compete with the TLRs signalling Fig. (2). Following activation, GPCRs are phosphorylated by G protein-coupled receptor kinases (GRKs) initiating the termination of this signalling response. β -arrestins (ARRBs) then

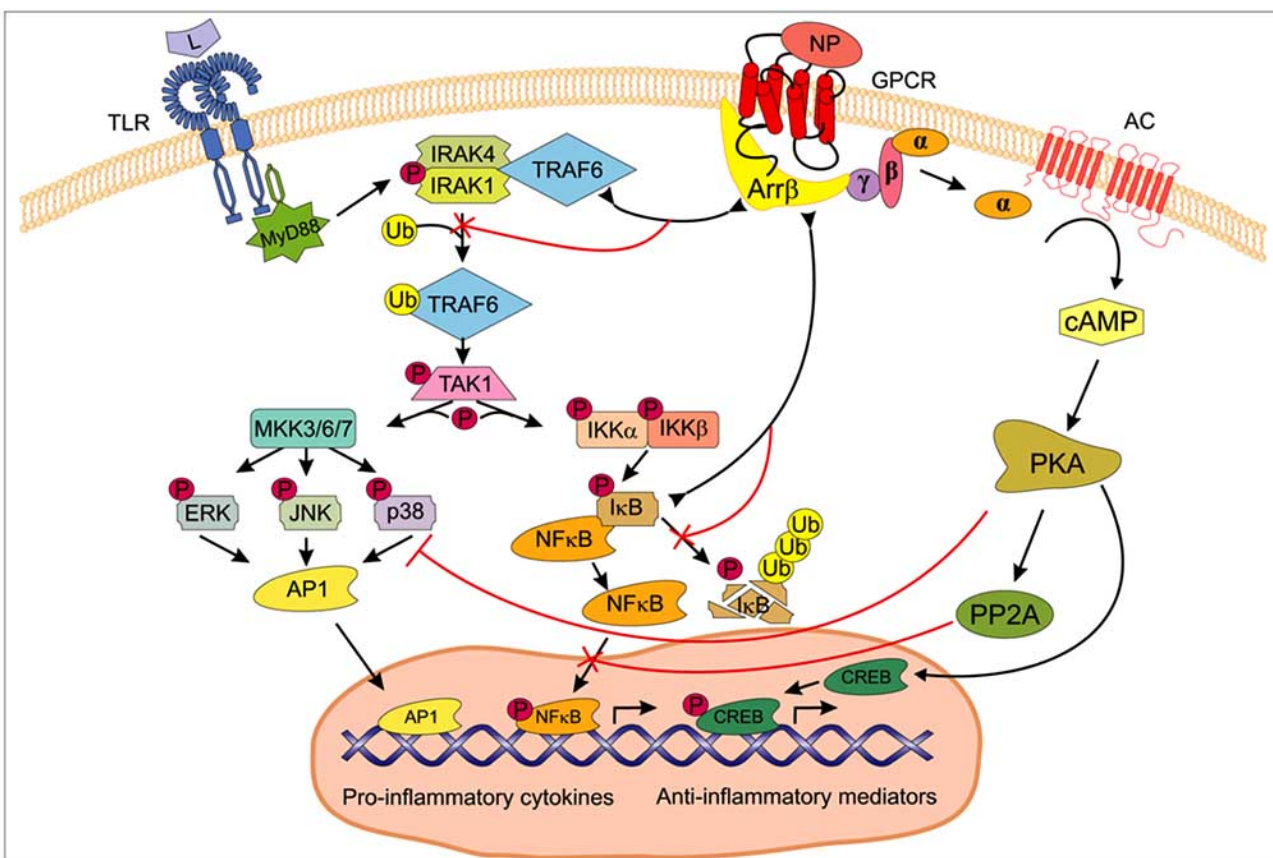


Fig. (2). Neuropeptides (NP) are negative regulators of TLR signalling by both, cAMP-dependent and independent mechanisms. PKA-dependent CREB phosphorylation induces the synthesis of anti-inflammatory mediators and inhibits MAPK activation and NF-κB nuclear translocation (red lines). cAMP independent signalling is mediated by arrestin (Arrβ) association with TRAF6 and IKK (lines with double inverted arrows) that inhibit ubiquitination and degradation respectively (red lines). For abbreviations and explanation see text.

bind the phosphorylated receptor, which blocks further G protein-initiated signalling through a steric mechanism.

GPCR may be classified into two groups according to their affinity for ARRBs. In the case of Class A receptors, ARRBs dissociate from the receptor prior to internalization, while Class B receptors remain associated and are internalized and degraded [147]. ARRBs also undergo ubiquitination upon activation of seven transmembrane receptors (7TMRs). Although originally discovered to function as a protein label for destruction by the cellular proteasomal machinery, ubiquitin modification is now appreciated for mediating novel outcomes including protein trafficking and signal transduction [148]. Class B 7TMRs result in sustained ARRB ubiquitination, serving as scaffolds for numerous signalling networks and, in particular, those of the MAPKs. As we have already shown in Table 3, β-arrestin 2 negatively modulates TLR signalling. ARRBs interact with both IKK and IκB inhibiting the phosphorylation and degradation of IκB and preventing the nuclear translocation of NF-κB [149, 150] Fig. (2).

TRAF6 has also been shown to interact with ARRB2, preventing its auto-ubiquitination and the activation of IKK [151]. On the other hand, ARRBs also activate the MAPK signalling but this route targets the cytoplasm, inhibiting MAPK-mediated transcription events. In this way ARRBs interfere with the MAPK signalling activated by TLR. Since GPCR binds ARRBs, neuroendocrine factors are likely to mediate their effects on TLR signalling by the above cited mechanisms. This has been corroborated for the anti-inflammatory activity of β-adrenergic receptors. Norepinephrine enhances ARRB2-IκB interactions and promotes IκB stabilization, preventing NF-κB activation and inhibiting the

production of pro-inflammatory cytokines after TLR engagement [150] Fig. (2). Other neuropeptides also interfere with upstream elements of the TLRs' signalling pathway. In macrophages stimulated with LPS in the presence of α-MSH, the inhibitory molecule IRAK-M binds to IRAK1, the proximal intracellular signal molecule of endotoxin-bound TLR4 [152].

Another aspect that may be considered in the regulation of TLR by neuroendocrine factors is the expression of the receptors themselves. Transcription factors PU.1 and AP-1 have been identified in the promoter of TLR2 and TLR4 and their nuclear translocation is necessary to up-regulate their expression. Pro-inflammatory neuropeptides, such as CRH, have been shown to mediate a higher sensibility of macrophages to bacterial products by up-regulating the transcription of TLRs through the nuclear translocation of PU.1 [153], while anti-inflammatory neuropeptides such as VIP have the opposite effect (see next section).

VIP: A NEW THERAPEUTIC TOOL TARGETING TLR

VIP is a 28 [amino acid] peptide belonging to the PACAP/glucagon/secretin family, isolated in 1970 from pig intestinal extracts [154]. VIP is an important signal molecule of the neuroendocrine-immune network. It is produced by neurons in different areas of the central and peripheral nervous system and by endocrine cells such as the pituitary lactotrope and cells of the endocrine pancreas [155]. In the immune system, two sources for VIP have been described, the nerve terminals, and the inflammatory and immune cells: such as mast cells, neutrophils, eosinophils and, interestingly, lymphocytes [156-162]. Therefore, it could be regarded as a "neuroimmunopeptide". In addition, VIP is secreted

by lymphocytes into the lymphoid microenvironment after stimulation with agents that induce antigenic stimulation, inflammation and apoptosis [163]. The immunological effects of VIP are exerted through binding to members of family 2 of G-protein-coupled receptors, VIP receptor types 1 and 2 (VPAC1 and VPAC2, respectively) and PACAP receptor 1 (PAC1) [164]. VIP elicits a broad spectrum of functions on innate and adaptive immunity, with an important role in blocking the inflammatory response and polarizing the T-lymphocyte response to a Th2 phenotype [165-167]. Thus, it has emerged as a potential candidate for the treatment of inflammatory and autoimmune disorders and has been shown to be effective in the prevention of symptoms associated with animal models of acute and chronic immune diseases, such as septic shock, collagen-induced arthritis (CIA), trinitrobenzene sulfonate (TNBS)-induced colitis, experimental autoimmune encephalomyelitis, type 1 diabetes in NOD mice, experimental uveoretinitis and Sjogren's syndrome [165, 168-174].

Current efforts are being directed towards using VIP to modulate TLR receptors, controlling the inflammatory process and restoring homeostasis in established inflammatory/autoimmune diseases in animal models, and in human systems. Advances in the understanding of each of these applications are discussed here.

LESSONS LEARNED FROM ANIMAL MODELS

Experimental disease and *in vitro* animal models have generated a large extent of current knowledge of the control of TLR deregulation by VIP and have been necessary to explore the mechanisms involved in depth.

The Murine Model of Crohn's Disease

In healthy hosts, TLRs confer different immune mechanisms for the protection of intestinal integrity. However, a deregulation of TLR expression and the subsequent overproduction of pro-inflammatory agents [175], as well as the generation of Th1 response induced by TLR signalling, are factors that contribute to the pathogenesis of Crohn's disease (CD) [176]. CD is a chronic incurable disease of the bowel characterized by transmural inflammation resulting in abdominal pain, diarrhea and weight loss. Chronic intestinal inflammation induced by intrarectal administration of trinitrobenzene sulfonic acid resembles many of the clinical characteristics of CD in humans [177] and is also associated with a Th1 response [178]. In previous studies, we demonstrated the capacity of VIP to reduce the clinical and histopathological severity, as well as to down-regulate both inflammatory factors and Th1-derived cytokines [169].

Initial data of TLR regulation by VIP were obtained in this model [179]. The constitutive expression of TLR2 and TLR4 *in vivo*, as well as their inflammation-induced up-regulation at both protein and mRNA levels, were demonstrated in the local microenvironment of the colon with the involvement of epithelial and mononuclear cells. Treatment with VIP reduced the over-expression of TLR2 and TLR4, reducing both to near steady-state levels. The beneficial role of VIP in TNBS-induced colitis was also corroborated at the systemic level in specific types of immune cells from mesenteric lymph nodes (MLNs) that are essential for their traffic from/to the inflamed colon.

VIP restored the TNBS-induced expression of TLR2 and TLR4 on dendritic cells, macrophages, and T CD4⁺, T CD8⁺ and B CD19⁺ cells at the constitutive homeostatic levels [179-181], suggesting that the expression of TLR must be tightly controlled to the development of normal immune responses.

A binding site for NF- κ B in the murine TLR2 has been described [182]. Thus, the VIP mediated down-regulation of TLR2 could be due to a direct effect of VIP on TLR2 expression, since it prevents NF- κ B nuclear translocation and inhibits the transcription of several inflammatory factors [183-184].

The functional relevance of the regulation of TLR2 and TLR4 by VIP has been explored in lymph node cells in response to TLR2 ligand, Pam3Cys and TLR4 ligand, LPS [185].

Stimulation of TLR2 and TLR4 mediates a cascade that leads to the induction of pro-inflammatory factors, including the chemokines that are largely responsible for the recruitment of leukocytes, for example CXCL1, which causes a massive infiltration of neutrophils contributing to the pathogenesis of CD [186]. Both TLR ligands strongly increased the production of the chemokine CXCL1 in MLN cultures from TNBS-treated animals compared with control animals. However, the levels of CXCL1 were significantly reduced in mice treated with VIP, demonstrating its anti-inflammatory effect through TLR modulation.

It has long been documented that interaction with TLR ligands leads to dendritic cell maturation producing innate cytokines, such as IL-12, which instruct Th1 responses with the IFN γ production as the main Th1-type cytokine [176, 187].

Mesenteric lymph node cell cultures from animals treated with TNBS showed increased levels of IL-12p70 after stimulation with Pam3Cys or LPS compared with untreated animals. *In vivo* VIP treatment reduced these values to approaching control levels [185]. In response to TLR2 ligand, activated cells produce high IFN γ levels, strongly increased in TNBS-induced colitis. In contrast, cells from TNBS/VIP-treated mice produced lower levels of this cytokine. However, LPS has little effect on IFN γ production, in agreement with several studies [188].

In health, regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells have a vital role in immune tolerance and the modulation of established immune responses. The expression of both TLRs has been described in them [189-191]. In this model, VIP also contributes to maintaining homeostasis by restoring TNBS-altered numbers of TLR2 and 4 positive CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes which control effector T cells. TLR expression in CD4⁺CD25⁺ cells was significantly increased after TNBS-induced colitis, whereas VIP treatment prevented this increase.

Overall, these findings show a functional regulation of innate and adaptive immune responses by VIP after specific stimulation of TLR2 and 4.

Primary Culturing of Myenteric Neurons from Rat Small Intestine

The effect of LPS on myenteric neurons line of the muscular coat of the small intestine was demonstrated in an *in vitro* model of myenteric neuron cultures, in order to uncover its involvement in the inflammatory process [192].

Addition of LPS to cultures from rat small intestine decreased neuronal survival in a concentration-dependent manner, indicating the expression of TLR4 in myenteric neurons. The simultaneous presence of VIP resulted in neuronal survival similar to that of a control with medium alone. LPS-induced neuronal cell death has been previously described in several studies and VIP has been put forward as a neuroprotective neurotransmitter in the enteric system [193, 194] as well as in the central nervous system [195].

The presence of LPS during culturing increased the proportion of VIP⁺/TLR4⁺ immunoreactive neurons, while the proportion of VIP⁺/TLR4⁺ immunoreactive neurons decreased [192]. In this context, a beneficial up-regulation of VIP expression has been identified in several injurious processes, including intestinal inflammation and LPS treatment [196, 197].

These findings suggest that neuronal degeneration mediated by TLR4 could play a significant role in the development of gastrointestinal dysmotility and deregulation in bowel inflammation, underlying a neuroprotective effect of VIP.

An *In Vitro* Model with Peritoneal Macrophages and RAW 264.7 Cell Line and *In Vivo* LPS-Induced Septic Shock

As discussed in detail above, the modulation of TLR4 expression is critical for the magnitude of the inflammatory response and the disease outcome. The direct effect of VIP on TLR4 expression has been explored in naïve macrophages and murine macrophage cell line RAW 264.7, studying the signalling mechanism involved in depth [198]. VIP suppressed the expression of TLR4 in primary murine macrophages and the RAW 264.7 cell line, both at the mRNA and protein levels. The effect of VIP occurred at the transcriptional level as corroborated by studies with a construct of the proximal promoter of mouse TLR4 linked to the luciferase gene [198]. The mouse TLR4 promoter is primarily controlled by transcription factors PU.1 and AP-1 [199]. Disruption of the proximal PU.1 site totally abrogated the effect of VIP on TLR4 promoter. However, mutation of the AP-1-binding site of the TLR4 promoter did not affect VIP-induced suppression, providing evidence that the suppressive effect of VIP on TLR4 promoter is mediated through PU.1. Indeed, the PU.1 DNA-binding activity was measured in nuclear lysates of RAW 264.7 macrophages, demonstrating that VIP decreased PU.1 DNA-binding activity on the proximal PU.1 DNA-binding site of the TLR4 promoter [198]. IRAK-M and the PI3K/Akt pathway have been described as negative regulators of TLR4 signalling [21, 107, 200]. By using primary murine peritoneal macrophages from IRAK-M^{-/-}, Akt1^{-/-} mice it was made clear that the effect of VIP on TLR4 expression is mediated via the PI3K/Akt1 pathway, but not through IRAK-M. This study reports the first evidence for the involvement of Akt1 isoform in VIP signalling [198].

Down-regulation of TLR4 expression has been identified as a mechanism that contributes to endotoxin tolerance [201]. On the other hand, LPS induces several negative regulators of signalling, such as IRAK-M, SIGIRR and SOCS1, as well as the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGFβ that limit pro-inflammatory cytokine production and together contribute to the phenomenon of LPS tolerance [revised in 135]. We have demonstrated that LPS also induces the secretion of VIP in lymphoid organs and VIP controls LPS-induced inflammation [163, 165]. The above data indicate that VIP suppresses TLR4 expression but further studies were performed to explain whether VIP promotes endotoxin tolerance. LPS tolerance is an adaptive mechanism of the innate immune system which controls the magnitude of exposure to LPS and protects the body against septic shock [202]. RAW264.7, pre-treated with VIP before LPS stimulation, showed a significant decrease in the production of TNFα and IL-6 indicating that VIP regulates endotoxin sensitivity. These results were confirmed *in vivo* in a murine model of endotoxic shock [198]. Thus, pre-treatment of mice with VIP prior to LPS challenge resulted in reduced pro-inflammatory cytokine production, supporting the finding that VIP promotes endotoxin tolerance *in vivo*. These findings put forward VIP as a negative regulator peptide of TLR signalling that could account for LPS tolerance as a regulatory strategy to control TLR-induced inflammation, although further studies are necessary to clarify the molecular mechanisms of this action, such as possible epigenetic modifications.

Table 4 summarizes the VIP effects on TLRs modulation in the animal models described above.

On the other hand, it has been investigated the effect of TLRs on VIP in a recently published report which connects the system of VIP/VIP receptors to the TLR-mediated immune response, researching the regulation of VPAC2 expression by TLR ligands [203]. In this study, different ligands of TLR4, TLR2, TLR2/6 and TLR7 selectively up-regulated the VPAC2 receptor gene in peritoneal macrophages and the RAW 264.7 murine cell line. In addition, VPAC2 mRNA was tightly repressed by elements downstream of MEK1/2, PI3K/Akt and, especially, JNK signalling pathways.

These results could suggest a mechanism to ensure the modulator effects of VIP to avoid host damage by an overproduction of pro-inflammatory mediators, while at the same time a down-regulation of TLRs occurs.

EXTENDING THE USE OF VIP TO THE HUMAN SYSTEM: A THERAPEUTIC APPROACH.

New insights into the therapeutic action recently identified for VIP relate to their beneficial effects in regulating TLR expression and function in human diseases.

Initial evidence came from studies into rheumatoid arthritis (RA) with fibroblast-like synoviocytes (FLS) [204].

Rheumatoid Arthritis

Rheumatoid arthritis is characterized by a chronic inflammatory process, based primarily in the synovial membrane, as a result of an accumulation of macrophage-like and fibroblast-like synoviocytes and infiltration by T and B cells, plasma cells and dendritic cells. It is typically associated with serological evidence of systemic autoimmunity. TLR ligands of microbial origin and double-stranded DNA, or endogenous ligands, such as heat shock proteins, fibrinogen and hyaluronan or necrotic cell components, have been implicated in the pathogenesis of autoimmune inflammatory diseases, including arthritis [205]. The expression and function of TLRs in inflamed joints in both tissues and cells of patients has been well documented, with RA [206-208] contributing to the induction of the synthesis of a large variety of pro-inflammatory mediators, such as cytokines, chemokines, metalloproteinases and adhesion molecules. In addition, synovial tissues from RA patients showed a higher expression of TLR2 and TLR4 compared with patients with osteoarthritis (OA), frequently used as controls, or with healthy individuals [206].

Resident FLS express members of the TLR family [209] which function in the front line of host defence. FLS are capable of secreting pro-inflammatory factors, including chemokines and they represent important players in synovitis initiation and propagation, favouring inflammatory-cell retention and the perpetuation of immune pathology in RA [210].

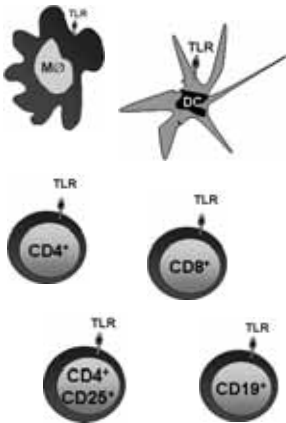

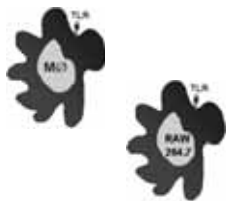

In recent years, VIP has emerged as a therapeutic peptide reducing the incidence and severity of arthritis in an experimental model through the regulation of both inflammatory and auto-immune components of the disease [168]. The anti-inflammatory effects of VIP were confirmed in human RA, down-regulating the LPS-induced cytokines and chemokines production [211].

Modulation of TLRs by VIP has been recently explored in FLS human RA [204] (Table 5). We have demonstrated the expression of TLR2, MyD88 and TLR4 mRNA in cultured FLS from RA patients. TLR4 mRNA and protein were increased in FLS from RA compared with OA-FLS. LPS and TNFα were able to increase TLR4 and MyD88 expression in RA-FLS. VIP treatment resulted in a decrease of LPS and TNFα-induced TLR4 and MyD88 mRNA expression. VIP directly interferes with TNFα and TLR4 signalling in FLS since it blocks downstream responses, such as the expression of CCL2 and CXCL8 chemokines. These results validate the role of VIP as an important regulator of TLR expression to stop deregulated inflammation in humans.

In order to determine how VIP interferes with TLR signalling pathways, recent investigations have focused on gene expression profiling of the molecules involved in LPS-mediated TLR4-signalling as well as on the effect of VIP treatment.

Data in human RA-FLS demonstrated the LPS-induced increase of expression of molecules involved in the TLR4 signalling pathway, such as adapters and TLR interacting proteins, effectors and downstream pathways, and their modulation after VIP treatment [212]. VIP was able to down-regulate the LPS-induced

Table 4. Effects of VIP on TLR Modulation in Animal Models

Animal Model	Tissue and Cellular Type	TLR	VIP Effects on TLR Expression and Function	Ref.
TNBS-Induced Colitis	Colon Extracts		↓ Protein and mRNA Expression	[179]
	Mesenteric Lymph Nodes 	TLR2 and TLR4	↓ mRNA Expression ↓ Surface Expression ↓ CXCL1 Production Induced by TLR Ligands ↓ IL-12p70 Production Induced by TLR Ligands ↓ IFN γ Production Induced by TLR2 Ligand	[179-181] [185]
Primary Culturing of Myenteric Neurons	Myenteric Neurons 	TLR4	↓ LPS-Induced Neurodegeneration	[192]
Cultures of Peritoneal Macrophages and RAW 264.7 Cell Line	 Akt1 ^{-/-} Macrophages 	TLR4	↓ mRNA Expression ↓ TLR4 Promoter Activity Through PU.1 ↓ DNA Binding of PU.1 Induces Endotoxin Tolerance Pretreatment ↓ TNF α and IL-6 Production Does not ↓ TLR4 Expression	[198]
LPS-Induced Septic Shock	Serum	TLR4	Induces Endotoxin Tolerance Pretreatment ↓ Serum IL-6 levels	[198]

M ϕ , macrophages; DC, dendritic cell; M ϕ Akt1^{-/-}, macrophages from Akt1^{-/-} mice; ↓, down-regulation

over-expression of both CD14 and MD2, co-receptors required for TLR4 signalling, as well as several adapter molecules such as Pellino 1, Pellino 2, SARM, TIRAP, TRIF and TRAM. In previous studies, we have demonstrated the VIP-mediated shedding of membrane-bound CD14 from LPS-stimulated macrophages these results confirming an important role for VIP in CD14 control [213]. In addition, VIP exerted a negative control of the MyD88-dependent pathway induced by LPS. Thus, VIP reduced the IRAK1-IRAK4-TRAF6 signalling complex at different levels. VIP inhibited the phosphorylation of IRAK1, decreased the expression of IRAK4 at mRNA level and TRAF6 at both protein and mRNA levels. Interestingly, LPS treatment did not affect RNA expression

of IRAK1. However, it increased protein levels of phosphorylated IRAK1, which were inhibited by VIP indicating an important step in this negative regulation. In the MyD88-dependent pathway, downstream molecules such as different kinases were also down-regulated by VIP. Regarding the MyD88-independent pathway, VIP was also able to reduce the LPS-induced expression of adapter molecules such as TRIF and TRAM, involved in the engagement of adaptive immunity. As described above, TBK1 is the main effector protein of the MyD88-independent pathway which is involved in IRF3 activation. VIP inhibited the LPS effect on TBK1 both at protein and mRNA levels. VIP treatment led to an impaired production of IL-6 and RANTES/CCL5 after LPS treatment,

indicating the functional relevance of VIP effect on mediators derived from MyD88-dependent and MyD88-independent pathways, respectively. Taken together, these results demonstrated that VIP acts as a negative modulator of TLR4 signalling, regulating the production of several pivotal molecules of the cascade (Table 5).

A recent report has pointed out the physiological relevance of endogenous VIP and the expression of their functional receptors in RA [214]. Interestingly, VIP expression was detected in human FLS at mRNA and protein levels, and it was significantly decreased in RA-FLS compared with OA-FLS, suggesting that endogenous VIP could protect from the inflammatory process while its down-regulation might contribute to the pathogenesis of RA. VIP receptor type 1 was the dominant adenylate cyclase-coupled receptor in OA-FLS. In contrast, in RA-FLS VPAC2 was the dominant receptor expressed. Since VPAC2 is induced by several inflammatory factors, these results could identify VPAC2 as the VIP receptor associated with chronic inflammatory processes that mediates the beneficial effects of exogenous VIP. In this context, it has been described a VPAC1 genetic polymorphism associated with reduced VPAC1 expression in RA-derived immune cells [215].

HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES AND HUMAN MONOCYTIC THP1 CELLS

VIP has been reported to decrease LPS-induced up-regulation of TLR2 and TLR4 by human monocytic THP1 cells and peripheral blood monocytes [216]. VIP also decreased monocytic differentiation to macrophages induced by LPS from *Escherichia coli* or *Porphyromonas gingivalis*. Human TLR4 is regulated by PU.1 and IRF [217, 218]. Similarly, human TLR2 is also regulated by PU.1 [219]. The mechanism for VIP down-regulation of TLRs has been tested in LPS-stimulated monocytic THP1 cells using confocal microscopy [216]. VIP inhibited nuclear translocation of the transcriptional regulator PU.1 and subsequent LPS-induced up-regulation of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) receptor, which is a known target regulated by PU.1 (Table 5). These results provided preliminary evidence of the VIP effect on PU.1 nuclear translocation to regulate TLR expression.

In conclusion, animal models, together with human studies, have added considerable information regarding VIP control of the

TLR-induced inflammatory/autoimmune response. There is reason for optimism that TLR signalling pathways will provide novel therapeutic targets for the treatment of deregulated immune conditions, so that this natural peptide may provide an effective treatment for many inflammatory/autoimmune diseases that must be regulated at multiple levels.


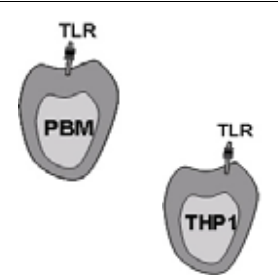
ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants PI080025, RETICS Program, RD08/0075 (RIER) from Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), within VI PNDE I+D+I 2008/2011 and by FEDER funds, a predoctoral fellowship from the Ministerio de Ciencia e Innovación (MC) and a postdoctoral contract from the Ministerio de Sanidad y Consumo (IG-C).

ABBREVIATIONS

AP-1	=	Activator protein-1
ARRBs	=	β -arrestins
cAMP	=	cyclic adenosine monophosphate
CCK	=	Cholecystokinin
CD	=	Crohn's disease
CGRP	=	Calcitonin gene-related peptide
CIA	=	collagen-induced arthritis
CRE	=	cAMP responsive element
CRH	=	Corticotrophin released hormone
CTL	=	Cytotoxic T lymphocyte
FLS	=	Fibroblast-like synoviocytes
GIPL	=	Glycoinositolphospholipid
GPCR	=	G-protein coupled receptors
GRK	=	G protein-coupled receptor kinase
HMGB1	=	High-mobility group box 1
IBD	=	Inflammatory bowel disease
ICER	=	Inducible cAMP early repressor
IFN	=	Interferon

Table 5. Effects of VIP on TLR Modulation in Human System

Human System	Tissue and Cellular Type	TLR	VIP Effects on TLR Expression and TLR Signalling	Ref.
Rheumatoid Arthritis		TLR4	<p>↓ LPS and TNFα-Induced mRNA and Protein Expression</p> <p>↓ LPS-Induced MyD88 mRNA Expression</p> <p>↓ LPS-Induced CXCL8 and CCL2 Production</p> <p>↓ LPS-Induced mRNA Expression of CD14, MD2, TRAM, TRIF, IRAK4, TAB2, TRAF6 and TBK1</p> <p>↓ LPS-INDUCED Protein Levels of TRAF6, TBK1 and pIRAK1</p> <p>↓ LPS-Induced IL-6 and RANTES/CCL5 Production</p>	[204, 212]
Peripheral Blood Monocytes and Monocytic THP1 Cells		TLR2 and TLR4	<p>↓ LPS-Induced mRNA Expression</p> <p>↓ Monocytic Differentiation to Macrophages</p> <p>↓ Nuclear Translocation of PU.1</p> <p>↓ LPS-Induced M-CSFR Surface Expression and M-CSF Production</p>	[216]

FLS, fibroblast-like synoviocytes; PBM, peripheral blood monocytes; THP1, monocytic THP1 cell line; pIRAK1, phosphorylated IRAK1; ↓, down-regulation

IL	=	Interleukin
IRAK	=	Receptor-associated kinase
IRF	=	Interferon regulatory factor
ISD	=	interferon (IFN) stimulatory DNA
LPS	=	Lipopolysaccharide
LRR	=	Leucine-rich repeats
LTA	=	Lipoteichoic acid
M-CSF	=	Macrophage colony-stimulating factor
Mal	=	MyD88 adapter-like protein
MAPK	=	Mitogen-activated protein kinase
MLN	=	Mesenteric lymph node
MSH	=	Melanocyte-stimulating hormone
MyD88	=	Myeloid differentiation primary response protein 88
NAK	=	NF- κ B-activating kinase
NEMO	=	NF- κ B essential modifier
NF- κ B	=	Nuclear factor κ B
NLRs	=	NOD-like receptors
NOD	=	Nucleotide binding oligomerization domain
NP	=	Neuropeptides
OA	=	Osteoarthritis
PAC1	=	PACAP receptor
PAMPs	=	Pathogen-associated molecular patterns
PGN	=	Peptidoglycan
PI3K	=	Phosphatidil inositol 3 kinase
PKA	=	Protein kinase A
PKC	=	Protein kinase C
PKD1	=	Protein kinase D1
PLC	=	Phospholipase C
PP2A	=	Protein phosphatase 2A
PRAT4A	=	Protein associated with TLR4 A
PRR	=	Pattern- recognition receptors
RA	=	Rheumatoid arthritis
RIG	=	Retinoic-acid inducible gene
RIP1	=	Receptor-interacting protein 1
RLH	=	Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like helicases
SARM	=	Sterile α and Heat-armorillo motifs
SIGIRR	=	Single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8
SLE	=	Systemic Lupus erythematosus
SOCS	=	Suppressor of cytokine signalling
TAB	=	TAK1-binding subunit
TAK1	=	TGF β -activated kinase 1
TANK	=	TRAF family member-associated NF- κ B activator
TGF β	=	Transforming growth factor β
Th1	=	T helper 1
Th2	=	T helper 2
TICAM	=	TIR-containing adapter molecule
TIR	=	Toll/IL-1 receptor
TIRAP	=	TIR-associated protein
TIRP	=	TIR domain-containing protein

TLR	=	Toll-like receptor
TMR	=	Transmembrane receptor
TNBS	=	Trinitrobenzene sulfonate
TNF	=	Tumour necrosis factor
TRAF6	=	TNF receptor associated factor 6
TRAM	=	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	=	TIR domain-containing adapter protein-inducing IFN β
VIP	=	Vasoactive intestinal peptide
VPAC1	=	VIP receptor type 1
VPAC2	=	VIP receptor type 2

REFERENCES

References 220-222 are related articles recently published.

- [1] Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-7.
- [2] Slack JL, Schooley K, Bonnett TP, Mitcham JL, Qvarnstrom EE, Sims JE, *et al.* Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 2000; 275: 4670-8.
- [3] Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self-DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006; 7: 49-56.
- [4] Kajita E, Nishiya T, Miwa S. The transmembrane domain directs TLR9 to intracellular compartments that contain TLR3. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343: 578-84.
- [5] Takaoka A, Taniguchi T. Cytosolic DNA recognition for triggering innate immune responses. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60: 847-57.
- [6] Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009; 227: 221-33.
- [7] Wolska A, Lech-Maranda E, Robak T. Toll-Like Receptors and their Role in Hematologic Malignancies. *Curr Mol Med* 2009; 9: 324-35.
- [8] Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke. *Neuroscience* 2009; 158: 1007-20.
- [9] Li M, Zhou Y, Feng G, Su SB. The critical role of toll-like receptor signaling pathways in the induction and progression of autoimmune diseases. *Curr Mol Med* 2009; 9: 365-74.
- [10] Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005; 204: 27-42.
- [11] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
- [12] Jenkins KA, Mansell A. TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Cytochrome* 2009; March 3; doi:10.1016/j.cyto.2009.01.009.
- [13] Kenny EF, O'Neill LAJ. Signalling adaptors used by Toll-like receptors: an update. *Cytokine* 2008; 43: 342-9.
- [14] Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006; 7: 1074-81.
- [15] Akashi-Takamura S, Miyake K. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 420-5.
- [16] Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007; 19: 24-32.
- [17] Noppert SJ, Fitzgerald KA, Hertzog PJ. The role of type I interferons in TLR responses. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 446-57.
- [18] Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann NY Acad Sci* 2008; 1143: 1-20.
- [19] Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, *et al.* Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 2008; 9: 684-91.
- [20] Wan Y, Xiao H, Affolter J, Kim TW, Bulek K, Chaudhuri S, *et al.* Interleukin-1 receptor-associated kinase 2 is critical for lipopolysaccharide-mediated post-transcriptional control. *J Biol Chem* 2009; 284: 10367-75.

- [21] Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA, Jr, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; 110: 191-202.
- [22] Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 758-65.
- [23] Napolitano G, Mirra S, Monfregola J, Lavorgna A, Leonardi A, Ursini MV. NESCA: a new NEMO/IKK γ and TRAF6 interacting protein. *J Cell Physiol* 2009; doi: 10.1002/jcp.21782.
- [24] O'Neill LA. When signaling pathways collide: positive and negative regulation of toll-like receptor signal transduction. *Immunity* 2008; 29: 12-20.
- [25] Park JE, Kim YI, Yi AK. Protein kinase D1 is essential for MyD88-dependent TLR signaling pathway. *J Immunol* 2009; 182: 6316-27.
- [26] Guiducci C, Ghirelli C, Marloie-Provost MA, Matray T, Coffman RL, Liu YJ, *et al.* PI3K is critical for the nuclear translocation of IRF-7 and type I IFN production by human plasmacytoid dendritic cells in response to TLR activation. *J Exp Med* 2008; 205: 315-22.
- [27] Kaisho T, Tanaka T. Turning NF- κ B and IRFs on and off in DC. *Trends Immunol* 2008; 29: 329-36.
- [28] Häcker H, Redecke V, Blagoev B, Kratchmarova I, Hsu LC, Wang GG, *et al.* Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 2006; 439: 204-7.
- [29] Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, *et al.* Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006; 439: 208-11.
- [30] Honda K, Taniguchi T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 644-58.
- [31] Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med* 2007; 39: 421-38.
- [32] Beutler B. Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol Rev* 2009; 227: 248-63.
- [33] Joffre O, Notle MA, Spörri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009; 227: 234-47.
- [34] Crozat K, Vivier E, Dalod M. Crosstalk between components of innate immune system: promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunol Rev* 2009; 227: 129-49.
- [35] Kluwe J, Mencin A, Schawabe RF. Toll-like receptors, wound healing and carcinogenesis. *J Mol Med* 2009; 87: 125-38.
- [36] Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate Immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 2006; 124: 823-35.
- [37] Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008; 454: 436-44.
- [38] Kim S, Takashi H, Lin WW, Descargues P, Grivennikov S, Kim Y, *et al.* Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 2009; 457: 102-7.
- [39] Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 2006; 25: 189-91.
- [40] Mencin A, Kluwe J, Schwabe RF. Toll-like receptors as targets in chronic liver disease. *Gut* 2009; 58: 704-20.
- [41] Goldman M. Translational mini-review series on toll-like receptors: toll-like receptors ligand as novel pharmaceuticals for allergic disorders. *Clin Exp Immunol* 2007; 147: 208-16.
- [42] Van Duin D, Mohanty S, Thomas V, Ginter S, Montgomery RR, Fikrig E, *et al.* Age associated defect in human TLR1/2 function. *J Immunol* 2007; 178: 970-5.
- [43] Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Fuel C, Due X, *et al.* Defective LPS signalling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-8.
- [44] Lorenz E, Mira JP, Frees KL, Schwartz DA. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med* 2002; 162: 1028-32.
- [45] Janssen S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 637-46.
- [46] Mukhopadhyay S, Herre J, Brown GD, Gordon S. The potential of Toll-Like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology* 2004; 112: 521-30.
- [47] Bowie AG. Translation mini-review series on toll-like receptors. Recent advances in understanding the role of toll-like receptors in anti-viral immunity. *Clin Exp Immunol* 2007; 147: 217-26.
- [48] Lawton JA, Ghosh P. Novel therapeutic strategies based on toll-like receptor signalling. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7: 446-51.
- [49] Saturnino SF, Andrade MV. Toll-like receptors, new horizons in sepsis. *Curr Mol Med* 2007; 7: 522-31.
- [50] Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat med* 2004; 10: 1366-73.
- [51] Coban C, Ishii KJ, Kawai T, Hemmi H, Sato S, Uematsu S, *et al.* Toll-receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 2005; 201: 19-25.
- [52] Fukusaki T, Ohara N, Hara Y, Yoshimura A, Yoshiura K. Evidence for association between a toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese populations. *J Periodontol* 2007; 42: 541-5.
- [53] Netea MG, Sutmoller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172: 3712-8.
- [54] Chang JH, McCluskey PJ, Wakefield D. Toll-like receptors in ocular immunity and the immunopathogenesis of inflammatory eye disease. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 103-8.
- [55] Papadimitraki ED, Bertsias GK, Boumpas DT. Toll-like receptors and autoimmunity: A critical appraisal. *J Autoimmun* 2007; 29: 310-8.
- [56] Zhang D, Zhang G, Hayden MS, Greenblatt MB, Bussey C, Flavell RA, *et al.* A toll-like receptor prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004; 303: 1522-6.
- [57] Bhattacharjee RN, Akira S. Toll-like receptor 9 signaling for therapeutic use. *Mini Rev Med Chem* 2006; 6: 287-91.
- [58] Eder W, Klimecki W, Yu L, von Mutius E, Riedler J, Braun-Fahrlander C, *et al.* Toll-like receptor 2 as a major gene for asthma in children of European farmers. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 482-8.
- [59] Tantisira K, Klimecki WT, Lazarus R, Palmer LJ, Raby BA, Kwiatkowski DJ, *et al.* Toll-like receptor 6 gene (TLR6): single-nucleotide polymorphism frequencies and preliminary association with the diagnosis of asthma. *Genes Immun* 2004; 5: 343-6.
- [60] Phipps S, Lam CE, Foster PS, Matthaei KI. The contribution of Toll-like receptors to the pathogenesis of asthma. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 463-70.
- [61] Revets H, Pynaert G, Grooten J, De Baetselier P. Lipoprotein, a TLR2/4 ligand modulates Th2-driven allergic immune responses. *J Immunol* 2005; 174: 1097-103.
- [62] Hoffjan S, Stemmler S, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Arinir U, Rohde G, *et al.* Evaluation of the Toll-like receptor 6 Ser249Pro polymorphism in patients with asthma, atopic dermatitis and chronic obstructive pulmonary disease. *BMC Med Genet* 2005; 6: 34.
- [63] Lazarus R, Raby BA, Lange C, Silverman EK, Kwiatkowski DJ, Vercelli D, *et al.* Toll-like receptor 10 genetic variation in association with asthma in two independent samples. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 594-600.
- [64] Sarir H, Henricks PA, van Houwelingen AH, Nijkamp FP, Folerts G. Cell, mediators and toll-like receptors in COPD. *Eur J Pharmacol* 2008; 585: 346-53.
- [65] Hansen BS, Hussain RZ, Lovett-Racke AE, Thomas JA, Racke MK. Multiple toll-like receptor agonists acts as potent adjuvants in the induction of autoimmunity. *J Neuroimmunol* 2006; 172: 1256-65.
- [66] Marta M, Andersson A, Isaksson M, Kümpe O, Lobell A. Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 2008; 38: 565-75.
- [67] Prinz M, Garbe F, Schmidt H, Mildner A, Gutcher I, Wolter K, *et al.* Innate immunity mediated by TLR9 modulated pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2006; 116: 456-64.
- [68] Atkinson TJ. Toll-like receptors, transduction-effector pathways, and disease diversity: evidence of an immunobiological paradigm explaining all human illness. *Int Rev Immunol* 2008; 27: 255-281.
- [69] Hawn TR, Wu H, Grossman JM, Hahn BH, Tsao BP, Adereem A. A stop codon polymorphism of toll-like receptor 5 is associated with resistance to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 10593-7.
- [70] Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S. Autoreactive B cell responses to

- RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* 2006; 312: 1669-72.
- [71] Ehlers M, Ravetch JV. Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Trends Immunol* 2007; 28: 74-9.
- [72] Lien E, Zipris D. The role of toll-like receptor pathways in the mechanism of type I diabetes. *Curr Mol Med* 2009; 9: 52-68.
- [73] Nair A, Wolter TR, Meyers AJ, Zipris D. Innate immune pathway in virus-induced autoimmune diabetes. *Ann NY Acad Sci USA* 2008; 1150: 139-42.
- [74] Marsland BJ, Nembrini C, Grun K, Reissmann R, Kurrer M, Leipner C, *et al.* TLR ligands act directly upon T cells to restore proliferation in the absence of protein kinase C-theta signalling and promote autoimmune myocarditis. *J Immunol* 2007; 178: 3466-73.
- [75] Lin E, Freedman JE, Beaulieu LM. Innate immunity and toll-like receptor antagonists: a potential role in the treatment of cardiovascular disease. *Cardiovasc Ther* 2009; 27: 117-23.
- [76] Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4: 444-54.
- [77] Lang KS, Georgiev P, Recher M, Navarini AA, Bergthaler A, Heikenwalder M, *et al.* Immunoprivileged status of the liver controlled by toll-like receptor 3 signaling. *J Clin Invest* 2006; 116: 2456-63.
- [78] Yamazaki K, Suzuki K, Yamada T, Takeshita F, Matsumoto M, Mitsuhashi T, *et al.* Suppression of iodide uptake of thyroid hormone synthesis with stimulation of the type I interferon system by double-stranded ribonucleic acid in cultured human thyroid follicles. *Endocrinology* 2007; 148: 3226-35.
- [79] Barrat FJ, Coffman RL. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune disease. *Immunol Rev* 2008; 223: 271-83.
- [80] Gilliet M, Lande R. Anti-microbial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 401-7.
- [81] Steenholdt C, Andresen L, Pedersen G, Hansen A, Brynkskov J. Expression and function of toll-like receptor 8 and tollip in colonic epithelial cells from patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2009; 44:195-204.
- [82] Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000; 68: 7010-7.
- [83] Netea MG, Kullberg BJ, de Jong B, Franke T, Sprong TH, Naber JP, *et al.* NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2052-9.
- [84] Pierik M, Joosens S, Van Steen K, Van Schverbeek N, Vlietinck R, Rutgeerts P, *et al.* Toll-like receptor -1, -2, -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12:1-8.
- [85] Hong J, Leany E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GM. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1760-6.
- [86] Vijay-kumar M, Aitken JD, Gewirtz AT. Toll-like receptor 5 protecting the gut from enteric microbes. *Semin Immunopathol* 2008; 30: 11-21.
- [87] Brentano F, Kyburtz D, Gay S. Toll-like receptors and rheumatoid arthritis. *Methods Mol Biol* 2009; 517: 329-43.
- [88] Ospelt C, Brentano F, Bergel Y, Stanck J, Kolling C, Takk PP, *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: 3684-92.
- [89] Liu B, Yang J, Dai R, Medzhitov MA, Freudenberg PL, Zhang PL, *et al.* TLR4 up-regulation at protein or gene level is pathogenic for lupus-like autoimmune disease. *J Immunol* 2006; 177: 6880-8.
- [90] Benigni A, Caroli C, Longaretti L, Gagliardini E, Zoja C, Moiola D, *et al.* Involvement of renal tubular toll-like receptor 9 in the development of tubulointerstitial injury in systemic lupus. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 1569-78.
- [91] Anders H, Schlöndorff D. Toll-like receptor: emerging concepts in kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2007; 16: 177-83.
- [92] Zeromski J, Mozer-Lisewska I, Kaczmarek M. Significance of toll-like receptors expression in tumor growth and spreading: a short review. *Cancer Microenviron* 2008; 1: 37-42.
- [93] Wolska A, Lech-Maranda E, Robak T. Toll-like receptors and their role in carcinogenesis and anti-tumor treatment. *Cell Mol Biol Lett* 2009; 14: 248-72.
- [94] Paulus CM, Kaiser A, Wresinsli C, Hinrichs CS, Cassard L, Boni A, *et al.* Toll-like receptors in tumor immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5280-9.
- [95] Gangloff SC, Guenounou M. Toll-like receptors and immune response in allergic disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 2004; 26: 115-25.
- [96] Velasco G, Campo M, Manrique OJ, Bellou A, He H, Arestides RS, *et al.* Toll-like receptor 4 or 2 agonists decrease allergic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 218-24.
- [97] Bullens DM, Ceuppen JL. Influence of toll-like receptor ligands on the dendritic cell-T cell interactions, therapeutic options for allergic diseases? Mini-review. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008; 7: 211-6.
- [98] Van Duin D, Shaw AC. Toll-like receptors in older adults. *J Am Geriatr Soc* 2007; 55: 1438-44.
- [99] Ishihara S, Rumi MAK, Ortega-Cava CF, Kazumori H, Kadowaki Y, Ishimura N, *et al.* Therapeutic targeting of Toll-like receptors in gastrointestinal inflammation. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 4215-4228.
- [100] Ishii KJ, Uematsu S, Akira S. "Toll" gates for future immunotherapy. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 4135-42.
- [101] Romagne F. Current and future drugs targeting one class of innate immunity receptors: the Toll-like receptors. *Drug Discov Today* 2007; 12: 80-87.
- [102] Tse K, Horner AA. Update on toll-like receptor-directed therapies for human disease. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 77-80.
- [103] Parkinson T. The future of toll-like receptors therapeutics. *Curr Opin Mol Ther* 2008; 10: 21-31.
- [104] Horner AA, Ronhaghy A, Cheng PM, Nguyen MD, Cho HJ, Broide D, *et al.* Immunostimulatory DNA is a potent mucosal adjuvant. *Cell Immunol* 1998; 190: 77-82.
- [105] Van Duin D, Medzhitov R, Show AC. Triggering TLR signalling in vaccination. *Trends Immunol* 2006; 27: 49-55.
- [106] Halperin SA, Dobson S, McNeil S, Langley JM, Smith B, McCall-Sani R, *et al.* Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults. *Vaccine* 2006; 24: 20-26.
- [107] Liew F, Xu D, Brint EK, O' Neill AJ. Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature* 2006; 5: 446-58.
- [108] LeBourder, E, Rey-Nores JE, Rushmere NK, Grigorov M, Lawn SD, Affolter M, *et al.* Soluble forms of Toll-like receptors (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk. *J Immunol* 2003; 171: 6680-9.
- [109] Iwami, KI, Matsuguchi T, Masuda A, Kikuchi T, Musikacharoen T, Yoshikai Y. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signalling. *J Immunol* 2000; 165: 6682-6.
- [110] Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, *et al.* ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol* 2004; 5: 373-9.
- [111] Qin J, Quian Y, Yao J, Grace C, Li X. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4- mediated signalling through different mechanisms. *J Biol Chem* 2005; 280: 25233-41.
- [112] Bulek K, Swaidani S, Qin J, Lu Y, Gulen MF, Herjan T, *et al.* The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J Immunol* 2009; 182: 2601-9.
- [113] Divanovik S, Trompette A, Atabani SF, Madan R, Golenbock DT, Visintin A, *et al.* Negative regulation of toll-like receptor 4 signaling by the toll-like receptor homolog RP105. *Nat Immunol* 2005; 6: 571-8.
- [114] Diehl GE, Yue HH, Hsieh K, Kuang AA, Ho M, Morici LA, *et al.* TRAIL-R as a negative regulator of innate immune cell responses. *Immunity* 2004; 21: 877-89.
- [115] Wang J, Hu Y, Deng WW, Sun B. Negative regulation of toll-like receptor signalling pathway. *Microbes Infect* 2009; 11: 321-7.
- [116] Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivio N, Beyaert R, Tschopp J. Inhibition of interleukin 1 receptor/toll-like receptor signalling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med* 2003; 197: 263-8.

- [117] Lang T, Mansell A. The negative regulation of toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 425-34.
- [118] O'Neill LA. DisSARMing toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006; 7: 1023-5.
- [119] Wang T, Chuang TH, Ronni T, Gu S, Du YC, Cai H, *et al.* Flightless I homolog negatively modulates the TLR pathway. *J Immunol* 2006; 176: 1355-62.
- [120] Hardy MP, O'Neill LA. The murine IRAK2 gene encodes four alternatively spliced isoforms, two of which are inhibitory. *J Biol Chem* 2004; 279: 27699-708.
- [121] Takeshita F, Ishii KJ, Kobiyama K, Kojima Y, Coban C, Sasaki S, *et al.* TRAF4 acts as a silencer in TLR-mediated signalling through the association with TRAF6 and TRIF. *Eur J Immunol* 2005; 35: 2477-85.
- [122] Zhang G, Ghosh S. Negative regulation of toll-like receptor-mediated signalling by Tollip. *J Biol Chem* 2002; 277: 7059-65.
- [123] Boone DL, Turner EE, Lee EG, Ahmad RC, Wheeler MT, Tsui C, *et al.* The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of toll-like receptor responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 1052-60.
- [124] Fan H, Luttrell LM, Tempel GE, Senn JJ, Halushka PV, Cook JA. β -arrestins 1 and 2 differentially regulate LPS-induced signalling and pro-inflammatory gene expression. *Mol Immunol* 2007; 44: 3092-9.
- [125] Wullaert A, Verstrepen L, Van Huffel S, Adib-Conquy M, Cornelis S, Kreike M, *et al.* LIND/ABIN-3 is a novel lipopolysaccharide-inducible inhibitor of NF- κ B activation. *J Biol Chem* 2007; 282: 81-90.
- [126] Mashima R, Saek K, Aki D, Minoda Y, Takaki H, Kobayashi T, *et al.* FLN29, a novel interferon- and LPS-inducible gene acting as a negative regulator of toll-like receptor signalling. *J Biol Chem* 2005; 280: 41289-97.
- [127] Yoshida H, Jono H, Kai H, Li LD. The tumor suppressor cylindromatosis (CYLD) acts as a negative regulator for toll-like receptor 2 signaling *via* negative cross-talk with TRAF6 and TRAF7. *J Biol Chem* 2005; 280: 41111-21.
- [128] An H, Zhao W, Hou J, Zhang Y, Xie Y, Xu H, *et al.* SHP-2 phosphatase negatively regulates the TRIF adaptor protein-dependent type I interferon and proinflammatory cytokine production. *Immunity* 2006; 25: 918-29.
- [129] Ryo A, Suizu F, Yoshida Y, Perrem K, Liou YC, Wulf G, *et al.* Regulation of NF- κ B signalling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol Cell* 2003; 12: 1413-26.
- [130] Saitoh T, Tun-Kyi A, Ryo A, Yamamoto M, Finn G, Fujita T, *et al.* Negative regulator of interferon-regulatory factor 3-dependent innate antiviral response by the prolyl isomerase Pin1. *Nat Immunol* 2006; 7: 598-605.
- [131] Fukao T, Koyasu S. PI3K and negative regulation of TLR signalling. *Trends Immunol* 2003; 24: 358-63.
- [132] Gilchrist M, Thorsson V, Li B, Rust AG, Korb M, Kennedy K, *et al.* Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of toll-like receptor-4. *Nature* 2006; 441: 173-8.
- [133] Carmody RJ, Ruan Q, Palmer S, Hilliard B, Chen YH. Negative regulation of toll-like receptor signalling by NF- κ B p50 ubiquitination blockade. *Science* 2007; 317: 675-8.
- [134] Beutler B. Interferences, questions and possibilities in toll-like receptors signalling. *Nature* 2004; 430: 257-63.
- [135] Foster SL, Medzhitov R. Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol* 2009; 130: 7-15.
- [136] Iwasaki Y, Taguchi T, Nishiyama M, Asai M, Yoshida M, Kambayashi M, *et al.* Lypopolysaccharide stimulates proopiomelanocortin gene expression in AtT20 corticotroph cells. *Endocr J* 2008; 55: 285-90.
- [137] Bornstein S, Zacharowski P, Schumann R, Barthel A, Tran N, Papewalis C, *et al.* Impaired adrenal stress response in toll-like receptor 2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 16695-700.
- [138] Zacharowski K, Zararowski P, Koch A, Baban A, Tran N, Berkels R, *et al.* Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6392-7.
- [139] Palazzo M, Balsari A, Rossini A, Selleri S, Calcaterra C, Gariboldi S, *et al.* Activation of enteroendocrine cells *via* TLRs induces hormone, chemokine, and defensin secretion. *J Immunol* 2007; 178: 4296-303.
- [140] Sternberg E. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 318-29.
- [141] Gonzalez-Rey E, Delgado M. Anti-inflammatory neuropeptide receptors: new therapeutic targets for immune disorders? *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 482-91.
- [142] Brenner S, Prösch S, Schenke-Layland K, Riese U, Gausmann U, Platzer C. cAMP-induced interleukin-10 promoter activation depends on CAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem* 2003; 278: 5597-604.
- [143] Park P, Huang H, McMullen M, Bryan K, Nagy L. Activation of cyclic-AMP response element binding protein contributes to adiponectin-stimulated interleukin-10 expression in raw 264.7 macrophages. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 1258-66.
- [144] Chassin C, Hornef M, Bens M, Lotz M, Goujon J-M, Vimont S, *et al.* Hormonal control of the renal immune response and antibacterial host defence by arginine vasopressin. *J Exp Med* 2007; 204: 2837-52.
- [145] Harzenetter M, Novotny A, Gais P, Molina C, Altmayr F, Holzmann B. Negative regulation of TLR responses by the neuropeptide CGRP is mediated by the transcriptional repressor ICER. *J Immunol* 2007; 179: 607-15.
- [146] Yoon SW, Goh SH, Chun JS, Cho EW, Lee MK, Kim KL, *et al.* α -melanocyte-stimulating hormone inhibits lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor- α production in leukocytes by modulating protein kinase A, p38 kinase, and nuclear factor κ B signaling pathways. *J Biol Chem* 2003; 278: 32914-20.
- [147] DeWire S, Ahn S, Lefkowitz R, Shenoy S. β -arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol* 2007; 69: 483-510.
- [148] Di Fiore P, Polo S, Hofmann K. When ubiquitin meets ubiquitin receptors: a signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 491-7.
- [149] Witherow D, Garrison T, Miller W, Lefkowitz R. β -Arrestin inhibits NF- κ B activity by means of its interaction with the NF- κ B inhibitor I κ B α . *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8603-7.
- [150] Gao H, Sun Y, Wu Y, Luan B, Wang Y, Qu B, *et al.* Identification of β -arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF- κ B pathways. *Mol Cell* 2004; 14: 303-17.
- [151] Wang Y, Tang Y, Teng L, Wu Y, Zhao X, Pei G. Association of β -arrestin and TRAF6 negatively regulates toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* 2006; 7: 139-47.
- [152] Taylor A. The immunomodulating neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) suppresses LPS-stimulated TLR4 with IRAK-M in macrophages. *J Neuroimmunol* 2005; 162: 43-50.
- [153] Tsatsanis C, Androulidaki A, Alissafi T, Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Roger T, *et al.* Corticotropin-releasing factor and the urocortins induce the expression of TLR4 in macrophages *via* activation of the transcription factors PU.1 and AP-1. *J Immunol* 2006; 176: 1869-77.
- [154] Said SI, Mutt V. Potent peripheral splanchnic vasodilator peptide from normal gut. *Nature* 1970; 225: 863-4.
- [155] Davidson A, Moddy TW, Gozes I. Regulation of VIP expression in general. *J Mol Neurosci* 1996; 7: 99-110.
- [156] Bellinger DL, Lorton D, Horn L, Brouxon S, Felten SY, Felten DL. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) innervation of rat thymus and lymph nodes. *Peptides* 1997; 8: 1139-49.
- [157] Cutz E, Chan W, Track NS, Gooth A, Said SI. Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators. *Nature* 1978; 275: 661-2.
- [158] O'Dorisio MS, O'Dorisio TM, Cataland S, Balcerzak SP. Vasoactive intestinal polypeptide as a biochemical marker for polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 1980; 96: 666-72.
- [159] Weinstock JV, Blum AM. Detection of vasoactive intestinal peptide and localization of its mRNA within granulomas of murine schistosomiasis. *Cell Immunol* 1990; 125: 291-300.
- [160] Gomariz RP, Lorenzo MJ, Cacicedo L, Zapata AG. Demonstration of immunoreactive vasoactive intestinal peptide (IR-VIP) and somatostatin (IR-SOM) in rat thymus. *Brain Behav Immun* 1990; 4: 151-61.
- [161] Gomariz RP, Delgado M, Naranjo JR, Mellstrom B, Tormo A, Mata F, *et al.* VIP gene expression in rat thymus and spleen. *Brain Behav Immun* 1992; 7: 271-8.
- [162] Leceta J, Martinez J, Delgado M, Garrido E, Gomariz RP. Lymphoid cells subpopulations containing vasoactive intestinal peptide. *Peptides* 1994; 15: 791-7.

- [163] Martínez C, Delgado M, Abad C, Gomariz RP, Ganea D, Leceta J. Regulation of VIP production and secretion by murine lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1999; 93: 126-38.
- [164] Harnar AJ, Arimura A, Gozes I, Journot L, Laburthe M, Pisegna JR, *et al*. Nomenclature of receptors for vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). *Pharmacol Rev* 1998; 50: 625-27.
- [165] Delgado M, Abad C, Martínez C, Juarranz Y, Arranz A, Gomariz RP, *et al*. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med* 2002; 80: 16-24.
- [166] Gomariz RP, Martínez C, Abad C, Leceta J, Delgado M. Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives. *Curr Pharm Des* 2001; 7: 89-111.
- [167] Delgado M, Pozo D, Ganea D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 249-90.
- [168] Delgado M, Abad C, Martínez C, Leceta J, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease. *Nat Med* 2001; 7: 563-8.
- [169] Abad C, Martínez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, *et al*. Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003; 124: 961-71.
- [170] Li H, Mei Y, Wang Y, Xu L. Vasoactive intestinal peptide suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T helper 1 responses. *J Clin Immunol* 2006; 26: 430-7.
- [171] Lodde BM, Mishiba F, Wang J, Cotrim AP, Afiore S, Tak PP, *et al*. Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 195-200.
- [172] Rosignoli F, Torroba M, Juarranz Y, García-Gómez M, Martínez C, Gomariz RP, *et al*. VIP and tolerance induction in autoimmunity. *Ann NY Acad Sci USA* 2006; 1070: 525-30.
- [173] Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 52-63.
- [174] Gomariz RP, Arranz A, Juarranz Y, Gutierrez-Cañas I, García-Gómez M, Leceta J, *et al*. Regulation of TLR expression, a new perspective for the role of VIP in immunity. *Peptides* 2007; 28: 1825-32.
- [175] Hart OM, Athie-Morales V, O'Connor GM, Gardiner CM. TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *J Immunol* 2005; 175: 1636-42.
- [176] Kobayashi M, Kweon MN, Kuwata H, Schreiber RD, Kiyono H, Takeda K, *et al*. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J Clin Invest* 2003; 111: 1297-308.
- [177] Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995; 182: 1281-90.
- [178] Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002; 8: 567-73.
- [179] Gomariz RP, Arranz A, Abad C, Torroba M, Martínez C, Rosignoli F, *et al*. Time-course of toll-like receptors 2 and 4 in inflammatory bowel disease and homeostatic effect of VIP. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 491-502.
- [180] Arranz A, Abad C, Juarranz Y, Torroba M, Rosignoli F, Leceta J, *et al*. Effect of VIP on TLR2 and TLR4 expression in lymph node immune cells during TNBS-induced colitis. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 129-34.
- [181] Arranz A, Abad C, Juarranz Y, Leceta J, Martínez C, Gomariz RP. Vasoactive intestinal peptide as a healing mediator in Crohn's disease. *Neuroimmunomodulation* 2008; 15: 46-53.
- [182] Musikacharoen T, Matsuguchi T, Kikuchi T, Yoshikai Y. NF- κ B and STAT 5 play important roles in the regulation of mouse toll-like receptor 2 gene expression. *J Immunol* 2001; 166: 4516-24.
- [183] Delgado M, Muñoz-Elias EJ, Kan Y, Gozes I, Fridkin M, Brenneman DE, *et al*. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor α transcriptional activation by regulating nuclear factor- κ B and cAMP response element-binding protein/c-Jun. *J Biol Chem* 1998; 273: 31427-36.
- [184] Juarranz Y, Abad C, Martínez C, Arranz A, Gutierrez-Cañas I, Rosignoli F, *et al*. Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 1034-45.
- [185] Arranz A, Juarranz Y, Leceta J, Gomariz RP, Martínez C. VIP balances innate and adaptive immune responses induced by specific stimulation of TLR2 and TLR4. *Peptides* 2008; 29: 948-56.
- [186] McCormack G, Moriarty D, O'Donoghue DP, McCormick PA, Sheahan K, Baird AW. Tissue cytokine and chemokine expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm Res* 2001; 50: 491-5.
- [187] Erard F, Ryffel B. Toll-like receptor-potential drug targets in infectious disease. *Infect Disord Drug Targets* 2008; 8: 221-31.
- [188] Xu D, Komai-Koma M, Liew FY. Expression and function of toll-like receptor on T cells. *Cell Immunol* 2005; 233: 85-9.
- [189] Kabelitz D. Expression and function of toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 39-45.
- [190] Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 7048-53.
- [191] Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med* 2003; 197: 403-11.
- [192] Arciszewski MB, Sand E, Ekblad E. Vasoactive intestinal peptide rescues cultured rat myenteric neurons from lipopolysaccharide induced cell death. *Regul Pept* 2008; 146: 218-23.
- [193] Ekblad E, Bauer AJ. Role of vasoactive intestinal peptide and inflammatory mediators in enteric neuronal plasticity. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 123-8.
- [194] Sandgren K, Lin Z, Fex-Svenningsen A, Ekblad E. Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide promote survival of adult rat myenteric neurons in culture. *J Neurosci Res* 2003; 72: 592-602.
- [195] Gozes I, Brenneman DE. A new concept in the pharmacology of neuroprotection. *J Mol Neurosci* 2000; 14: 61-8.
- [196] Ekblad E, Sjuve R, Arner A, Sundler F. Enteric neuronal plasticity and a reduced number of interstitial cells of Cajal in hypertrophic rat ileum. *Gut* 1998; 42: 836-44.
- [197] Arciszewski MB, Pierzynowski S, Ekblad E. Lipopolysaccharide induces cell death in cultured porcine myenteric neurons. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1661-8.
- [198] Arranz A, Androulidaki A, Zacharioudaki V, Martínez C, Margioris AN, Gomariz RP, *et al*. Vasoactive intestinal peptide suppresses toll-like receptor 4 expression in macrophages *via* Akt1 reducing their responsiveness to lipopolysaccharide. *Mol Immunol* 2008; 45: 2970-80.
- [199] Roger T, Miconnet I, Schiesser AL, Kai H, Miyake K, Calandra T. Critical role for Ets, AP-1 and GATA-like transcription factors in regulating mouse Toll-like receptor 4 (Tlr4) gene expression. *Biochem J* 2005; 387: 355-65.
- [200] Guha M, Mackman N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 32124-32.
- [201] Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, *et al*. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with downregulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000; 164: 3476-9.
- [202] West MA, Heagy W. Endotoxin tolerance: a review. *Crit Care Med* 2002; 30: S64-S73.
- [203] Herrera JL, Gonzalez-Rey E, Fernández-Montesinos R, Quintana FJ, Najmanovich R, Pozo D. Toll-like receptor stimulation differentially regulates vasoactive intestinal peptide type 2 receptor in macrophages. *J Cell Mol Med* 2009; January 16; doi: 10.1111/j1582-4934.2008.00662.
- [204] Gutierrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martínez C, Galindo M, *et al*. VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology* 2006; 45: 527-32.
- [205] Brentano F, Kyburz D, Schorr O, Gay R, Gay S. The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. *Cell Immunol* 2005; 233: 90-6.
- [206] Radstake TR, Roelofs MF, Jenniskens YM, Oppers-Walgreen B, van Riel RL, Barrera P, *et al*. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 *via* interferon- γ . *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3856-65.
- [207] Kyburz D, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Gay RE, Carson DA, *et al*. Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides

- activate fibroblasts by toll-like receptor signaling. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 642-50.
- [208] Proost P, Verpoest S, Van de Borne K, Schutyser E, Struyf S, Put W, *et al.* Synergistic induction of CXCL9 and CXCL11 by toll-like receptor ligands and interferon- γ in fibroblasts correlates with elevated levels of CXCR3 in septic arthritis synovial fluids. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 777-84.
- [209] Seibl R, Birchler T, Loeliger S, Hossle JP, Gay RE, Saurenmann T, *et al.* Expression and regulation of toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 2003; 162: 1221-7.
- [210] Burman A, Haworth O, Hardie DL, Amft EN, Siewrt C, Jackson DG, *et al.* A chemokine-dependent stromal induction mechanisms for aberrant lymphocyte accumulation and compromised lymphatic return in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2005; 174: 1693-700.
- [211] Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutierrez-Cañas I, Palao G, Galindo M, *et al.* Vasoactive intestinal peptide modulates pro-inflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheuma-toid synovial cells. *Rheumatology* 2004; 43: 416-22.
- [212] Arranz A, Gutierrez Cañas I, Carrión M, Juarranz Y, Pablos JL, Martínez C, *et al.* VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mol Immunol* 2008; 45: 3065-73.
- [213] Delgado M, Leceta J, Abad C, Martínez C, Ganea D, Gomariz RP. Shedding of membrane-bound CD14 from lipopolysaccharide-stimulated macrophages by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide. *J Neuroimmunol* 1999; 99: 61-71.
- [214] Juarranz Y, Gutierrez-Cañas I, Santiago B, Carrión M, Pablos JL, Gomariz RP. Differential expression of vasoactive intestinal peptide and its functional receptors in human osteoarthritic and rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1086-95.
- [215] Delgado M, Robledo G, Rueda B, Varela N, O'Valle F, Hernández-Cortés P, *et al.* Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 1010-1019.
- [216] Foster N, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ. Vasoactive intestinal peptide inhibits up-regulation of human monocytes TLR2 and TLR4 by LPS and differentiation of monocytes to macrophages. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 893-903.
- [217] Rehli M. Of mice and men: species variation of toll-like receptor variation. *Trends Immunol* 2002; 23: 375-8.
- [218] Rehli M, Poltorak A, Schwarzfischer I, Krause SW, Andreesen R, Beutler B. PU.1 and interferon consensus sequence-binding protein regulate the myeloid expression of the human toll-like receptor 4 gene. *J Biol Chem* 2000; 275: 9773-81.
- [219] Haehnel V, Schwarzfischer I, Fenton MJ, Rehli M. Transcriptional regulation of the human Toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J Immunol* 2002; 168: 5629-37.
- [220] Joyee AG, Yang X. Role of toll-like receptors in immune responses to chlamydial infections. *Curr Pharm Des* 2008; 14(6): 593-600.
- [221] Wong JP, Christopher ME, Viswanathan S, Dai X, Salazar AM, Sun LQ, *et al.* Antiviral role of toll-like receptor-3 agonists against seasonal and avian influenza viruses. *Curr Pharm Des* 2009; 15(11): 1269-74.
- [222] Zwanziger D, Beck-Sickinger AG. Radiometal targeted tumor diagnosis and therapy with peptide hormones. *Curr Pharm Des* 2008; 14(24): 2385-400.

Discusión

4. DISCUSIÓN

Los sistemas endocrino, nervioso e inmune establecen una compleja red de interacciones en el tejido sinovial que están implicadas en el mantenimiento de la homeostasis articular. Entre los mediadores compartidos por el sistema neuroinmunoendocrino se encuentran el VIP y el PACAP, dos neuropéptidos cuyo efecto antiinflamatorio e inmunomodulador ha sido ampliamente demostrado en diferentes modelos animales de enfermedades inflamatorias (Cutolo *et al.*, 2007; Souza-Moreira *et al.*, 2011; Gomariz *et al.*, 2010). Los efectos inmunoreguladores del VIP también han sido descritos, por nuestro grupo, sobre cultivos celulares de la sinovia y FLS aislados de pacientes con OA y con RA, tanto en condiciones basales como tras ser estimulados con la citocina proinflamatoria TNF α o con el ligando de TLR4, el LPS (Juarranz *et al.*, 2004, 2006; Gutiérrez-Cañás *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de haberse detectado la presencia de diferentes neuropéptidos en las articulaciones afectadas por dichas enfermedades reumáticas, no se había estudiado la potencial participación de estos mediadores endógenos en la patogénesis de la sinovitis a nivel local, ni la regulación de su expresión y la de sus receptores en las células residentes (Grönblad *et al.*, 1988; Cutolo *et al.*, 2007).

Los resultados del **artículo 1** revelan, por primera vez, que los FLS son capaces de sintetizar VIP pero no de expresar PACAP, detectándose una menor presencia de VIP en los FLS de pacientes con AR que en los de OA. También muestran que el tratamiento *in vitro* con TNF α induce una reducción significativa de la expresión de VIP en los FLS de OA, los cuales pasan a presentar valores equivalentes a los observados en AR. Así, los niveles reducidos de VIP endógeno parecen estar asociados a condiciones inflamatorias, circunstancia que podría interpretarse como un contexto permisivo que facilitase la señalización proinflamatoria en estas células. En este sentido, se ha descrito que cuando la sinovitis se encuentra en fase crónica en pacientes con AR, la membrana sinovial sufre una serie de cambios estructurales que afectan a su inervación. Se produce una pérdida de las fibras del sistema nervioso simpático y un aumento de las sensoriales que repercute en la composición en neuropéptidos del tejido (Mapp *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 2000). Dicha reducción de las fibras nerviosas simpáticas conlleva un descenso del contenido local de VIP que también contribuiría, según lo arriba propuesto, al mantenimiento de la señalización proinflamatoria en las células residentes (Cutolo *et al.*, 2007). En esta misma línea, un trabajo de reciente publicación describe que los niveles de VIP en el líquido sinovial de pacientes con OA son menores que los de individuos sanos, siendo más reducidos cuanto mayor es el grado de destrucción de la articulación (Jiang *et al.*, 2012). Puesto que la sinovitis se ha asociado con etapas avanzadas en la progresión de la OA, estos últimos datos apoyarían nuestros resultados y por tanto, la hipótesis de la existencia de una relación inversa entre la presencia de VIP y el grado de inflamación sinovial y destrucción articular. Asimismo, cabe señalar que nuestro grupo ha estado colaborando en un estudio que analiza la relación que existe entre los valores de VIP en suero y la evolución de los pacientes con AR, durante un periodo de seguimiento de 5 años en consulta. Los resultados obtenidos demuestran que los niveles de actividad de la artritis y la concentración de VIP en suero correlacionan inversamente. Así, los pacientes con niveles bajos de VIP tienden a tener un peor curso evolutivo a lo largo de la enfermedad (trabajo en revisión).

En el **artículo 1** también se ha incluido el análisis de la expresión de los receptores de VIP y de PACAP en los FLS, observándose que en los aislados de pacientes con OA predomina la expresión constitutiva del receptor VPAC1, mientras que en los de AR lo hace el VPAC2. En ninguno de los casos se detectó mRNA de PAC1, receptor específico de PACAP. En concordancia con estos resultados, en células inmunes procedentes de pacientes con AR también se ha descrito una reducción de la expresión de VPAC1, en este caso asociada con un polimorfismo genético de dicho receptor (Delgado *et al.*, 2008a). Además, nuestros resultados muestran que tras el tratamiento *in vitro* con TNF α , se produce un aumento de la expresión génica del receptor VPAC2 que, en el caso de los FLS de OA, se acompaña de un descenso de los transcritos de VPAC1. De modo que el estímulo inflamatorio del TNF α induce en los FLS de OA un fenotipo similar al de los de AR en cuanto al patrón de expresión de los receptores de VIP, de manera análoga a la modificación de los niveles de VIP que observábamos tras el tratamiento con dicha citocina.

La distribución y regulación diferencial de VPAC1 y VPAC2 ya había sido previamente descrita en células mieloides y linfoides de humanos y roedores. Concretamente, los monocitos, macrófagos y las células T expresan de manera constitutiva VPAC1, mientras que el VPAC2 es inducido en estas células tras la activación del TCR o mediante la estimulación con LPS (Martínez *et al.*, 1999; Gomariz *et al.*, 1994; Lara-Márquez *et al.*, 2001). Asimismo, las células madre hematopoyéticas CD34+, CD38- también expresan preferentemente el receptor VPAC1 (Kawakami *et al.*, 2004). Por tanto, la presencia del receptor VPAC2 parece estar asociada a la diferenciación o a la activación celular, siendo esta idea compatible con nuestros resultados relativos a la mayor expresión de VPAC2 en los FLS de AR y al aumento de VPAC2 en los FLS de OA sometidos a un estímulo inflamatorio. Sin embargo, aunque las condiciones inflamatorias se presentan como un elemento modulador de la expresión de VPAC1 y VPAC2 en los FLS, siguen sin determinarse los factores de transcripción responsables de regular su distribución diferencial, habiéndose identificado tan sólo algunos represores de VPAC1 (Laburthe *et al.*, 2002).

En cuanto al estudio de la funcionalidad de estos receptores en los FLS, ambos pertenecientes a la familia de GPCRs, cabe señalar que aunque la unión de VIP también puede activar otras señales intracelulares, la estimulación de la AC y el consiguiente aumento del AMPc se presenta como la principal vía de señalización mediadora de sus efectos biológicos (Harmar *et al.*, 2012). Los resultados presentados en el **artículo 1**, obtenidos en un ensayo en el que medimos y comparamos la actividad de la AC inducida por VIP y por agonistas de VPAC1 y VPAC2, además de confirmar que los receptores de VIP señalizan mediante la AC en este tipo celular, demuestran que su distribución también se corresponde con una actividad específica de los mismos. Esta última observación queda evidenciada por el hecho de que los agonistas específicos de VPAC1 o de VPAC2, inducen una activación de la AC equivalente a la iniciada por VIP en los FLS en los que predomina la presencia de uno de los receptores, OA y AR respectivamente. Estos resultados fueron corroborados por los obtenidos en el análisis comparativo de los efectos de los agonistas sobre la producción de mediadores proinflamatorios, como IL-6 y CXCL8, ya que los ligandos específicos mostraron una actividad inhibitoria equivalente a la de VIP.

En suma, consideramos que el conjunto de resultados incluidos en el **artículo 1** supone una aportación de gran utilidad para el diseño de estrategias terapéuticas basadas en el efecto

antiinflamatorio de VIP, aplicables tanto en el tratamiento de la AR como de la OA. En este sentido, ya se apuntaba en la introducción que una de las limitaciones del uso clínico de VIP en humanos son los efectos adversos derivados de su capacidad de unión a diferentes subtipos de GPCRs (Laburthe *et al.*, 2007). La identificación de los receptores de VIP que median sus efectos beneficiosos en las células implicadas en los procesos patogénicos articulares, permitiría usar agonistas específicos y limitar sus dianas de acción para reducir efectos no deseados. De hecho, en un ensayo clínico en pacientes con asma en los que se ha testado el agonista de VPAC2 RO25-1553, utilizado en nuestros experimentos, no se ha descrito ningún tipo de toxicidad (Lindén *et al.*, 2003). Así, nuestros resultados avalan la posibilidad de usar agonistas específicos de VPAC2 como terapia alternativa en el tratamiento de la AR. Sin embargo, a pesar de que se cuenta con diferentes derivados peptídicos dirigidos específicamente frente a los subtipos de receptores de VIP, su aplicación terapéutica sigue resultando complicada, ya que, al igual que muchos neuropéptidos, es altamente inestable y fácilmente degradado por las proteasas de los tejidos, presentando una vida media muy corta. En la actualidad se continúa investigando el diseño de agonistas de naturaleza no peptídica con el objetivo de optimizar su especificidad de unión y aumentar su estabilidad metabólica, un área en la que han tenido una gran repercusión las nuevas nociones sobre la estructura de los receptores de VIP y de sus sitios de unión de los ligandos (Groneberg *et al.*, 2006; González-Rey *et al.*, 2010).

Por otra parte, el control de la respuesta inflamatoria y destructiva mediada por los FLS en la OA y la RA, podría conseguirse a partir del estudio de los mecanismos implicados en la activación de su comportamiento patogénico, lo cual permitiría identificar nuevas dianas terapéuticas sobre las que intervenir. En este sentido, la inmunidad innata parece estar directamente implicada en la aportación patogénica de los FLS a los procesos reumáticos articulares (Bartok y Firestein, 2010; Neumann *et al.*, 2010; Goh y Midwood, 2012). De hecho, numerosos grupos han estudiado la expresión de diferentes PRRs en el tejido sinovial y en células sinoviales aisladas de pacientes con AR y con OA. Mientras que parece bien establecido que en la membrana sinovial de pacientes con AR hay una mayor presencia de los TLRs 2, 3, 4 y 7 y de RIG-I que en la de controles sanos o pacientes con OA (Seibl *et al.*, 2003; Radstake *et al.*, 2004; Ospelt *et al.*, 2008; Imaizumi *et al.*, 2008), los datos de expresión y activación de estos receptores en los FLS son más dispares, y las diferencias entre ambas patologías no son tan aparentes. Por otra parte, en el ambiente sinovial de las articulaciones afectadas por dichas enfermedades reumáticas se ha detectado la presencia de diversos ligandos de PRRs (Brentano *et al.*, 2005a). En el caso de la AR, junto a peptidoglicanos y ácidos nucleicos bacterianos, se han identificado diferentes tipos de virus, tales como parvovirus B19, virus Epstein-Barr o Citomegalovirus, que representan potenciales ligandos para los sensores de dsRNA (TLR3, RIG-I y MDA5) y ssRNA (TLR7) (Takahashi *et al.*, 1998; Saal *et al.*, 1999; Takei *et al.*, 1997; Hamerman *et al.*, 1982). Además, se ha comprobado que el RNA de células necróticas del líquido sinovial es capaz de actuar como un ligando endógeno y estimular al TLR3 de FLS de AR (Brentano *et al.*, 2005b). De modo que la señalización desencadenada por moléculas de RNA, de origen vírico o endógeno, también podría contribuir a la activación del comportamiento patogénico de los FLS en la sinovial reumatoide (Kawasaki *et al.*, 2011; Bokarewa *et al.*, 2008).

En este contexto, decidimos estudiar la expresión de los diferentes PRRs responsables del reconocimiento de moléculas de RNA en los FLS de OA y AR, analizando además la funcionalidad de

éstos en respuesta a la estimulación con ligandos sintéticos tipo dsRNA (poly(I-C)) y ssRNA (imiquimod).

Los resultados que presentamos en el **artículo 2** confirman que el nivel de mRNA de TLR3 es mayor en los FLS de AR que en los de OA (Ospelt *et al.*, 2008). También demuestran, por primera vez, la presencia de TLR7 en este tipo celular, detectándose niveles de mRNA muy reducidos, aunque superiores en los FLS de OA. Mediante técnicas de inmunocitoquímica comprobamos que la expresión de TLR3 y TLR7 se localizaba en las áreas perinucleares de los FLS, las cuales corresponderían a los compartimentos intracelulares, como endosomas y retículo endoplásmico, en los que se localizan los TLR que reconocen ácidos nucleicos (Blasius y Beutler, 2010). Las imágenes obtenidas muestran, además, que ambos receptores presentan una co-localización parcial.

En cuanto al estudio de las helicasas, en el **artículo 2** describimos que la expresión de RIG-I es constitutiva en ambos tipos de FLS, a diferencia de datos publicados previamente por el grupo de Satoh siendo más elevados los niveles de esta proteína en los de AR (Imaizumi *et al.*, 2008). Describimos además la presencia del sensor citoplásmico MDA5, del que se observa una mayor expresión en los FLS de OA.

En resumen, este bloque de resultados muestra que existe un patrón de distribución diferencial de los sensores de RNA en los FLS de OA y AR, encontrándose TLR3 y RIG-I más expresados en AR, mientras que TLR7 y MDA5 predominan en OA.

Una vez identificada la presencia de diferentes sensores de RNA en los FLS, analizamos si, al igual que ocurre con el TLR4 (Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2006), los ligandos de dichos receptores eran capaces de inducir su expresión. En el **artículo 2** se muestra que el tratamiento *in vitro* con poly(I-C) estimula la expresión génica de TLR3, RIG-I y MDA5, mostrando un mayor efecto sobre el mRNA de TLR3 en los FLS de OA y el mRNA de ambas helicasas en los de AR. En línea con estos resultados, recientemente ha sido publicado un trabajo en el que corroboran que en los FLS de AR se produce un aumento de los transcritos de TLR3, RIG-I y MDA5 en respuesta a la estimulación con dsRNA (Karpus *et al.*, 2012). Por otra parte, tras la estimulación con imiquimod se observó un aumento de la expresión de TLR7 y, curiosamente, también de RIG-I y MDA5. En relación con este último dato, es interesante señalar que aunque el poly(I-C) es el principal ligando que activa las respuestas de RIG-I y MDA5, se ha publicado un estudio en DCs que también describe un incremento de la expresión de ambos sensores citoplásmicos inducido por un aumento de TLR7 (Birmachu *et al.*, 2007). Estos datos podrían interpretarse como muestra de un sistema de regulación entre los sensores de ácidos nucleicos, de acuerdo con la hipótesis que defiende la existencia de algún tipo de comunicación entre los PRRs que permite la coordinación de los mismos durante el desarrollo de las respuestas inmunes (Kawai y Akira, 2011).

Por tanto, los ligandos presentes en el entorno sinovial serían capaces de modular la expresión de los sensores de RNA en los FLS, presentando una regulación positiva tras su estimulación que potenciaría el nivel de activación de estas células. Esto significa que la capacidad de los sensores de dsRNA para inducir su propia expresión, descrita anteriormente en otros tipos celulares, es funcional en los FLS (Imaizumi *et al.*, 2010; Kariko *et al.*, 2004; Heutinck *et al.*, 2012). Por último, en nuestro estudio también queda patente que una molécula de RNA puede ser reconocida por los diferentes

sensores que presentan dichas células, hecho que validaría la idea de que el inicio de la respuesta inflamatoria crónica requiere la activación simultánea de diversos PRRs (Roelofs *et al.*, 2009).

Puesto que el reconocimiento de moléculas de RNA por los PRRs desencadena una señalización intracelular que modula la expresión de determinados mediadores, resulta de gran interés determinar las consecuencias funcionales de su activación en los FLS. En la bibliografía se describe que tras la unión de TLR3 a su ligando, se inicia una señalización independiente de MyD88 que requiere la participación de la molécula adaptadora TRIF y conlleva la activación de NF- κ B y AP-1, induciendo la producción de mediadores inflamatorios y de MMPs. Asimismo, TRIF participa en la activación de IRF3 e IRF7, dos factores que regulan la síntesis de los IFNs de tipo I de manera diferencial, en función del tipo celular que se analice (Blasius y Beutler, 2010).

En el **artículo 2**, se muestra como la estimulación con poly(I-C) de los FLS en cultivo, induce la fosforilación y translocación al núcleo de NF- κ B p65, AP-1 c-Jun e IRF3, siendo la activación de NF- κ B p65 más intensa en los de AR que en los de OA. El paso al núcleo de NF- κ B p65 y de c-Jun se produce en estadios tempranos, comenzando a los 5 minutos, mientras que el de IRF3 se registra a partir de los 60 minutos. Estos datos coinciden con los resultados publicados anteriormente por el grupo de Firestein, en los que además de identificar al IRF3 como el factor de transcripción principal en la respuesta de los FLS de AR a la estimulación con poly(I-C), describen que dicho ligando induce la unión de los factores NF- κ B p65, AP-1 c-Jun e IRF3 en un complejo capaz de regular la transcripción de IFN β , citocinas proinflamatorias y MMPs (Sweeney *et al.*, 2010). Sin embargo, no detectamos ninguna variación en los factores de transcripción IRF7 ni AP-1 c-Fos, sugiriendo que no participen en la señalización inducida por poly(I-C) en los FLS. Esta última observación difiere respecto de los resultados del trabajo citado, ya que en él describen que poly(I-C) también induce la activación de IRF7 en los FLS de AR. No obstante, señalan que se trata de una activación moderada y posterior a la de IRF3, por lo que proponen que este último actúe como inductor del IRF7, un factor de transcripción que no se expresa de manera constitutiva en los FLS. Así, la ausencia de activación de IRF7 reflejada en el **artículo 2** podría estar justificada por el hecho de que, en el tiempo fijado para nuestros experimentos, no se hubiese alcanzado la activación de IRF3 requerida para la inducción de IRF7.

Por su parte, las helicasas RIG-I y MDA5, tras reconocer la presencia de moléculas de dsRNA, desencadenan una señalización intracelular que, al igual que TLR3, conlleva la activación de IRF3 y NF- κ B (Loo y Gale, 2011). El poly(I-C), por tanto, constituye un ligando para estos tres sensores de dsRNA de expresión constitutiva en los FLS, induciendo una señalización que converge en la activación de factores de transcripción comunes. De modo que a partir de los datos presentados en el **artículo 2**, obtenidos tras la estimulación con poly(I-C), no es posible determinar la contribución relativa de TLR3, RIG-I y MDA5 a la activación de IRF3 y NF- κ B p65 observada. Por consiguiente, también será limitada la interpretación de los resultados que obtuvimos al analizar la producción de moléculas reguladas por ambos factores de transcripción.

En la introducción se ha señalado que mientras que el IRF3 está implicado principalmente en la producción de moléculas antivirales como el IFN β , el NF- κ B lo está en la síntesis de quimiocinas proinflamatorias como CXCL8 y el AP-1 en la expresión de MMPs como MMP3 (Santana-de Anda *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2008; Shiozawa *et al.*, 2009). Nuestros resultados revelan que tras estimular

con poly(I-C), aumenta la producción de IFN β , CXCL8 y MMP3, siendo mayor el efecto en los FLS de AR que en los de OA. Tal y como se ha apuntado, en este caso tampoco puede identificarse cuál es la aportación concreta de cada sensor de dsRNA a la síntesis de IFN β y CXCL8. Asimismo, debería tenerse en cuenta que, en FLS de AR, se ha descrito que IRF3 también induce la expresión de CXCL8 y MMP3, mediante un mecanismo que implica la activación de c-Jun y su unión al sitio AP-1. Por tanto, el aumento en los niveles de las moléculas analizadas tras el tratamiento con poly(I-C) no puede ser asociado únicamente a la activación de TLR3, sino que también se debe contemplar la participación de RIG-I y MDA5 en esta respuesta y en la aportación patogénica de los FLS a los procesos de inflamación y destrucción articular. De hecho, en ratones knockout para TLR3, se ha comprobado que la inyección de dsRNA conserva su efecto artrítico, evidenciando la existencia de otros receptores funcionales implicados en la respuesta inflamatoria, que podrían ser las helicasas citoplásmicas RIG-I y MDA5 (Zare *et al.*, 2004).

Aunque la señalización iniciada tras la unión de TLR7 a su ligando no había sido estudiada en los FLS, se ha descrito que este receptor inicia una vía dependiente de MyD88 que, en macrófagos y DCs convencionales, conlleva la translocación al núcleo de NF- κ B, promoviendo la síntesis de citocinas proinflamatorias. Además, la estimulación de TLR7 en pDCs induce una notable activación de IRF7, que actúa como mediador de la producción de IFNs de tipo I, principalmente de IFN α (Kawai y Akira, 2010; Blasius y Beutler, 2010). En el **artículo 2** describimos que el agonista sintético de TLR7, imiquimod, induce la activación de NF- κ B, AP-1 c-Jun y c-Fos, así como un consecuente aumento de la producción de CXCL8 y MMP3. Sin embargo, no observamos que se produjese el paso de IRF7 al núcleo y tampoco detectamos cambios en la expresión génica de IFN α 1, IFN α 4 ni de IFN β . Estos datos corroboran el efecto inductor del imiquimod sobre la producción de CXCL8, previamente descrito en pDCs (Birmachu *et al.*, 2007) y además, demuestran, por primera vez, que la activación de TLR7 conlleva una elevación de la síntesis de MMP3. Así, los resultados obtenidos en este conjunto de experimentos, unidos al aumento de la expresión de RIG-I y MDA5 observado tras el tratamiento con imiquimod, indican que la estimulación del TLR7 amplifica el potencial patogénico de los FLS.

Una vez comprobada la presencia de TLR3, TLR7, RIG-I y MDA5, y su funcionalidad como mecanismos activadores de los FLS, nos propusimos analizar la capacidad de VIP para modular la expresión de dichos sensores. Trabajos anteriores de nuestro grupo demuestran que VIP actúa sobre las respuestas inmunes de los FLS mediadas por TLRs, presentando un efecto más potente sobre los de AR. VIP induce una disminución de la expresión de TLR2 y TLR4 y una regulación negativa de las moléculas implicadas en la señalización TLR4 en los FLS de AR en cultivo, describiéndose también un descenso de la producción de IL-6, CXCL8 y CCL2 (Juarranz *et al.*, 2004, 2006; Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2006; Arranz *et al.*, 2008).

En el **artículo 2** describimos que el tratamiento con VIP reduce la expresión génica de RIG-I aumentada por poly(I-C). Este descenso sólo se corresponde con una menor presencia proteica de la helicasa en los FLS de OA, en los que también era exclusivo el aumento de dicha proteína tras la estimulación con poly(I-C). En cuanto al efecto de VIP sobre MDA5, aunque no se señalan diferencias significativas, se puede observar una tendencia hacia la reducción de su expresión incrementada por el poly(I-C). En cambio, la presencia de VIP no modifica los niveles de mRNA de TLR3 y TLR7

aumentados tras el tratamiento con sus agonistas respectivos. De modo que, a excepción del descenso de RIG-I en los FLS de OA, la acción antiinflamatoria de VIP sobre los FLS no estaría mediada por una reducción de la expresión de los PRRs estudiados.

Sin embargo, el análisis del efecto de VIP sobre los factores de transcripción que intervienen en la señalización de los sensores de RNA, desveló que reduce la activación de IRF3 inducida por poly(I-C), así como la consiguiente producción de IFN β . La valoración de las consecuencias funcionales de la acción inhibitoria de VIP sobre el IFN β es compleja, ya que existe cierta controversia acerca del papel de dicho IFN de tipo I en las enfermedades reumáticas. Por un lado, se ha descrito un efecto beneficioso del IFN β en diferentes modelos animales de artritis, siendo capaz de inhibir el desarrollo de la artritis en primates y en el modelo murino de CIA. Un modelo en el que también se ha comprobado que la inyección de fibroblastos que expresan IFN β , produce un descenso de la severidad de la enfermedad y de la destrucción articular (Tak *et al.*, 1999; Triantaphyllopoulos *et al.*, 1999). Asimismo, el tratamiento *in vitro* de los FLS con IFN β reduce la producción de MMP1, MMP3, IL-1 β y TNF α (Smeets *et al.*, 2000). Sin embargo, en los ensayos clínicos en los que se ha examinado el efecto del IFN β en pacientes con AR, a pesar de que se detecta un descenso de los niveles sinoviales de MMP1, IL-6 e IL1, no se ha apreciado una mejoría del proceso patológico (van Holten *et al.*, 2005). Por otra parte, no hay que olvidar que se considera que un exceso en la producción de factores de supervivencia, como son los IFNs de tipo I, contribuiría a la acumulación permanente del infiltrado inflamatorio en las articulaciones afectadas por la sinovitis, habiéndose demostrado que el IFN β altera la supervivencia de las células T, protegiéndolas de la apoptosis (Buckley, 2011; Pilling *et al.*, 1999). Por tanto, el que VIP reduzca la producción de IFN β por los FLS, puede que contribuya a contrarrestar la aportación de los mismos a la cronificación del infiltrado inflamatorio. En relación con estos resultados, el grupo de Radstake ha comprobado que los IFNs de tipo I actúan como reguladores positivos de la expresión y función de TLR3 y TLR7 en las células sinoviales de pacientes con AR, detectando además un aumento de los mediadores proinflamatorios regulados por TLR4. Estos autores proponen que el efecto de los IFN de tipo I sobre TLR3 y TLR7 promueva, de manera indirecta, un incremento de las respuestas mediadas por TLR4, participando así en el mantenimiento de la cascada proinflamatoria (Roelofs *et al.*, 2009). Por tanto, la reducción del IFN β por el VIP se presenta como un efecto inhibitorio sobre la activación de los FLS y, además, como un mecanismo de regulación negativa de TLR4 adicional a los descritos anteriormente.

En cuanto al estudio de la acción de VIP sobre los FLS estimulados con imiquimod, únicamente se observaron cambios significativos en los de AR, en los que disminuye la activación de NF- κ B, AP-1 c-Jun y c-Fos, y desciende la producción de CXCL8 y MMP3. El hecho de que el efecto de VIP se limite a estas células, podría estar relacionado con la expresión diferencial de sus receptores descrita en el **artículo 1**. Puesto que se ha descrito que el imiquimod induce un aumento de la expresión de VPAC2 en macrófagos (Herrera *et al.*, 2009), es posible que el imiquimod también actúe del mismo modo en los FLS, contribuyendo a potenciar su presencia en los aislados de pacientes con AR, en los que representa el receptor funcional mediador de los efectos antiinflamatorios de VIP. Por tanto, al potencial terapéutico de VIP previamente descrito, habría que añadir su papel inhibitorio sobre la producción de IFN β y de mediadores proinflamatorios inducidos tras la activación de los sensores de RNA en los FLS.

A pesar de que se haya demostrado que los PRRs son capaces de inducir la activación de los FLS, sigue sin identificarse la relevancia patogénica de los ligandos, exógenos y endógenos, detectados en el ambiente sinovial de las articulaciones afectadas por procesos reumáticos. De hecho, existen diferentes hipótesis acerca de la etiología de estas enfermedades, siendo nuestros resultados compatibles con las que implican a las infecciones víricas en el inicio de la AR (Espinoza y García-Valladares, 2012). Tal y como se ha señalado anteriormente, en la sinovial reumatoide se ha descrito la presencia dsRNA y ssRNA vírico, potenciales ligandos para TLR3 y RIG-I y para TLR7, respectivamente. Por otra parte, también es posible que dichos sensores de RNA sean activados por ligandos endógenos, liberados por los propios procesos inflamatorios y destructivos articulares. De hecho, no sólo el dsRNA de las células necróticas puede actuar como un ligando endógeno y activar al TLR3 de los FLS de AR, sino que se ha comprobado que también las secuencias de RNA altamente conservadas de las pequeñas partículas nucleares de ribonucleoproteínas (snRNP) son capaces de activar al TLR7, actuando como autoantígenos en la enfermedad del LES (Brentano *et al.*, 2005b; Savarese *et al.*, 2006; Vollmer *et al.*, 2005). De modo que, a la vista de estos datos, puede que los PRRs de los FLS se encuentren sometidos a un bucle de activación permanente, iniciado por el reconocimiento de una molécula de RNA, de origen vírico o endógeno, que induciría la síntesis de mediadores inflamatorios y de destrucción articular. La acción de estos mediadores conllevaría la liberación de moléculas endógenas que podrían actuar como ligandos de dichos receptores.

En conjunto, los datos obtenidos en el **artículo 2** convierten a los sensores de RNA en posibles dianas de intervención terapéutica para contrarrestar la activación de los FLS por los ligandos presentes en el ambiente sinovial. En este sentido, como habíamos descrito previamente, las citocinas proinflamatorias del entorno articular también cumplen un importante papel como elementos capaces de activar y estimular su comportamiento patogénico (Bartok y Firestein, 2010; Neumann *et al.*, 2010).

Actualmente se asume que, aunque con diferente intensidad, existe un componente inflamatorio en el desarrollo de la OA y de la AR. De hecho, en el tratamiento terapéutico de ambas patologías se incluye el uso de agentes biológicos diseñados para bloquear la acción de diversas citocinas (Scanzello y Goldring, 2012; Kapoor *et al.*, 2011; McInnes y Schett, 2011). Sin embargo, la variabilidad en la respuesta a las terapias anti-citocina, ha evidenciado la heterogeneidad de los factores patogénicos que intervienen en estas enfermedades (Scott, 2012). Así, la optimización de estos tratamientos requiere un mayor conocimiento de los efectos que las diferentes citocinas del ambiente articular inflamado ejercen sobre las células residentes. Por su parte, los FLS activados han sido identificados como importantes protagonistas en el mantenimiento de la sinovitis. Por ello, nos propusimos ampliar el estudio de su contribución a la respuesta inflamatoria sinovial y, al mismo tiempo, identificar los mecanismos mediante los que ésta condiciona su comportamiento patogénico. Este análisis debía contemplar, por tanto, las consecuencias funcionales derivadas de la interacción de los FLS con los mediadores presentes en el microambiente articular, así como su capacidad de responder a los mismos y de participar activamente en el contenido en citocinas de dicho entorno.

Aunque clásicamente se ha considerado al TNF α y las interleucinas IL-6 e IL-1 β como citocinas centrales en la respuesta inflamatoria sinovial, en los últimos años son numerosos los mediadores

que también se consideran involucrados en ella, entre los que la IL-22 ha emergido como una interleucina clave en el proceso destructivo articular (Ikeuchi *et al.*, 2005; Geboes *et al.*, 2009). Desde que fuese descrita en el año 2000 por el equipo de Renauld, el estudio de su funcionalidad en diferentes enfermedades inflamatorias ha evidenciado que puede cumplir un papel protector o, por el contrario, actuar como un mediador proinflamatorio (Wolk *et al.*, 2010). Aunque los datos obtenidos hasta la fecha sobre su estudio en pacientes con AR y en modelos animales de la enfermedad, apuntan hacia un papel patogénico de la IL-22, son aún numerosas las cuestiones por resolver en cuanto a la regulación de su actividad local en las articulaciones afectadas por la sinovitis (Ikeuchi *et al.*, 2005; Geboes *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2011; Leipe *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; da Rocha *et al.*, 2012). Así, habiéndose identificado la presencia de IL-22 y de su receptor IL-22R1 en los FLS de pacientes con AR (Ikeuchi *et al.*, 2005), los datos disponibles acerca de su efecto sobre la funcionalidad de los mismos son escasos. Por otra parte, sigue sin determinarse el origen celular concreto de los altos niveles de IL-22 que se encuentran en el suero y el líquido sinovial de pacientes con AR, si bien es cierto que se ha observado un incremento en circulación periférica de células Th productoras de dicha citocina, además de una mayor presencia de células NK-22 en el líquido sinovial (Zhang *et al.*, 2012; Colin *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2011).

En base a estos datos, decidimos caracterizar el sistema de la IL-22 y del IL-22R1 en los FLS de pacientes con AR y en los de OA, para estudiar si su expresión es modulada por los mediadores proinflamatorios que potencialmente aparecen en las articulaciones afectadas. Nuestros resultados, incluidos en el **artículo 3**, confirman la expresión constitutiva de la IL-22 en los FLS de AR y demuestran, por primera vez, la presencia de esta citocina en los de OA. Además, muestran un aumento de su producción en respuesta al tratamiento con la citocina proinflamatoria TNF α o con el ligando del TLR4, LPS.

Aunque los FLS no constituyen células inmunes en su origen, la presencia de PRRs y la producción de citocinas, junto a otras particularidades como es la expresión de moléculas específicas de HLA-DR, demuestran que pueden adquirir algunas de sus características (Zimmermann *et al.*, 2001; Neumann *et al.*, 2010). Por tanto, la expresión de la IL-22 podría interpretarse como uno de los rasgos fenotípicos inmunes adquiridos por los FLS, los cuales contribuirían, de este modo, al contenido en IL-22 del microambiente sinovial. En este sentido, la baja expresión detectada, sugiere que su aportación sea más discreta que la proporcionada por las células Th y NK-22, cuya presencia se ha identificado en el infiltrado inflamatorio y el líquido sinovial de las articulaciones afectadas por la AR. No obstante, deberían realizarse estudios complementarios para determinar la relevancia fisiológica de esta nueva fuente de IL-22 identificada en el tejido sinovial.

La IL-22 ejerce sus efectos biológicos a partir de su unión a un receptor de membrana heterodimérico compuesto por las cadenas IL-22R1 e IL-10R2. La expresión de la primera de las cadenas se encuentra restringida a determinadas células de origen no inmune que se convierten, por tanto, en dianas específicas de dicha citocina (Witte *et al.*, 2010). Los datos que aportamos en el **artículo 3** corroboran la presencia de IL-22R1 en los FLS, previamente descrita por el grupo de Nojima en los de AR y recientemente identificada en los de OA por el equipo de Raychaudhuri (Ikeuchi *et al.*, 2005; Mitra *et al.*, 2012). Además, comprobamos que tras la estimulación con TNF α o con los ligandos de TLR3 y TLR4, se produce un incremento de la expresión de IL-22R1 en los FLS,

aumentando así su capacidad de respuesta a la IL-22. De modo que este efecto de los TLRs apoyaría la hipótesis que implica a los mecanismos de la inmunidad innata en la activación de los FLS (Neumann *et al.*, 2010; Brentano *et al.*, 2009a), tal y como también defendemos en el **artículo 2**. Asimismo, nuestros resultados son compatibles con los obtenidos en estudios previos realizados en queratinocitos y en fibroblastos dérmicos, en los que TNF α e IFN γ inducen un aumento de los transcritos de IL-22R1 (Wolk *et al.*, 2004, 2009).

Nuestro siguiente objetivo fue profundizar en el estudio de la implicación de la IL-22 en la aportación patogénica de los FLS al proceso destructivo articular. La vía de señalización principalmente activada tras la unión de IL-22 a su receptor es la de la JAK/STAT, siendo la fosforilación en tirosina de STAT3 la más común (Ouyang *et al.*, 2011). Tras estimular a los FLS en cultivo con IL-22 observamos que, al igual que ocurre en otros tipos celulares, se produce un aumento de la fosforilación de STAT3, un factor de transcripción implicado en la regulación de la activación, proliferación y diferenciación celular (O'Shea *et al.*, 2005).

En este sentido, cabe señalar que se ha descrito que STAT3 promueve la supervivencia de los FLS y que su activación, junto a la de STAT1, juega un importante papel en la proliferación de dichas células (Yasukawa *et al.*, 2000; Krause *et al.*, 2002). De acuerdo con estos últimos datos y con los publicados por Ikeuchi y colaboradores en 2005, nuestros experimentos muestran que el tratamiento con IL-22 estimula la proliferación de los FLS de AR. Este crecimiento es considerado una de las causas de la hiperplasia patológica de la membrana sinovial, la cual conlleva la degradación del cartílago y el hueso articular sobre los que se expande. Sin embargo, aunque la IL-22 induce un aumento de la síntesis de las enzimas de degradación tisular MMP1 y MMP3 en cultivos primarios de queratinocitos, nuestros resultados revelan que en los FLS únicamente produce un incremento significativo de la síntesis de MMP1 (Wolk *et al.*, 2006).

En la búsqueda de nuevos mecanismos patogénicos que pudieran ser activados en los FLS en respuesta a la IL-22, decidimos estudiar la expresión de las alarminas S100A8 y S100A9 y analizar si eran moduladas por efecto del tratamiento con esta citocina. Tal y como se ha señalado en la introducción, las alarminas S100A8 y S100A9 pueden unirse para formar el heterodímero funcional S100A8/A9, conocido con el nombre de calgranulina o calprotectina (Perera *et al.*, 2010). A pesar haber sido identificadas por primera vez en los macrófagos del infiltrado sinovial reumatoide (Odink *et al.*, 1987), es relativamente reciente el que se consideren mediadores implicados en la inflamación y destrucción articular, habiendo sido principalmente caracterizadas como proteínas antimicrobianas. En los últimos años, diversos trabajos han estudiado su participación en los procesos articulares con los que evolucionan la AR y la OA. Los resultados obtenidos, tanto en la experimentación con modelos animales como en los pacientes de ambas enfermedades, han evidenciado su carácter patogénico, mostrándose implicadas en el proceso inflamatorio y en la degeneración del cartílago articular (van Lent *et al.*, 2008, 2012; Grevers *et al.*, 2011; van den Berg, 2008; Cesareo *et al.*, 2012; Schelbergen *et al.*, 2012).

En los pacientes con AR se ha descrito una elevación de los niveles de S100A8 y S100A9 en el líquido sinovial y el suero, que correlaciona con la severidad y la progresión radiográfica de la enfermedad (Chen *et al.*, 2009; Sunahori *et al.*, 2006; Hammer *et al.*, 2010). Asimismo, una publicación reciente describe que los niveles del heterodímero también se encuentran elevados en el

líquido sinovial y el plasma de pacientes con OA y que, sin llegar a ser significativa, guardan una relación proporcional con la severidad de sus síntomas (van Lent *et al.*, 2012). Aunque los macrófagos sinoviales han sido identificados como las principales células responsables del aumento de los niveles de S100A8 y S1009 en circulación y en el líquido sinovial de los pacientes afectados por dichas enfermedades reumáticas, también se ha detectado su expresión en neutrófilos del líquido sinovial y en condrocitos de pacientes con AR (Sunahori *et al.*, 2006; Zreiqat *et al.*, 2007). No obstante, hasta el momento no se había comprobado si los FLS expresaban dichas alarminas, de modo que los resultados que incluimos en el **artículo 3** constituyen la primera evidencia de su presencia constitutiva en este tipo celular. De hecho, nuestros datos serían compatibles con el aumento de su presencia que se describe en el límite entre el *pannus* y el cartílago articular, ya que este tejido hiperplásico se encuentra constituido principalmente por FLS y MLS (Youssef *et al.*, 1999; Kane *et al.*, 2003). Asimismo, también resultan compatibles con un estudio que analiza la expresión de ambas alarminas en biopsias de tejido sinovial de OA, y que demuestra que existe una correlación entre su nivel de expresión y el grosor de las capas íntima y subíntima sinoviales, siendo los FLS uno de los principales componentes celulares de dichas estructuras (van Lent *et al.*, 2012).

Al analizar el efecto de la IL-22 sobre la expresión de S100A8 y S100A9, observamos que induce un aumento de los transcritos de ambas, al igual que ocurre en queratinocitos (Wolk *et al.*, 2006). Comprobamos que este efecto sobre la expresión génica se correspondía con un incremento de la liberación del dímero S100A8/A9 por los FLS en cultivo. Puesto que los experimentos de estimulación fueron realizados en presencia o ausencia de inhibidores de JAK2 y JAK3, observando que su bloqueo revierte la acción estimuladora de la IL-22, concluimos que ambas moléculas intervienen en las vías de señalización que regulan la expresión de las alarminas. De modo que estos resultados, incluidos en el **artículo 3**, constituyen una nueva evidencia del papel activador de IL-22 sobre las aportaciones patogénicas de los FLS al proceso destructivo articular. Además, demuestran que JAK2/STAT3 es una de las rutas de señalización que emplea la IL-22 en la inducción de S100A8/A9, coincidiendo con la vía señalizadora que Kim y colaboradores habían identificado como responsable del aumento de la síntesis de RANKL por los FLS de AR en respuesta a esta misma citocina (Kim *et al.*, 2012).

En cuanto a los receptores y las cascadas de señalización de las alarminas, aunque siguen sin ser completamente conocidos, ambas proteínas han sido identificadas como activadores endógenos del receptor TLR4 (Vogl *et al.*, 2007; Ehrchen *et al.*, 2009; Schelbergen *et al.*, 2012). Así, este último hecho unido a que hayamos comprobado que la estimulación con LPS, agonista de TLR4, induce un aumento de la expresión de IL-22 y de su receptor en los FLS, sugiere la existencia de un bucle de activación entre la señalización de IL-22 y las alarminas mediado por TLR4, que contribuiría a la cronificación del proceso inflamatorio sinovial.

Por otra parte, con el objetivo de proseguir en el análisis de las interrelaciones que se establecen entre los FLS y la respuesta inflamatoria sinovial, se debe tener en cuenta que junto a la IL-22 aparecen otros mediadores que requieren ser considerados. En este sentido, numerosos autores han atribuido un importante papel patogénico a la IL-17, cuyas acciones locales incluyen una notable capacidad para inducir la síntesis de mediadores proinflamatorios y de destrucción tisular por los FLS (Hot y Miossec, 2011).

Al ser las células Th17 consideradas como la fuente principal de IL-17, se ha sugerido que su intervención sea clave en el establecimiento de la respuesta inflamatoria crónica articular y en el consiguiente daño tisular (Sarkar y Fox, 2010; Hemdan *et al.*, 2010). No obstante, es creciente el número de trabajos que evidencian que el fenotipo Th17 presenta cierta inestabilidad y que existe una plasticidad Th17/Th1 por la que, bajo determinadas condiciones, las células Th17 pueden adquirir rasgos propios de las Th1 (Peck y Melins, 2010; Nistala *et al.*, 2010). De hecho, se ha sugerido que el ambiente sinovial actúe como un nicho funcional determinante en el desarrollo local del fenotipo patogénico de estas células (Dong y Zhu, 2012). Así, los FLS activados podrían contribuir a la diferenciación de las subpoblaciones de células Th, favoreciendo un fenotipo Th1 o Th17, en función de las citocinas que liberen. Al mismo tiempo, los FLS estarían sometidos a la acción de los mediadores del entorno sinovial, entre los que se incluirían tanto la IL-22 como la IL-17 liberadas por las células Th efectoras.

En base a estas últimas ideas y como continuación de nuestra hipótesis sobre el papel de la IL-22 en la activación de los FLS, quisimos examinar si modulaba la capacidad de respuesta a la IL-17 por parte de los FLS. También analizamos si actuaba sobre su producción de IL-23, por ser ésta una citocina implicada en el desarrollo del fenotipo Th17. A partir de los resultados obtenidos, incluidos en el **artículo 3**, nos cuestionamos el efecto que otros estímulos presentes en el ambiente inflamatorio podrían tener sobre los mismos parámetros, dando lugar a la publicación del **artículo 4**. En este último trabajo analizamos la expresión de los receptores de IL-17 y la producción no sólo de IL-23, sino también de IL-12, como citocina principal en la diferenciación hacia Th1, en FLS en cultivo tras su tratamiento con las citocinas IL-17 y TNF α o con los ligandos de TLR3 y TLR4, poly(I-C) y LPS respectivamente.

Estudios previos habían detectado la presencia del receptor de IL-17 en los FLS de OA y AR (Kehlen *et al.*, 2002), siendo identificada la expresión de las subunidades IL17-RA e IL17-RC en los de AR (Hwang y Kim, 2005). Concretamente, en pacientes con AR se había descrito una elevada expresión de los receptores IL-17RA e IL-17RC en células sanguíneas y en los sinoviocitos de las articulaciones afectadas (Zrioual *et al.*, 2008). Puesto que dichos receptores se unen en un complejo que señala los efectos proinflamatorios de IL-17A e IL-17F, isoformas secretadas principalmente por las células Th17, decidimos analizar si la IL-22 y el resto de estímulos mencionados era capaz de modular su expresión en los FLS.

Nuestros resultados confirmaron los datos previos relativos a la presencia de IL-17RA e IL-17RC en los FLS de AR y, además, descubrieron que los de OA también expresaban ambos receptores. Tras el tratamiento con IL-22, se detectó una reducción significativa de la expresión génica de IL-17RC y de su presencia en los FLS de AR, mientras que en los de OA se observó un efecto análogo en el IL-17RA. En la misma línea, los resultados del **artículo 4**, muestran una regulación diferencial de ambas subunidades en respuesta a los ligandos de TLRs y a las citocinas proinflamatorias. Así, tras el tratamiento con TNF α , LPS o poly(I-C) únicamente se observó un incremento en los niveles de mRNA de IL-17RA en los FLS de AR. Por su parte, la expresión génica de IL17-RC aumentó en ambos tipos de FLS tras la estimulación con TNF α , TNF α más IL-17 o poly(I-C). De modo que los datos del efecto de la IL-22 sobre los receptores de IL-17, incluidos en el **artículo 3**, indican que esta citocina ejerce una acción inhibitoria. En cambio, en el **artículo 4**

demostramos, por primera vez, que los ligandos de TLR3 y TLR4 inducen un aumento de la expresión de IL-17RA e IL-17RC y, por tanto, contribuyen a la señalización proinflamatoria de IL-17 en el entorno sinovial. Además, esta modulación de los niveles de mRNA de IL-17RC en los FLS de OA que presentamos en nuestros resultados, evidencian la funcionalidad de la señalización de IL-17 en la OA, avalando la idea de la existencia de un componente inflamatorio en el desarrollo de esta enfermedad. Por último, aunque el efecto estimulador que observamos del TNF α sobre la expresión de los receptores de IL-17 no es el descrito previamente por otros autores (Zrioual *et al.*, 2009), estas discrepancias podrían explicarse por variaciones en las condiciones experimentales fijadas, en términos de dosis y tiempo de estimulación.

En cuanto a la regulación diferencial de la expresión del mRNA de IL-17RA e IL-17RC, es importante considerar los factores de transcripción implicados en su control. Tanto los factores NF- κ B como AP-1 encuentran sitios de unión en el promotor del gen de IL-17RA, mientras que en el de IL-17RC aparecen sitios para AP-1 pero no para NF- κ B. Este hecho unido a que, tal y como describíamos en el **artículo 2**, la estimulación con poly(I-C) induce el paso al núcleo de NF- κ B y AP-1 en los FLS, siendo mayor la activación de NF- κ B en los de AR, explicaría nuestros resultados relativos al aumento de IL-17RA. Asimismo, el que observemos un aumento similar de los niveles de mRNA de IL-17RC en ambos tipos de FLS tras el tratamiento con poly(I-C) concuerda, de nuevo, con los resultados del **artículo 2**, ya que en ellos se demostraba que este ligando inducía una activación similar de AP-1 en OA y AR. Por último, la mayor presencia de TLR4 en los FLS de AR descrita en trabajos previos de nuestro grupo (Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2006), conllevaría un mayor efecto estimulador del LPS sobre IL-17RA en ellos.

Atendiendo al estudio de las citocinas producidas por los FLS implicadas en la polarización de las células Th, tal y como se ha señalado, uno de nuestros primeros objetivos fue estudiar el efecto de la IL-22 sobre la producción de IL-23. Esta citocina, que interviene en el proceso de estabilización y proliferación de las células Th17 en diferenciación, ha emergido como un mediador clave en diferentes procesos autoinmunes, siendo identificada como una diana de intervención terapéutica en el tratamiento de la AR (Miossec y Kolls, 2012; Pope y Shahrara, 2012; Rong *et al.*, 2012). Tras la estimulación de los FLS en cultivo con la IL-22, observamos una reducción significativa de los niveles de mRNA de IL23-p19 en los de AR, así como un descenso en la liberación de IL-23. Estos resultados, incluidos en el **artículo 3**, junto a los del efecto de la IL-22 sobre los receptores de IL-17, sugieren que esta citocina podría articular un sistema de regulación negativa. Así, mediante un efecto inhibitorio sobre la síntesis de IL-23, la IL-22 contrarrestaría los mecanismos necesarios para el mantenimiento y supervivencia de las células Th17, favoreciendo, por consiguiente, el desarrollo de un fenotipo Th1. Esta hipótesis es compatible con los trabajos que postulan que en las articulaciones de los pacientes de AR hay un predominio de células Th1 (Yamada *et al.*, 2008), así como con los que describen un fenotipo intermedio Th17/Th1 (Nistala *et al.*, 2010). Asimismo, puesto que en nuestros experimentos empleamos FLS obtenidos de pacientes sometidos a cirugía de sustitución articular de rodilla, podemos asumir que se trata de muestras derivadas tejidos en etapas avanzadas de la enfermedad. De modo que los datos que aportamos constituirían una prueba adicional del papel atribuido a la IL-22 en la destrucción articular a la que evoluciona la AR tras su desenlace, donde se

ha sugerido que la actividad patogénica del componente IL-17/Th17 tenga una mayor relevancia (van Hamburg *et al.*, 2013).

En resumen, en el **artículo 3** se concluye que tanto los mediadores inflamatorios como los ligandos de PRRs, potencialmente presentes en el ambiente sinovial de las articulaciones afectadas por la AR y la OA, inducen una mayor expresión de la IL-22 y de su receptor en los FLS. Este efecto supone un aumento en su capacidad de respuesta a dicha citocina, la cual actúa sobre los FLS estimulando la producción de MMP1 y de S100A8/A9, mediadores de la inflamación y destrucción articular. Además, hemos corroborado que la IL-22 incrementa la proliferación de los FLS de AR (Ikeuchi *et al.*, 2005), células en las que también regula negativamente la expresión del receptor IL-17RC y la producción de IL-23, interviniendo, de este modo, en sus mecanismos de interacción con las células T del entorno sinovial. Así, el conjunto de nuestros resultados contribuye a la identificación de la IL-22 como una citocina implicada en los procesos patológicos articulares. De modo que las terapias basadas en el bloqueo de su señalización podrían ser beneficiosas en el tratamiento de la AR. Además, el hecho de que el receptor IL-22R1 se exprese exclusivamente en células no linfoides (Witte *et al.*, 2010), permitiría evitar efectos laterales sobre las respuestas del sistema inmune.

A partir de los resultados de este artículo y atendiendo a la controversia que envuelve el estudio del papel relativo de las células Th1 y Th17 en el proceso patogénico articular, quisimos comprobar si los diferentes estímulos estudiados modificaban la expresión tanto de IL-23 como de IL-12. De este modo, podríamos determinar si favorecían la liberación de dichas citocinas y, por tanto, si contribuían a generar un ambiente que promoviese la diferenciación del fenotipo Th17 o Th1, respectivamente. En este sentido, cabe señalar que el hecho de que IL-23 (p19/p40) e IL-12 (p35/p40) compartan la subunidad p40, ha contribuido a dificultar la identificación del papel relativo de ambas citocinas en el proceso patogénico articular, ya que exige que en su análisis se discrimine entre las subunidades específicas. De modo que en los experimentos incluidos en el **artículo 4**, diseñados con el objetivo de estudiar su producción por los FLS, además de medir los niveles liberados de ambas citocinas, también se analizó la expresión génica de las subunidades específicas IL-23p19 e IL-12p35.

Nuestros resultados demuestran que los FLS de OA y AR no presentan diferencias en los niveles basales de mRNA de IL-12p35 ni de IL-12 que secretan. Sin embargo, en los de AR detectamos una mayor expresión del mRNA de IL-23p19 y un aumento en la producción de IL-23 comparado con los de OA. Estos últimos datos van en la misma dirección que los publicados previamente por otros grupos, como los incluidos en un trabajo de Brentano y colaboradores en el que mediante técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica demuestran que la presencia de fibroblastos positivos para p19 es mayor en la sinovial de AR que en la de OA (Kim *et al.*, 2007; Brentano *et al.*, 2009).

A continuación, nos planteamos el estudio del efecto que las citocinas proinflamatorias TNF α e IL-17 tendrían sobre la producción de ambas interleucinas. Observamos que el tratamiento con TNF α aumentaban la producción de IL-12, mientras que la IL-17 inducía una disminución de dicha citocina. Cuando se combinaron ambos estímulos en los cultivos, detectamos una reducción del efecto estimulador de TNF α . Estos resultados podrían interpretarse como una muestra de que la presencia de IL-17 en el ambiente sinovial obstaculiza las respuestas tipo Th1 mediante una reducción de IL-12. En la misma línea, recientemente se ha propuesto que la IL-12 actúe limitando la diferenciación hacia

Th17 mediante la inhibición de diferentes factores de transcripción implicados en la polarización de dicho fenotipo (Vignali y Kuchroo, 2012). En cuanto a la IL-23, de acuerdo con los datos aportados por otros grupos, observamos un aumento de su producción por los FLS de AR en respuesta a TNF α y a IL-17, así como un efecto sinérgico de la combinación de ambos estímulos sobre su liberación (Kim *et al.*, 2007; Zrioual *et al.*, 2009; Goldberg *et al.*, 2009). Nuestros resultados demuestran que estas respuestas se repiten en los FLS de OA. Por tanto, en base a los datos obtenidos, el TNF α y la IL-17 del ambiente sinovial inflamatorio parecen combinarse para mantener unas condiciones que resultan determinantes en la polarización del fenotipo Th1/Th17.

En los ensayos de estimulación también analizamos los efectos de la activación de TLR3, y TLR4 sobre la producción de IL-23 y de IL-12. En ambos casos observamos un aumento de la síntesis de dichas interleucinas. La inducción de la IL-12 tras el tratamiento con poly(I-C), demuestra que la activación de TLR3 en los FLS provoca el mismo tipo de respuesta que en DCs derivadas de monocitos de pacientes con AR o de individuos sanos (Roelofs *et al.*, 2005). Asimismo, de acuerdo con nuestras observaciones, Brentano y colaboradores ya habían descrito un aumento del nivel de mRNA de IL-23p19 en FLS de AR tras la estimulación de TLR3 y TLR4, siendo mayor el efecto inducido por poly(I-C) (Brentano *et al.*, 2009). Sin embargo, en ese mismo trabajo se describía que dichas células no producían IL-23 bioactiva. Esta última conclusión la obtenían a partir de medidas indirectas utilizando el sobrenadante de cultivos de FLS en un complejo diseño experimental que podría ser cuestionado. Por ello, consideramos que nuestros resultados sobre la producción de IL-23 y de IL-12 por los FLS tienen valor funcional en la caracterización del comportamiento patogénico con el que estas células participan en el establecimiento y desarrollo de la AR y de la OA.

Los datos que presentamos relativos a la activación de los TLRs muestran una clara correlación con los obtenidos por otros autores en diferentes modelos animales de artritis. Así, en ratones mutantes que carecen de TLR4 se ha detectado una reducción de los niveles de IL-1 β , TNF α , IL-6 e IL-23, siendo factores implicados en la diferenciación del fenotipo Th17 y, por tanto, en la producción de IL-17 (Abdollahi-Roodsaz *et al.*, 2007). En el modelo murino de CIA, se describe una menor producción de IL-17 en ratones que no expresan TLR4, en los que también se observa un descenso en los niveles de IL-12 cuando éstos se encuentran en fases avanzadas de la enfermedad (Pierer *et al.*, 2011). De modo que en conjunto, tanto los estudios citados como los resultados que presentamos en los **artículos 2, 3 y 4**, evidencian la participación de los TLR en la activación patogénica de las respuestas inmune innata y adaptiva a nivel articular.

Por último, evaluamos el efecto de VIP sobre la expresión de los receptores de IL-17 y de las citocinas IL-12 e IL-23, para así ampliar su caracterización como péptido modulador de las actividades inmunes de los FLS.

VIP induce una disminución exclusiva de la expresión génica de IL-17RA en FLS de AR aumentada tras el tratamiento con TNF α o poly(I-C). Además, en presencia de VIP también observamos una reducción de los niveles de IL-23 incrementados por IL-17, sola o combinada con TNF α , así como un descenso de la producción de IL-12 e IL-23 estimulada tras el tratamiento con TNF α , LPS o poly(I-C). En cuanto a la acción de VIP sobre el aumento en la expresión de IL-12 e IL-23 tras la activación de TLR3 y TLR4, cabe señalar que se ajusta a lo observado en estudios previos de nuestro grupo, entre los que se incluye el **artículo 2**, en los que dicho neuropéptido se comportaba

como un modulador negativo de la señalización desencadenada por ambos receptores (Juarranz *et al.*, 2004; Gutiérrez-Cañas *et al.*, 2006).

Por tanto, la información aportada en el **artículo 4**, en la que mostramos que tanto citocinas proinflamatorias como ligandos de TLR modifican la expresión de receptores de IL-17 y de las interleucinas IL-12 e IL-23, evidencia el potencial de los FLS para contribuir al entorno inflamatorio sinovial en respuesta a las condiciones del mismo. Además, la caracterización de su respuesta bajo la acción de los diferentes mediadores, sugiere su participación activa en la interacción con las células Th17 y Th1 y en el ambiente en el que éstas se diferencian. En cuanto al VIP, hemos demostrado su capacidad para revertir la acción estimuladora de las diferentes moléculas proinflamatorias tanto sobre los receptores de IL-17 como sobre IL-12 e IL-23, corroborando y ampliando los efectos beneficiosos que dicho neuroinmunopéptido endógeno presenta en las enfermedades reumáticas.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. El neuroinmunopéptido VIP y sus receptores VPAC1 y VPAC2 se expresan diferencialmente en los sinoviocitos fibroblásticos de artrosis y artritis reumatoide. En artritis se detecta una menor producción de VIP y un predominio del receptor VPAC2, mientras que en artrosis el receptor de mayor expresión es VPAC1.
2. El estímulo inflamatorio del TNF α induce en los sinoviocitos de artrosis un fenotipo similar al de artritis, al reducir la expresión de VIP y del receptor VPAC1, mientras que aumenta la del VPAC2.
3. Los sinoviocitos de ambas patologías presentan un patrón de expresión diferencial de los PRRs responsables de la detección de dsRNA (TLR3, RIG-I y MDA5) y de ssRNA (TLR7). En artritis reumatoide predominan TLR3 y RIG-I, mientras que TLR7 y MDA5 están más expresados en artrosis. La expresión génica de estos receptores aumenta tras la estimulación con ligandos sintéticos de tipo dsRNA y ssRNA,
4. La activación de los sensores de RNA de estos sinoviocitos amplifica su potencial patogénico, al inducir la translocación al núcleo de los factores de transcripción NF- κ B p65, AP-1 (c-Jun, c-Fos) e IRF3, así como un subsiguiente incremento de mediadores implicados en la inflamación y destrucción articular, como CXCL8, MMP3 e IFN β .
5. VIP actúa como un regulador negativo de la actividad de los sensores de RNA en los sinoviocitos, ya que inhibe la translocación al núcleo de los factores de transcripción mencionados e induce un descenso de la producción de IFN β y de mediadores proinflamatorios.
6. IL-22 y su receptor IL-22R1 se expresan constitutivamente en los sinoviocitos de ambas patologías, experimentando un incremento de su expresión tras la estimulación con mediadores inflamatorios y ligandos de PRRs.
7. IL-22 estimula la aportación patogénica de los sinoviocitos al proceso destructivo articular, al inducir un incremento de mediadores de la inflamación y destrucción articular, como MMP1 y alarminas S100A8/A9.
8. Los sinoviocitos de artrosis y de artritis reumatoide expresan constitutivamente IL-17RA e IL-17RC, presentando una regulación de su expresión en respuesta a estímulos proinflamatorios.
9. Los sinoviocitos de ambas patologías producen IL-12 e IL-23, siendo mayores los niveles de IL-23 en artritis. La presencia de TNF α y de ligandos de TLRs induce un aumento de la producción de ambas citocinas.
10. VIP revierte la acción estimuladora de diferentes mediadores proinflamatorios sobre la expresión de los receptores de IL-17 y de las interleucinas IL-12 e IL-23 en los sinoviocitos de ambas patologías.

Abstract

SYNOVIAL FIBROBLAST CONTRIBUTION TO THE ARTICULAR IMMUNE RESPONSE IN RHEUMATOID ARTHRITIS AND OSTEOARTHRITIS. STUDY OF THE MODULATORY EFFECT OF VIP.

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (**RA**) and osteoarthritis (**OA**) are two rheumatic diseases of unknown aetiology and poorly understood pathogenesis, with a wide distribution among human population. Development of both pathologies is associated with a chronic **inflammatory response** localized in the **synovium** of diarthrodial joints, leading to progressive destruction of articular cartilage and bone that results in a functional impairment (Bartok and Firestein, 2010; Kapoor *et al.*, 2011).

Fibroblast-like synoviocytes (**FLS**), an abundant resident cell type in human synovial tissue, play a crucial role in the pathogenesis of synovitis in rheumatic diseases because of their ability to produce a variety of cytokines, chemokines, and matrix-degrading enzymes involved in joint inflammation and destruction (Bottini and Firestein, 2013). This pathogenic behavior is activated and enhanced in response to multiple pathways, including pro-inflammatory factors and Toll-like receptor (TLR) agonists (Neumann *et al.*, 2010).

Thus, the potential triggers of **FLS activation** include not only inflammatory mediators produced by cells of the synovial infiltrate, but also infectious agents and by-products of tissue breakdown that are ligands for pattern recognition receptors (**PRRs**) of the innate immune system. The role of PRRs in joint inflammation and destruction was shown by the demonstration of functionally active TLR2, TLR3, and TLR4 on FLS (Ospelt *et al.*, 2008). However the crucial ligands for the PRRs engagement in rheumatic diseases have not been identified and both potential **exogenous stimuli**, such as bacteria or viruses, or **endogenous ligands**, such as RNA from necrotic cells or fibrinogen fragments, have been found in the joints of OA and RA patients (Takahashi *et al.*, 1998; Brentano *et al.*, 2005, 2009).

In turn, activated FLS further enhance the inflammatory cycle by producing inflammatory factors themselves and catabolic mediators that exacerbate joint destruction, creating a positive feedback loop. In this sense, the role of activated synovial T cells has attracted considerable attention because of their contribution to **cytokine** networks and due to the functional consequences of their interaction with FLS, establishing a reciprocal cellular cross-talk (Dong and Zhu, 2012; Nistala *et al.*, 2010).

VIP is a peptide shared by the **neuroendocrine-immune network** that modulates innate and adaptive immunity through binding to its G-protein coupled specific receptors **VPAC1** and **VPAC2**. In recent years it has emerged as a potential candidate for treatment of inflammatory and autoimmune diseases (Harmar *et al.*, 2012; Gomariz *et al.*, 2010). Since VIP was described as a beneficial endogenous mediator in collagen-induced arthritis (CIA) (Delgado *et al.*, 2001; Juarranz *et al.*, 2005), intense interest has been focused on translational research in humans. According to previous studies, VIP modulates different proinflammatory pathways *ex vivo* in human RA synovial cells (Juarranz *et al.*, 2004, 2006; Gutiérrez-Cañás *et al.*, 2006). Specifically, we have previously described that **VIP antiinflammatory signaling** is functional in human FLS wherein it exerts an **immunomodulatory action** on TLR2 and TLR4 by acting as a negative regulator of their expression and function (Arranz *et al.*, 2008). Besides, the detection of several neuropeptides, including VIP, in human arthritic joints

suggests that endogenous VIP might play a regulatory role in response to joint inflammation (Cutolo *et al.*, 2007).

OBJECTIVES

Given that FLS contribute to the synovitis through both the innate and acquired immunity pathways, in the present thesis our aims were:

- to expand the knowledge of the innate mechanisms and proinflammatory cytokines that govern FLS activation.
- to analyze the cross-talk between FLS and infiltrating T helper cells, in a way that cytokines released by synoviocytes possibly take part in the activation of pathogenic Th cells which, at the same time, liberate mediators that could affect FLS immune activity.
- to study the potential immunoregulatory capacity of VIP to counterbalance the activation of FLS by pro-inflammatory mediators.

RESEARCH CONTENT

Our first objective was to determine the **expression and regulation of VIP and its functional receptors** in FLS. For this purpose we established fibroblast cultures by explant growth from synovial membrane samples obtained from OA and RA patients undergoing total knee joint replacement. VIP expression was detected at the messenger RNA and protein levels, and it was significantly decreased in RA-FLS compared with OA. VPAC1 was the dominant receptor in OA-FLS, whereas VPAC2 was it RA-FLS. Tumour necrosis factor- α (TNF α) treated OA-FLS reproduced the VIP and VPAC receptor expression pattern of RA-FLS. The antagonistic effects of VIP on CXCL8 and IL-6 production by FLS were reproduced by VPAC1- and VPAC2-specific agonists in OA-FLS and RA-FLS, respectively.

The next aim was to examine both the **expression and function of RNA sensors** in FLS in order to identify new innate immune pathways involved in their activation and to test whether VIP was able to exert its immunomodulatory action on those PRRs.

We initially studied the constitutive expression of the membrane receptors TLR3 (dsRNA receptor) and TLR7 (single stranded RNA (ssRNA) receptor) on cultured FLS and also the presence of cytosolic RIG-I and MDA5 (dsRNA receptors). We observed TLR3 and RIG-I are overexpressed in RA-FLS, whereas TLR7 and MDA5 are the predominant in OA-FLS. In order to mimic the action of RNAs present in the joint, we examined the effect of the synthetic analogue of dsRNA poly(I-C) and synthetic ssRNA (Imiquimod) on these receptors signalling. Poly(I-C) induced the activation of IRF3, NF- κ B and AP-1 cJun and the subsequent production of IFN β , CXCL8 and MMP3. Imiquimod induced the activation of NF- κ B, AP-1 c-Fos, AP-1 c-Jun and the synthesis of CXCL8 and MMP3.

Then we examined whether the potential immunoregulatory role of VIP could be mediated by its effect on nuclear translocation of these transcription factors. VIP significantly diminished poly(I-C) activation of IRF3 and the production of IFN β in both FLS, whereas its effect on Imiquimod-treated synoviocytes was limited to RA, resulting in a reduced activation of NF κ B, AP-1 c-Jun and AP-1 c-Fos, and a decrease in CXCL8 and MMP3 production.



Therefore, the data obtained in our experiments show a prominent function of both dsRNA and ssRNA sensors in the activation of FLS and also allow to advance in the healing function of the endogenous neuroimmunopeptide VIP, showing its inhibitory effect on TLR3, RIG-I, MDA5 and TLR7-mediated stimulation of antiviral, pro-inflammatory and joint destruction mediators.

Since inflammatory mediators play a fundamental role in the maintenance of the destructive phenotype of FLS we further analyze whether the microenvironment of inflamed joints modify their capacity to respond to immune signalling and also if it affects their contribution to synovial inflammation.

Recent studies suggest a correlation between IL-22 and arthritis. Although IL-22 and its receptor have been identified in the synovial of RA patients, the precise involvement of this cytokine in the disease physiopathology remains to be established (Wolk *et al.*, 2010; Ikeuchi *et al.*, 2005). Our aim was to investigate whether mediators present in inflamed synovium could modulate the expression of **IL-22 and IL-22R1** on human OA- and RA-FLS. Besides, we examined the IL-22 effect on FLS mediated joint destruction as well as on their IL-17 related responses by analyzing expression of IL-17 receptors (IL-17RA and IL-17RC) and IL-23.

We described that IL-22 and IL-22R1 were expressed constitutively in FLS and that proinflammatory cytokines and TLR ligands increased the expression of this axis. In our search for pathological mechanisms activated by IL-22 in FLS, we decided to study the constitutive expression and IL-22-modulation of S100A8 and S100A9 alarmins, recently considered as markers of destructive processes in the joint. We demonstrated, for the first time, that both are synthesized in FLS. Moreover, our results revealed that IL-22 leads to the up-regulation of S100A8/A9 and MMP1 production together with the enhancement of FLS proliferation. We reported that IL-22 stimulatory effect on S100A8/A9 expression was mediated by JAK2 and JAK3 signalling pathways. Besides, we showed an inhibitory action of IL-22 on IL-23 and IL-17RC expression in RA-FLS as well as on IL-17RA in OA-FLS.

Hence, therapies based on the pharmacological disruption signalling of IL-22 could be beneficial for the treatment of rheumatic diseases. It is also of interest that the restricted expression of IL-22R1 to non-lymphoid cells, could lead to a reduction of side effects mediated by immune responses.

Once the results from IL-22 research were obtained and attending the controversy surrounding the prominence of Th1 or Th17 cells in rheumatoid synovium, we study the effect of mediators present in the joint such as TLR3 and TLR4 ligands [poly(I-C) and lipopolysaccharide (LPS), respectively), TNF α or IL-17 on the expression of **IL-17 receptors** as well as on the **production of IL-12 and IL-23**, involved in the facilitation of Th1 and Th17 differentiation respectively. Our results shown that TNF α , LPS and poly(I-C) induced an increase of IL-17RA in RA-FLS, whereas TNF α , TNF α plus IL-17 and poly(I-C) enhanced IL-17RC transcripts in FLS. Regarding IL-12 and IL-23 production, both were increased after FLS stimulation with TNF α , LPS or poly(I-C). However, IL-17A treatment decreased IL-12 levels and augmented IL-23 synthesis.

Finally, we examined the potential role of VIP to counterbalance the enhancing effect of proinflammatory molecules on IL-17 receptors and IL-12 family of cytokines. VIP diminished the TNF α and poly(I-C) up-regulated expression of IL-17RA in RA-FLS and reduced IL-12p35 mRNA up-regulated by poly(I-C) and IL-23p19 transcripts in LPS treated FLS.

In summary, our results demonstrated that inflammatory cytokines and TLR ligands modulate IL-17 receptors, IL-12 and IL-23 what could be favouring the cross-talk between FLS and Th1/Th17 cells. Moreover, data confirm and amplify to IL-17 receptors and IL-12 family of cytokines the beneficial effect of the endogenous neuroimmunopeptide VIP in rheumatic diseases.

CONCLUSIONS

1. VIP is expressed in human FLS, with a minor presence in RA-FLS compared with OA. VIP receptors also differ in their pattern of expression, as VPAC1 is the dominant receptor in OA-FLS, whereas VPAC2 is overexpressed in RA.
2. OA-FLS treated with TNF- α reproduced the VIP and VPAC receptor expression pattern of RA-FLS. Thus, VIP is down-regulated in a chronic inflammatory condition or after exposure to a proinflammatory cytokine. A shift of VIP receptors pattern is also observed in the context of inflammation.
3. FLS express constitutively both dsRNA and ssRNA sensors with a differential pattern of distribution, TLR3 and RIG-I are overexpressed in RA-FLS whereas TLR7 and MDA5 predominate in OA-FLS.
4. VIP exerts an inhibitory action on nuclear translocation of transcription factors activated upon TLR3, RIG-I, MDA5 and TLR7 engagement that corresponds with a reduction of antiviral, proinflammatory and joint destruction mediators regulated by these PRRs.
5. IL-22 and IL-22R1 are expressed constitutively in FLS. Inflammatory mediators and TLR ligands increased the expression of this axis.
6. IL-22 stimulates FLS mediated joint destruction by the up-regulation of S100A8/A9 and MMP1 production together with the enhancement of their proliferation. IL-22 shows an inhibitory action on the IL-17R/IL-23 axis wherein it down-regulates IL-23 and IL-17RC expression in RA-FLS, and reduces transcript levels of IL-17RA in OA-FLS.
7. Inflammatory cytokines (TNF α or IL-17) and TLR agonists (LPS and poly(I-C)) modulate IL-17 receptors, IL-12 and IL-23 expression in FLS, what could be favouring the cross-talk between FLS and Th1/Th17 cells.
8. VIP capacity to counteract the enhancing effect of proinflammatory molecules on IL-17 receptors and IL-12 family of cytokines corroborates and amplifies the beneficial effect of this endogenous neuroimmunopeptide in rheumatic diseases.

**BIBLIOGRAPHY**

- Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M, Juarranz Y, Pablos JL, Martínez C, Gomariz RP (2008) VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts *Mol Immunol* 45: 3065-3073.
- Bartok B, Firestein GS (2010) Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis *Immunol Rev* 233(1):233-255.
- Bottini N, Firestein GS (2013) Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors *Nat Rev Rheumatol* 9(1):24-33.
- Brentano F, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S, Kyburz D (2009b) Abundant expression of the interleukin (IL)23 subunit p19, but low levels of bioactive IL23 in the rheumatoid synovium: differential expression and Toll-like receptor-(TLR) dependent regulation of the IL23 subunits, p19 and p40, in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 68(1):143-150.
- Brentano F, Schorr O, Gay RE, Gay S, Kyburz D (2005b) RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3 *Arthritis Rheum* 52(9):2656-2665.
- Cutolo M, Straub RH, Bijlsma JW (2007) Neuroendocrine-immune interactions in synovitis *Nat Clin Pract Rheumatol* 3(11):627-634.
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP (2001) Vasoactiveintestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease *Nat Med* 7:563-8.
- Dong W, Zhu P (2012) Functional niche of inflamed synovium for Th17-cell expansion and activation in rheumatoid arthritis: Implication to clinical therapeutics *Autoimmun Rev* 11(12):844-851.
- Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, Arranz A, Carrión M, Juarranz Y, Leceta J, Martínez C (2010) Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics *Curr Pharm Des* 16(9):1063-1080.
- Gutiérrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martinez C, Galindo M, Paya M, Gomariz RP, Pablos JL (2006) VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts *Rheumatology (Oxford)* 45, 527-532.
- Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, Vaudry D, Vaudry H, Waschek JA, Said SI (2012) Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1 *Br J Pharmacol* 166(1):4-17.
- Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y (2005) Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine *Arthritis Rheum* 52(4):1037-1046.
- Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutiérrez-Canas I, Palao G, Galindo M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Pablos JL, Gomariz RP (2004) Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells *Rheumatology (Oxford)* 43, 416-422.
- Juarranz Y, Abad C, Martinez C, Arranz A, Gutiérrez-Canas I, Rosignoli F, Gomariz RP, Leceta J (2005) Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 7, R1034-1045.
- Juarranz Y, Gutiérrez-Canas I, Arranz A, Martinez C, Abad C, Leceta J, Pablos JL, Gomariz RP (2006) VIP decreases TLR4 expression induced by LPS and TNF-alpha treatment in human synovial fibroblasts *Ann N Y Acad Sci* 1070, 359-364.
- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis *Nat Rev Rheumatol* 7(1):33-42.
- Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U (2010) Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts *Trends Mol Med* 16(10):458-468.

- Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W, Evans JG, Cimaz R, Bajaj-Elliott M, Wedderburn LR (2010) Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33):14751-14756.
- Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP, Gay RE, Gay S, Kyburz D (2008) 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* 58(12):3684-3692.
- Takahashi Y, Murai C, Ishii T, Sugamura K, Sasaki T (1998) Human parvovirus B19 in rheumatoid arthritis *Int Rev Immunol* 17(5-6):309-321.
- Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R (2010) Biology of interleukin-22 *Semin Immunopathol* 32(1):17-31.

Bibliografía

- Abad C, Martinez C, Juarranz MG, Arranz A, Leceta J, Delgado M, Gomariz RP (2003) Therapeutic effects of vasoactive intestinal peptide in the trinitrobenzene sulfonic acid model of Crohn's disease *Gastroenterology* 124: 961-971.
- Abad C, Tan YV, Lopez R, Nobuta H, Dong H, Phan P, Feng JM, Campagnoni AT, Waschek JA (2010) Vasoactive intestinal peptide loss leads to impaired CNS parenchymal T-cell infiltration and resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(45):19555-195560.
- Abad C, Tan YV, Cheung-Lau G, Nobuta H, Waschek JA (2012) VIP deficient mice exhibit resistance to lipopolysaccharide induced endotoxemia with an intrinsic defect in proinflammatory cellular responses *PLoS One* 7(5):e36922.
- Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Roelofs MF, Radstake TR, Matera G, Popa C, van der Meer JW, Netea MG, van den Berg WB (2007) Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis *Arthritis Rheum* 56: 2957-2967
- Absood A, Hu B, Bassily N, Colletti L (2008) VIP inhibits human HepG2 cell proliferation in vitro *Regul Pept* 146(1-3):285-292.
- Adamou JE, Aiyar N, Van Horn S, Elshourbagy NA (1995) Cloning and functional characterization of the human vasoactive intestinal peptide (VIP)-2 receptor *Biochem Biophys Res Commun* 209, 385-392.
- Agarwal SK, Brenner MB (2006) Role of adhesion molecules in synovial inflammation *Curr Opin Rheumatol* 18(3):268-276.
- Ahren B, Alumets J, Ericsson M, Fahrenkrug J, Fahrenkrug L, Hakanson R, Hedner P, Loren I, Melander A, Rerup C, Sundler F (1980) VIP occurs in intrathyroidal nerves and stimulates thyroid hormone secretion *Nature* 287, 343-345.
- Aikawa Y, Morimoto K, Yamamoto T, Chaki H, Hashiramoto A, Narita H, Hirono S, Shiozawa S (2008) Treatment of arthritis with a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1 *Nat Biotechnol* 26(7):817-823.
- Akesson L, Ahrén B, Edgren G, Degerman E (2005) VPAC2-R mediates the lipolytic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide in primary rat adipocytes *Endocrinology* 146(2):744-750.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006) Pathogen recognition and innate immunity *Cell* 124(4):783-801.
- Alaaeddine N, DiBattista JA, Pelletier JP, Cloutier JM, Kiansa K, Dupuis M, Martel-Pelletier J. (1997) Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha *J Rheumatol* 24(10):1985-1994.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, Birnbaum NS, Burmester GR, Bykerk VP, Cohen MD, Combe B, Costenbader KH, Dougados M, Emery P, Ferraccioli G, Hazes JM, Hobbs K, Huizinga TW, Kavanaugh A, Kay J, Kvien TK, Laing T, Mease P, Ménard HA, Moreland LW, Naden RL, Pincus T, Smolen JS, Stanislawski-Biernat E, Symmons D, Tak PP, Upchurch KS, Vencovsky J, Wolfe F, Hawker G (2010) 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative *Ann Rheum Dis* 69(9):1580-1588.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell R A (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3 *Nature* 413, 732-738.
- Anunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, Parente E, Fili L, Ferri S, Frosali F, Giudici F, Romagnani P, Parronchi P, Tonelli F, Maggi E, Romagnani S (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells *J Exp Med* 204(8):1849-1861.
- Ao X, Fang F, Xu F (2011) Vasoactive intestinal peptide protects alveolar epithelial cells against hyperoxia via promoting the activation of STAT3 *Regul Pept* 168(1-3):1-4.
- Arend WP, Firestein GS (2012) Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis *Nat Rev Rheumatol* 8(10):573-586.
- Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, Carrión M, Juarranz Y, Pablos JL, Martínez C, Gomariz RP (2008) VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts *Mol Immunol* 45: 3065-3073.

- Asahara H, Fujisawa K, Kobata T, Hasunuma T, Maeda T, Asanuma M, Ogawa N, Inoue H, Sumida T, Nishioka K (1997) Direct evidence of high DNA binding activity of transcription factor AP-1 in rheumatoid arthritis synovium *Arthritis Rheum* 40(5):912-918.
- Ashraf S, Mapp PI, Walsh DA (2011) Contributions of angiogenesis to inflammation, joint damage, and pain in a rat model of osteoarthritis *Arthritis Rheum* 63(9):2700-2710.
- Athanasou NA, Quinn J, Heryet A, Puddle B, Woods CG, McGee JO (1988) The immunohistology of synovial lining cells in normal and inflamed synovium *J Pathol* 155(2):133-142.
- Attur M, Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson SB (2010) Targeting the synovial tissue for treating osteoarthritis (OA): where is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24(1):71-79.
- Aupperle K, Bennett B, Han Z, Boyle D, Manning A, Firestein G (2001) NF-kappa B regulation by I kappa B kinase-2 in rheumatoid arthritis synoviocytes *J Immunol* 166(4):2705-2711.
- Ayral X, Pickering EH, Woodworth TG, Mackillop N, Dougados M (2005) Synovitis: a potential predictive factor of structural progression of medial tibiofemoral knee osteoarthritis -- results of a 1 year longitudinal arthroscopic study in 422 patients *Osteoarthritis Cartilage* 13(5):361-367.
- Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN (2007) TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity *Nat Med* 13(5):543-551.
- Baccala R, Gonzalez-Quintal R, Lawson BR, Stern ME, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN (2009) Sensors of the innate immune system: their mode of action *Nat Rev Rheumatol* 5(8):448-456.
- Bajo AM, Juarranz MG, Valenzuela P, Martinez P, Prieto JC, Guijarro LG (2000) Expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human uterus *Peptides* 21, 1383-1388.
- Ballestar E (2011) Epigenetic alterations in autoimmune rheumatic diseases *Nat Rev Rheumatol* 7(5):263-271.
- Bang SY, Lee KH, Cho SK, Lee HS, Lee KW, Bae SC (2010) Smoking increases rheumatoid arthritis susceptibility in individuals carrying the HLA-DRB1 shared epitope, regardless of rheumatoid factor or anti-cyclic citrullinated peptide antibody status *Arthritis Rheum* 62(2):369-377.
- Barrat FJ, Meeker T, Gregori J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, Coffman, RL (2005) Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus *J Exp Med* 202, 1131-1139.
- Bartok B, Firestein GS (2010) Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis *Immunol Rev* 233(1):233-255.
- Barwell J, Gingell JJ, Watkins HA, Archbold JK, Poyner DR, Hay DL (2012) Calcitonin and calcitonin receptor-like receptors: common themes with family B GPCRs? *Br J Pharmacol* 166:51-65.
- Basille M, Vaudry D, Coulouarn Y, Jegou S, Lihmann I, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2000) Distribution of PACAP receptor mRNAs and PACAP binding sites in the rat brain during development *Ann N Y Acad Sci* 921, 304-307.
- Bataille D, Freychet P, Rosselin G (1974) Interactions of glucagon, gut glucagon, vasoactive intestinal polypeptide and secretin with liver and fat cell plasma membranes binding to specific sites and stimulation of adenylate cyclase *Endocrinology* 95, 713-721.
- Bax M, van Heemst J, Huizinga TW, Toes RE (2011) Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics* 63(8):459-466.
- Beg AA (2002) Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses *Trends Immunol* 23, 509-512.
- Beinfeld MC, Korchak DM, Roth BL, O'Donohue TL (1984) The distribution and chromatographic characterization of PHI (peptide histidine isoleucine amide)-27-like peptides in rat and porcine brain *J Neurosci* 4, 2681-2688.
- Bell JK, Askins J, Hall PR, Davies DR, Segal DM (2006) The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3 *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(23):8792-8797.
- Benito MJ, Murphy E, Murphy EP, van den Berg WB, FitzGerald O, Bresnihan B (2004) Increased synovial tissue NF-kappa B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 50(6):1781-1787.

- Besedovsky HO, del Rey A (1996) Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses *Endocr Rev* 17(1):64-102.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells *Nature* 441: 235-238
- Birmachu W, Gleason RM, Bulbulian BJ, Riter CL, Vasilakos JP, Lipson KE, Nikolsky Y (2007) Transcriptional networks in plasmacytoid dendritic cells stimulated with synthetic TLR 7 agonists *BMC Immunol* 12:8:26.
- Black PH (2002) Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation *Brain Behav Immun* 16(6):622-653.
- Blasius AL, Beutler B (2010) Intracellular toll-like receptors *Immunity* 32(3):305-315
- Bloom SR, Christofides ND, Delamarter J, Buell G, Kawashima E, Polak JM (1983) Diarrhoea in vipoma patients associated with cosecretion of a second active peptide (peptide histidine isoleucine) explained by single coding gene *Lancet* 2(8360):1163-1165.
- Bockaert J, Perroy J, Bécamel C, Marin P, Fagni L (2010) GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:89-109.
- Bodner M, Fridkin M, Gozes I (1985) Coding sequences for vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3548-3551.
- Boilard E, Nigrovic PA, Larabee K, Watts GF, Coblyn JS, Weinblatt ME, Massarotti EM, Remold-O'Donnell E, Farndale RW, Ware J, Lee DM (2010) Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production *Science* 327(5965):580-583.
- Boissier MC, Semerano L, Challal S, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G (2012) Rheumatoid arthritis: from autoimmunity to synovitis and joint destruction *J Autoimmun* 39(3):222-228.
- Bokarewa M, Tarkowski A, Lind M, Dahlberg L, Magnusson M (2008) Arthritogenic dsRNA is present in synovial fluid from rheumatoid arthritis patients with an erosive disease course *Eur J Immunol* 38(11):3237-3244.
- Bottini N, Firestein GS (2013) Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors *Nat Rev Rheumatol* 9(1):24-33.
- Boule MW, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR (2004) Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes *J Exp Med* 199, 1631-1640.
- Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM (2000) Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling *Am J Respir Crit Care Med* 161(5):1720-1745.
- Brabet P, Diriong S, Journot L, Bockaert J, Taviaux S (1996) Localization of the human pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor (PACAP1-R) gene to 7p15-p14 by fluorescence in situ hybridization *Genomics* 38, 100-102.
- Bradfield PF, Amft N, Vernon-Wilson E, Exley AE, Parsonage G, Rainger GE, Nash GB, Thomas AM, Simmons DL, Salmon M, Buckley CD (2003) Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue *Arthritis Rheum* 48(9):2472-2482.
- Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diepolder H, Marquardt A, Jagla W, Popp A, Leclair S, Herrmann K, Seiderer J, Ochsenkühn T, Göke B, Auernhammer CJ, Dambacher J (2006) IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(4):G827-838.
- Braun T, Zwerina J (2011) Positive regulators of osteoclastogenesis and bone resorption in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 13(4):235.
- Brennan FM, McInnes IB (2008) Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis *J Clin Invest* 118(11):3537-3545.
- Brenneman DE, Eiden LE (1986) Vasoactive intestinal peptide and electrical activity influence neuronal survival *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1159-1162.
- Brentano F, Kyburz D, Schorr O, Gay R, Gay S (2005a) The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis *Cell Immunol* 233(2):90-96.

- Brentano F, Schorr O, Gay RE, Gay S, Kyburz D (2005b) RNA released from necrotic synovial fluid cells activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via Toll-like receptor 3 *Arthritis Rheum* 52(9):2656-2665.
- Brentano F, Kyburz D, Gay S (2009a) Toll-like receptors and rheumatoid arthritis *Methods Mol Biol* 517:329-343.
- Brentano F, Ospelt C, Stanczyk J, Gay RE, Gay S, Kyburz D (2009b) Abundant expression of the interleukin (IL)23 subunit p19, but low levels of bioactive IL23 in the rheumatoid synovium: differential expression and Toll-like receptor-(TLR) dependent regulation of the IL23 subunits, p19 and p40, in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 68(1):143-150.
- Brown KD, Claudio E, Siebenlist U (2008) The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 10(4):212.
- Brum JM, Bove AA, Sufan Q, Reilly W, Go VL (1986) Action and localization of vasoactive intestinal peptide in the coronary circulation: evidence for nonadrenergic, noncholinergic coronary regulation *J Am Coll Cardiol* 7(2):406-13.
- Buckley CD (2011) Why does chronic inflammation persist: An unexpected role for fibroblasts *Immunol Lett* 138(1):12-14.
- Buckley CD, Amft N, Bradfield PF, Pilling D, Ross E, Arenzana-Seisdedos F, Amara A, Curnow SJ, Lord JM, Scheel-Toellner D, Salmon M (2000) Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium *J Immunol* 165(6):3423-3429.
- Burrage PS, Brinckerhoff CE (2007) Molecular targets in osteoarthritis: metalloproteinases and their inhibitors *Curr Drug Targets* 8(2):293-303.
- Busto R, Carrero I, Guijarro LG, Solano RM, Zapatero J, Noguerales F, Prieto JC (1999) Expression, pharmacological, and functional evidence for PACAP/VIP receptors in human lung *Am J Physiol* 277, L42-48.
- Busto R, Carrero I, Bodega G, Zapatero J, Prieto JC (2000a) Immunohistochemical and immunochemical evidence for expression of human lung PACAP/VIP receptors *Ann N Y Acad Sci* 921, 308-311.
- Busto R, Prieto JC, Bodega G, Zapatero J, Carrero I (2000b) Immunohistochemical localization and distribution of VIP/PACAP receptors in human lung *Peptides* 21, 265-269.
- Calich AL, Domiciano DS, Fuller R (2010) Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? *Clin Rheumatol* 29(5):451-455.
- Cantaert T, De Rycke L, Bongartz T, Matteson EL, Tak PP, Nicholas AP, Baeten D (2006) Citrullinated proteins in rheumatoid arthritis: crucial...but not sufficient! *Arthritis Rheum* 54(11):3381-3389.
- Caproni M, Antiga E, Melani L, Volpi W, Del Bianco E, Fabbri P (2009) Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial *J Clin Immunol* 29(2):210-214.
- Carmena MJ, Solano RM, Guijarro LG, Prieto JC (1996) PACAP-preferring receptors in human hyperplastic prostate *Ann N Y Acad Sci* 805, 708-712.
- Carmona L, Gabriel R, Ballina J, Laffon A. Grupo de Estudio EPISER (2001) Proyecto EPISER 2000: prevalencia de enfermedades reumáticas en la población española *Rev Esp Reumatol* 28:18-25.
- Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie (2006) AG The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling *Nat Immunol* 7: 1074-1081.
- Casibang M, Purdom S, Jakowlew S, Neckers L, Zia F, Ben-Av P, Hla T, You L, Jablons DM, Moody TW (2001) Prostaglandin E2 and vasoactive intestinal peptide increase vascular endothelial cell growth factor mRNAs in lung cancer cells *Lung Cancer* 31(2-3):203-212.
- Cauvin A, Robberecht P, De Neef P, Gourlet P, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, Christophe J (1991) Properties and distribution of receptors for pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in rat brain and spinal cord *Regul Pept* 35, 161-173.
- Cawston TE, Young DA (2010) Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown *Cell Tissue Res* 339(1):221-235.
- Cesaro A, Anceriz N, Plante A, Pagé N, Tardif MR, Tessier PA (2012) An Inflammation Loop Orchestrated by S100A9 and Calprotectin Is Critical for Development of Arthritis *PLoS One* 7(9):e45478.

- Chabaud M, Fossiez F, Taupin JL, Miossec P (1998) Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines *J Immunol* 161(1):409-414.
- Charlton BG, Neal DE, Simmons NL (1991) 125I-vasoactive intestinal peptide binding in human kidney *Miner Electrolyte Metab* 17(6):372-376.
- Chang SK, Gu Z, Brenner MB (2010) Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11 *Immunol Rev* 233(1):256-266.
- Chang SK, Noss EH, Chen M, Gu Z, Townsend K, Grenha R, Leon L, Lee SY, Lee DM, Brenner MB (2011) Cadherin-11 regulates fibroblast inflammation *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(20):8402-8407.
- Chen YS, Yan W, Geczy CL, Brown MA, Thomas R (2009) Serum levels of soluble receptor for advanced glycation end products and of S100 proteins are associated with inflammatory, autoantibody, and classical risk markers of joint and vascular damage in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 11(2):R39.
- Cheng DS, Visco CJ (2012) Pharmaceutical therapy for osteoarthritis *PM R* 4(5 Suppl):S82-88.
- Chen W, Daines MO, Khurana Hershey GK (2004) Turning off signal transducer and activator of transcription (STAT): the negative regulation of STAT signaling *J Allergy Clin Immunol* 114(3):476-89.
- Cho CS, Cho ML, Min SY, Kim WU, Min DJ, Lee SS, Park SH, Choe J, Kim HY (2000) CD40 engagement on synovial fibroblast up-regulates production of vascular endothelial growth factor *J Immunol* 164(10):5055-5061.
- Choe J, Kelker MS, Wilson IA (2005) Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain *Science* 309(5734):581-585.
- Choy E (2012) Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 51 Suppl 5:v3-11.
- Christophe JP, Conlon TP, Gardner JD (1976) Interaction of porcine vasoactive intestinal peptide with dispersed pancreatic acinar cells from the guinea pig Binding of radioiodinated peptide *J Biol Chem* 251, 4629-4634.
- Christophe J, Chatelain P, Taton G, Delhaye M, Waelbroeck M, Robberecht P (1981) Comparison of VIP-secreting receptors in rat and human lung *Peptides* 2 Suppl 2, 253-258.
- Christopoulos A, Christopoulos G, Morfis M, Udawela M, Laburthe M, Couvineau A, Kuwasako K, Tilakaratne N, Sexton PM (2003) Novel receptor partners and function of receptor activity-modifying proteins *J Biol Chem* 278(5):3293-3297.
- Chu A, Caldwell JS, Chen YA (2010) Identification and characterization of a small molecule antagonist of human VPAC(2) receptor *Mol Pharmacol* 77(1):95-101.
- Clark AR, Dean JL (2012) The p38 MAPK Pathway in Rheumatoid Arthritis: A Sideways Look *Open Rheumatol J* 6:209-219.
- Colin EM, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Mus AM, van Driel M, Hazes JM, van Leeuwen JP, Lubberts E (2010) 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 62(1):132-142.
- Colston JT, Freeman GL (1992) Beneficial influence of vasoactive intestinal peptide on ventriculovascular coupling in closed-chest dogs *Am J Physiol* 263 :H1300-1305.
- Conus S, Simon HU (2010) Cathepsins and their involvement in immune responses *Swiss Med Wkly* 140:w13042.
- Cope AP, Schulze-Koops H, Aringer M (2007) The central role of T cells in rheumatoid arthritis *Clin Exp Rheumatol* 25(5 Suppl 46):S4-11.
- Couvineau A, Laburthe M (2012) VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins *Br J Pharmacol* 166(1):42-50.
- Cutolo M, Straub RH, Bijlsma JW (2007) Neuroendocrine-immune interactions in synovitis *Nat Clin Pract Rheumatol* 3(11):627-634.
- da Rocha LF Jr, Duarte ÂL, Dantas AT, Mariz HA, Pitta Ida R, Galdino SL, Pitta MG (2012) Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity *J Rheumatol* 39(7):1320-1325.

- Dautzenberg FM, Mevenkamp G, Wille S, Hauger RL (1999) N-terminal splice variants of the type I PACAP receptor: isolation, characterization and ligand binding/selectivity determinants *J Neuroendocrinol* 11(12):941-949.
- Davidson A, Moody TW, Gozes I (1996) Regulation of VIP gene expression in general. Human lung cancer cells in particular *J Mol Neurosci* 7(2):99-110.
- Davidson RK, Waters JG, Kevorkian L, Darrach C, Cooper A, Donell ST, Clark IM (2006) Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage *Arthritis Res Ther* 8(4):R124.
- Davis JM 3rd, Matteson EL; American College of Rheumatology; European League Against Rheumatism (2012) My treatment approach to rheumatoid arthritis *Mayo Clin Proc* 87(7):659-673.
- Dechanet J, Merville P, Durand I, Banchereau J, Miossec P (1995) The ability of synoviocytes to support terminal differentiation of activated B cells may explain plasma cell accumulation in rheumatoid synovium *J Clin Invest* 95(2):456-463.
- Del Rey MJ, Izquierdo E, Usategui A, Gonzalo E, Blanco FJ, Acquadro F, Pablos JL (2010) The transcriptional response of normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to hypoxia *Arthritis Rheum* 62(12):3584-3594.
- Del Rey MJ, Usategui A, Izquierdo E, Cañete JD, Blanco FJ, Criado G, Pablos JL (2012) Transcriptome analysis reveals specific changes in osteoarthritis synovial fibroblasts *Ann Rheum Dis* 71(2):275-280.
- Delgado M, Ganea D (1999) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit interleukin-12 transcription by regulating nuclear factor kappaB and Ets activation *J Biol Chem* 274(45):31930-31940.
- Delgado M, Ganea D (2000) Inhibition of IFN-gamma-induced janus kinase-1-STAT1 activation in macrophages by vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide *J Immunol* 165(6):3051-3057.
- Delgado M, Ganea D (2003) Neuroprotective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) in a mouse model of Parkinson's disease by blocking microglial activation *FASEB J* 17(8):944-946.
- Delgado M, Ganea D (2001) Cutting edge: is vasoactive intestinal peptide a type 2 cytokine? *J. Immunol* 166:2907-2912.
- Delgado M, Ganea D (2011) Vasoactive intestinal peptide: a neuropeptide with pleiotropic immune functions *Amino Acids* Dec 3. [Epub ahead of print]
- Delgado M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Gomariz RP (2001) Vasoactiveintestinal peptide prevents experimental arthritis by downregulating both autoimmune and inflammatory components of the disease *Nat Med* 7:563-8.
- Delgado M, Martinez C, Johnson MC, Gomariz RP, Ganea D (1996) Differential expression of vasoactive intestinal peptide receptors 1 and 2 (VIP-R1 and VIP-R2) mRNA in murine lymphocytes *J Neuroimmunol* 68(1-2):27-38.
- Delgado M, Leceta J, Ganea D (2002) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promote in vivo generation of memory Th2 cells *Faseb J* 16, 1844-1846.
- Delgado M, Gonzalez-Rey E, Ganea D (2004) VIP/PACAP preferentially attract Th2 effectors through differential regulation of chemokine production by dendritic cells *Faseb J* 18, 1453-1455.
- Delgado M, Robledo G, Rueda B, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Caro M, Orozco G, Gonzalez-Rey E, Martin J (2008a) Genetic association of vasoactive intestinal peptide receptor with rheumatoid arthritis: altered expression and signal in immune cells *Arthritis Rheum* 58(4):1010-1019.
- Delgado M, Varela N, Gonzalez-Rey E (2008b) Vasoactive intestinal peptide protects against beta-amyloid-induced neurodegeneration by inhibiting microglia activation at multiple levels *Glia* 56(10):1091-1103.
- Deng GM, Nilsson IM, Verdrengh M, Collins LV, Tarkowski A (1999) Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis *Nat Med* 5, 702-705.
- Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH (1998) Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26):15623-15628.

- Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G (2007) Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling *Nat Med* 13(2):156-163.
- Dickson L, Finlayson K (2009) VPAC and PAC receptors: From ligands to function *Pharmacol Ther* 121(3):294-316.
- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA *Science* 303(5663):1529-1531.
- Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee AS, Odendall C, Shum B, Hacohen N, Chen ZJ, Whelan SP, Fransen M, Nibert ML, Superti-Furga G, Kagan JC (2010) Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity *Cell* 141(4):668-681.
- Doan ND, Chatenet D, Létourneau M, Vaudry H, Vaudry D, Fournier A (2012) Receptor-independent cellular uptake of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide *Biochim Biophys Acta* 1823(4):940-949.
- Dockray GJ (1994) Neurochemical basis of reflex relaxation in gastric corpus *Dig Dis Sci* 39(12 Suppl):82S-85S.
- Dogrukol-Ak D, Tore F, Tuncel N (2004) Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood-brain barrier: therapeutic effects *Curr Pharm Des* 10(12):1325-1340.
- Dong W, Zhu P (2012) Functional niche of inflamed synovium for Th17-cell expansion and activation in rheumatoid arthritis: Implication to clinical therapeutics *Autoimmun Rev* 11(12):844-851.
- Dubikov AI, Kalinichenko SG (2010) Small molecules regulating apoptosis in the synovium in rheumatoid arthritis *Scand J Rheumatol* 39(5):368-372.
- Edwards JC, Leigh RD, Cambridge G (1997) Expression of molecules involved in B lymphocyte survival and differentiation by synovial fibroblasts *Clin Exp Immunol* 108(3):407-414.
- Ehling A, Schäffler A, Herfarth H, Tarner IH, Anders S, Distler O, Paul G, Distler J, Gay S, Schölmerich J, Neumann E, Müller-Ladner U (2006) The potential of adiponectin in driving arthritis *J Immunol* 176(7):4468-4478.
- Ehrchen JM, Sunderkotter C, Foell D, Vogl T, Roth J (2009) The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer *J Leukoc Biol* 86: 557-566.
- Eisenächer K, Krug A (2012) Regulation of RLR-mediated innate immune signaling--it is all about keeping the balance *Eur J Cell Biol* 91(1):36-47.
- El-Gehani F, Tena-Sempere M, Huhtaniemi I (1998) Vasoactive intestinal peptide is an important endocrine regulatory factor of fetal rat testicular steroidogenesis *Endocrinology* 139, 1474-1480.
- Elsaid KA, Jay GD, Chichester CO (2007) Reduced expression and proteolytic susceptibility of lubricin/superficial zone protein may explain early elevation in the coefficient of friction in the joints of rats with antigen-induced arthritis *Arthritis Rheum* 56(1):108-116.
- Espinoza LR, García-Valladares I (2012) Of bugs and joints: The relationship between infection and joints *Reumatol Clin* Aug 31. [Epub ahead of print]
- EULAR (The European League Against Rheumatism) (2009) 10 things you should know about rheumatic diseases [Internet] Disponible en: http://www.eular.org/myUploadData/files/10things_on_RD.pdf
- Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogoyo M, Barton GM (2011) Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase *J Exp Med* 208(4):643-651.
- Fahrenkrug, J (2001): Gut/brain peptides in the genital tract: VIP and PACAP *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 234, 35-39.
- Fahrenkrug J (2010) VIP and PACAP *Results Probl Cell Differ* 50:221-234.
- Fassbender HG, Simmling-Annefeld M (1983) The potential aggressiveness of synovial tissue in rheumatoid arthritis *J Pathol* 139(3):399-406.
- Feliciano L, Henning RJ (1998) Vagal nerve stimulation releases vasoactive intestinal peptide which significantly increases coronary artery blood flow *Cardiovasc Res* 40(1):45-55.
- Fernandez-Lopez JC, Laffon A, Blanco FJ, Carmona L; EPISER Study Group (2008) Prevalence, risk factors, and impact of knee pain suggesting osteoarthritis in Spain *Clin Exp Rheumatol* 26(2):324-332.

- Fernández-Martínez AB, Bajo AM, Isabel Arenas M, Sánchez-Chapado M, Prieto JC, Carmena MJ (2010) Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces malignant transformation of the human prostate epithelial cell line RWPE-1 *Cancer Lett* 299(1):11-21.
- Fernandez-Montesinos R, Castillo PM, Klippstein R, Gonzalez-Rey E, Mejias JA, Zaderenko AP, Pozo D (2009) Chemical synthesis and characterization of silver-protected vasoactive intestinal peptide nanoparticles *Nanomedicine (Lond)* 4: 919–930.
- Filizola M, Carteni-Farina M, Perez JJ (1997) Conformational study of vasoactive intestinal peptide by computational methods *J Pept Res* 50, 55-64.
- Fink JS, Verhave M, Walton K, Mandel G, Goodman RH (1991) Cyclic AMP- and phorbol ester-induced transcriptional activation are mediated by the same enhancer element in the human vasoactive intestinal peptide gene *J Biol Chem* 266(6):3882-3887.
- Firestein GS (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis *Nature* 423 (6937):356-361.
- Fishbein VA, Coy DH, Hocart SJ, Jiang NY, Mrozinski JE Jr, Mantey SA, Jensen RT (1994) A chimeric VIP-PACAP analogue but not VIP pseudopeptides function as VIP receptor antagonists *Peptides* 15, 95-100.
- Foster N, Lea SR, Preshaw PM, Taylor JJ (2007) Pivotal advance vasoactive intestinal peptide inhibits up-regulation of human monocyte TLR2 and TLR4 by LPS and differentiation of monocytes to macrophages *J Leukoc Biol* 81, 893-903.
- Fox DA, Gizinski A, Morgan R, Lundy SK (2010) Cell-cell interactions in rheumatoid arthritis synovium *Rheum Dis Clin North Am* 36(2):311-323.
- Franklin EC, Holman HR, Muller-Eberhard HJ, Kunkel HG (1957) An unusual protein component of high molecular weight in the serum of certain patients with rheumatoid arthritis *J Exp Med* 105(5):425–438.
- Franz JK, Pap T, Hummel KM, Nawrath M, Aicher WK, Shigeyama Y, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S (2000) Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 43(3):599-607.
- Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale M Jr (2008) Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1 *J Virol* 82(2):609-616.
- Frommer KW, Schäffler A, Büchler C, Steinmeyer J, Rickert M, Rehart S, Brentano F, Gay S, Müller-Ladner U, Neumann E (2012) Adiponectin isoforms: a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 71(10):1724-1732.
- Fujimori N, Oono T, Igarashi H, Ito T, Nakamura T, Uchida M, Coy DH, Jensen RT, Takayanagi R. (2011) Vasoactive intestinal peptide reduces oxidative stress in pancreatic acinar cells through the inhibition of NADPH oxidase *Peptides* 32(10):2067-2076.
- Furness SG, Wootten D, Christopoulos A, Sexton PM (2012) Consequences of splice variation on Secretin family G protein-coupled receptor function *Br J Pharmacol* 166(1):98-109.
- Furuzawa-Carballeda J, Macip-Rodríguez PM, Cabral AR (2008) Osteoarthritis and rheumatoid arthritis pannus have similar qualitative metabolic characteristics and pro-inflammatory cytokine response *Clin Exp Rheumatol* 26(4):554-560.
- Galligan CL, Baig E, Bykerk V, Keystone EC, Fish EN (2007) Distinctive gene expression signatures in rheumatoid arthritis synovial tissue fibroblast cells: correlates with disease activity *Genes Immun* 8(6):480-491.
- Gamet L, Murat JC, Remaury A, Remesy C, Valet P, Paris H, Denis-Pouxviel C (1992) Vasoactive intestinal peptide and forskolin regulate proliferation of the HT29 human colon adenocarcinoma cell line *J Cell Physiol* 150, 501-509.
- García S, Liz M, Gómez-Reino JJ, Conde C (2010) Akt activity protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis by inhibition of Bid cleavage *Arthritis Res Ther* 12(1):R33.
- García-Vicuña R, Gómez-Gavero MV, Domínguez-Luis MJ, Pec MK, González-Alvaro I, Alvaro-Gracia JM, Díaz-González F (2004) CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients *Arthritis Rheum* 50(12):3866-3877.

- Gaston JS (1997) Heat shock proteins and arthritis--new readers start here *Autoimmunity* 26, 33-42.
- Gauthy R (2007) Musculoskeletal disorders: An ill-understood pandemic European Trade Union Institute (ETUI) ISBN 978-2-87452-100-3.
- Gay NJ, Keith FJ (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor *Nature* 351, 355-356.
- Ge D, You Z (2008) Expression of interleukin-17RC protein in normal human tissues *Int Arch Med* 1: 19.
- Gebhardt C, Nemeth J, Angel P, Hess J (2006) S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer *Biochem Pharmacol* 72: 1622-1631.
- Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renauld JC, Matthys P (2009) Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice *Arthritis Rheum* 60(2):390-395.
- Génin P, Vaccaro A, Civas A (2009) The role of differential expression of human interferon- α genes in antiviral immunity *Cytokine Growth Factor Rev* 20(4):283-295
- Gierut A, Perlman H, Pope RM (2010) Innate immunity and rheumatoid arthritis *Rheum Dis Clin North Am* 36(2):271-296.
- Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M (2006) Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(22):8459-8464.
- Glowa JR, Panlilio LV, Brenneman DE, Gozes I, Fridkin M, Hill JM (1992) Learning impairment following intracerebral administration of the HIV envelope protein gp120 or a VIP antagonist *Brain Res* 570, 49-53.
- Gobeil F Jr, Bernier SG, Vazquez-Tello A, Brault S, Beauchamp MH, Quiniou C, Marrache AM, Checchin D, Sennlaub F, Hou X, Nader M, Bkaily G, Ribeiro-da-Silva A, Goetzl EJ, Chemtob S (2003) Modulation of pro-inflammatory gene expression by nuclear lysophosphatidic acid receptor type-1 *J Biol Chem* 278(40):38875-38883.
- Gobeil F, Fortier A, Zhu T, Bossolasco M, Leduc M, Grandbois M, Heveker N, Bkaily G, Chemtob S, Barbaz D (2006) G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm *Can J Physiol Pharmacol* 84(3-4):287-297.
- Goetzl EJ, Sreedharan SP (1992) Mediators of communication and adaptation in the neuroendocrine and immune systems *FASEB J* 6(9):2646-2652.
- Goh FG, Midwood KS (2012) Intrinsic danger: activation of Toll-like receptors in rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 51(1):7-23.
- Goldberg M, Nativ O, Luknar-Gabor N, Agar G, Beer Y, Katz Y (2009) Synergism between tumor necrosis factor alpha and interleukin-17 to induce IL-23 p19 expression in fibroblast-like synoviocytes *Mol Immunol* 46: 1854-1859
- Goldstein BL, Chibnik LB, Karlson EW, Costenbader KH (2012) Epstein-Barr virus serologic abnormalities and risk of rheumatoid arthritis among women *Autoimmunity* 45(2):161-168.
- Gomariz RP, Garrido E, Leceta J, Martinez C, Abalo R, Delgado M (1994) Gene expression of VIP receptor in rat lymphocytes *Biochem Biophys Res Commun* 203(3):1599-1604.
- Gomariz RP, Martinez C, Abad C, Leceta J, Delgado M (2001) Immunology of VIP: a review and therapeutical perspectives *Curr Pharm Des* 7(2):89-111.
- Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martinez C (2006) VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy *Ann N Y Acad Sci* 1070:51-74.
- Gomariz RP, Arranz A, Juarranz Y, Gutierrez-Cañas I, Garcia-Gomez M, Leceta J, Martínez C (2007) Regulation of TLR expression, a new perspective for the role of VIP in immunity *Peptides* 28:1825-1832.
- Gomariz RP, Gutiérrez-Cañas I, Arranz A, Carrión M, Juarranz Y, Leceta J, Martínez C (2010) Peptides targeting Toll-like receptor signalling pathways for novel immune therapeutics *Curr Pharm Des* 16(9):1063-1080.
- Gómez O, Balsa JA (2003) Autocrine/paracrine action of pituitary vasoactive intestinal peptide on lactotroph hyperplasia induced by estrogen *Endocrinology* 144(10):4403-4409.
- González-Rey E, Delgado M (2008) Vasoactive intestinal peptide inhibits cyclooxygenase-2 expression in activated macrophages, microglia, and dendritic cells *Brain Behav Immun* 22(1):35-41.

- González-Rey E, Ganea D, Delgado M (2010) Neuropeptides: keeping the balance between pathogen immunity and immune tolerance *Curr Opin Pharmacol* 10(4):473-481.
- Goodpaster T, Legesse-Miller A, Hameed MR, Aisner SC, Randolph-Habecker J, Coller HA (2008) An immunohistochemical method for identifying fibroblasts in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue *J Histochem Cytochem* 56(4):347-358.
- Goossens JF, Pommery N, Lohez M, Pommery J, Helbecque N, Cotelle P, Lhermitte M, Henichart J P (1992) Antagonistic effect of a vasoactive intestinal peptide fragment, vasoactive intestinal peptide(1-11), on guinea pig trachea smooth muscle relaxation *Mol Pharmacol* 41, 104-109.
- Gottschall PE, Tatsuno I, Miyata A, Arimura A (1990) Characterization and distribution of binding sites for the hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide *Endocrinology* 127, 272-277.
- Gottschall PE, Tatsuno I, Arimura A (1991) Hypothalamic binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide characterization and molecular identification *Faseb J* 5, 194-199.
- Gourlet P, De Neef P, Cnudde J, Waelbroeck M, Robberecht P (1997a) In vitro properties of a high affinity selective antagonist of the VIP1 receptor *Peptides* 18(10):1555-1560.
- Gourlet P, Vandermeers A, Robberecht P, Deschodt-Lanckman M (1997b) Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP-27, but not PACAP-38) degradation by the neutral endopeptidase EC 3.4.24.11 *Biochem Pharmacol* 54(4):509-515.
- Gourlet P, Vertongen P, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC, Rathe J, De Neef P, Waelbroeck M, Robberecht P (1997c) The long-acting vasoactive intestinal polypeptide agonist RO 25-1553 is highly selective of the VIP2 receptor subclass *Peptides* 18, 403-408.
- Gozes I, Bodner M, Shani Y, Fridkin M (1986) Structure and expression of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene in a human tumor *Peptides* 7 Suppl 1, 1-6.
- Gozes I, McCune SK, Jacobson L, Warren D, Moody TW, Fridkin M, Brenneman DE (1991) An antagonist to vasoactive intestinal peptide affects cellular functions in the central nervous system *J Pharmacol Exp Ther* 257, 959-966.
- Gozes I, Bardea A, Reshef A, Zamostiano R, Zhukovsky S, Rubinraut S, Fridkin M, Brenneman DE (1996) Neuroprotective strategy for Alzheimer disease: intranasal administration of a fatty neuropeptide *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1):427-432.
- Gozes I, Perl O, Zamostiano R, Rubinraut S, Fridkin M, Shochat L, Lewin LM (1998) Multiple actions of a hybrid PACAP antagonist: neuronal cell killing and inhibition of sperm motility *Ann N Y Acad Sci* 865, 266-723.
- Granoth R, Fridkin M, Gozes I (2000) VIP and the potent analog, stearyl-Nle(17)-VIP, induce proliferation of keratinocytes *FEBS Lett* 475, 78-83.
- Grevers LC, de Vries TJ, Vogl T, Abdollahi-Roodsaz S, Sloetjes AW, Leenen PJ, Roth J, Everts V, van den Berg WB, van Lent PL (2011) S100A8 enhances osteoclastic bone resorption in vitro through activation of Toll-like receptor 4: implications for bone destruction in murine antigen-induced arthritis *Arthritis Rheum* 63(5):1365-1375.
- Grönblad M, Konttinen YT, Korkala O, Liesi P, Hukkanen M, Polak JM (1988) Neuropeptides in synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis *J Rheumatol* 15(12):1807-1810.
- Groneberg DA, Springer J, Fischer A (2001) Vasoactive intestinal polypeptide as mediator of asthma *Pulm Pharmacol Ther* 14, 391-401.
- Groneberg DA, Rabe KF, Fischer A (2006) Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors *Eur J Pharmacol* 533(1-3):182-194.
- Gronenborn AM, Bovermann G, Clore GM (1987) A 1H-NMR study of the solution conformation of secretin Resonance assignment and secondary structure *FEBS Lett* 215, 88-94.
- Guan CX, Cui YR, Sun GY, Yu F, Tang CY, Li YC, Liu HJ, Fang X (2009) Role of CREB in vasoactive intestinal peptide-mediated wound healing in human bronchial epithelial cells *Regul Pept* 153(1-3):64-69.
- Guidone G, Muller D, Vogt K, Mukhopadhyay AK (2002) Characterization of VIP and PACAP receptors in cultured rat penis corpus cavernosum smooth muscle cells and their interaction with guanylate cyclase-B receptors *Regul Pept* 108, 63-72.

- Guijarro LG, Rodríguez-Pena MS, Prieto JC (1991) Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in rat seminal vesicle *Am J Physiol* 260, E286-291.
- Guijarro LG, Rodríguez-Henche N, García-Lopez E, Noguerales F, Dapena MA, Juarranz MG, Prieto JC (1995) Receptors for pituitary adenylate cyclase-activating peptide in human liver *J Clin Endocrinol Metab* 80, 2451-2457.
- Guma M, Firestein GS (2012) c-Jun N-Terminal Kinase in Inflammation and Rheumatic Diseases *Open Rheumatol J* 6:220-231.
- Gutiérrez-Cañas I, Rodríguez-Henche N, Bolaños O, Carmena MJ, Prieto JC, Juarranz MG (2003) VIP and PACAP are autocrine factors that protect the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3 from apoptosis induced by serum withdrawal *Br J Pharmacol* 139(5):1050-1058.
- Gutiérrez-Cañas I, Juarranz MG, Collado B, Rodríguez-Henche N, Chiloeches A, Prieto JC, Carmena MJ (2005) Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K *Prostate* 63(1):44-55.
- Gutiérrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Arranz A, Martínez C, Galindo M, Paya M, Gomariz RP, Pablos JL (2006) VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts *Rheumatology (Oxford)* 45, 527-532.
- Gutiérrez-Cañas I, Juarranz Y, Santiago B, Martínez C, Gomariz RP, Pablos JL, Leceta, J (2008) Immunoregulatory properties of vasoactive intestinal peptide in human T cell subsets Implications for rheumatoid arthritis *Brain Behav Immun* 22(3):312-317.
- Habjan M, Andersson I, Klingström J, Schümann M, Martin A, Zimmermann P, Wagner V, Pichlmair A, Schneider U, Mühlberger E, Mirazimi A, Weber F (2008) Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction *PLoS One* 3(4):e2032.
- Hagen BM, Bayguinov O, Sanders KM (2006) VIP and PACAP regulate localized Ca²⁺ transients via cAMP-dependent mechanism *Am J Physiol Cell Physiol* 291(2):C375-385.
- Haghjoo K, Cash PW, Farid RS, Komisaruk BR, Jordan F, Pochapsky SS (1996) Solution structure of vasoactive intestinal polypeptide (11-28)-NH₂, a fragment with analgesic properties *Pept Res* 9, 327-331.
- Hahm SH, Eiden LE (1998a) Cis-regulatory elements controlling basal and inducible VIP gene transcription *Ann N Y Acad Sci* 865, 10-26.
- Hahm SH, Eiden LE (1998b) Five discrete cis-active domains direct cell type-specific transcription of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene *J Biol Chem* 273, 17086-17094.
- Hamann J, Wishaupt JO, van Lier RA, Smeets TJ, Breedveld FC, Tak PP (1999) Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue *Arthritis Rheum* 42(4):650-658.
- Hamerman D, Gresser I, Smith C (1982) Isolation of cytomegalovirus from synovial cells of a patient with rheumatoid arthritis *J Rheumatol* 9(5):658-664.
- Hammaker D, Boyle DL, Firestein GS (2012) Synoviocyte innate immune responses: TANK-binding kinase-1 as a potential therapeutic target in rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 51(4):610-618.
- Hammer HB, Ødegård S, Syversen SW, Landewé R, van der Heijde D, Uhlig T, Mowinckel P, Kvien TK (2010) Calprotectin (a major S100 leucocyte protein) predicts 10-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 69(1):150-154.
- Han Z, Boyle DL, Aupperle KR, Bennett B, Manning AM, Firestein GS (1999) Jun N-terminal kinase in rheumatoid arthritis *J Pharmacol Exp Ther* 291(1):124-130.
- Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, Manning AM, Firestein GS (2001) c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis *J Clin Invest* 108(1):73-81.
- Harmar AJ (2003) An essential role for peptidergic signalling in the control of circadian rhythms in the suprachiasmatic nuclei *J Neuroendocrinol* 15, 335-338.
- Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, Vaudry D, Vaudry H, Waschek JA, Said SI (2012) Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR review 1 *Br J Pharmacol* 166(1):4-17.

- Hart JE, Källberg H, Laden F, Bellander T, Costenbader KH, Holmqvist M, Klareskog L, Alfredsson L, Karlson EW (2012) Ambient air pollution exposures and risk of rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study *Ann Rheum Dis* 201587 Published Online: 24 July 2012.
- Hashimoto H, Yamamoto K, Hagigara N, Ogawa N, Nishino A, Aino H, Nogi H, Imanishi K, Matsuda T, Baba A (1996) cDNA cloning of a mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor *Biochim Biophys Acta* 1281, 129-133.
- Hayashida K, Shimaoka Y, Ochi T, Lipsky PE (2000) Rheumatoid arthritis synovial stromal cells inhibit apoptosis and up-regulate Bcl-xL expression by B cells in a CD49/CD29-CD106-dependent mechanism *J Immunol* 164(2):1110-1116.
- Hedlund P, Alm P, Ekstrom P, Fahrenkrug J, Hannibal J, Hedlund H, Larsson B, Andersson KE (1995) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, helospectin, and vasoactive intestinal polypeptide in human corpus cavernosum *Br J Pharmacol* 116, 2258-2266.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8 *Science* 303(5663):1526-1529.
- Hemdan NY, Birkenmeier G, Wichmann G, Abu El-Saad AM, Krieger T, Conrad K, Sack U (2010) Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity *Autoimmun Rev* 9(11):785-792.
- Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway *Nat Immunol* 3, 196-200.
- Henning RJ, Sawmiller DR (2001) Vasoactive intestinal peptide: cardiovascular effects *Cardiovasc Res* 49(1):27-37.
- Herrera JL, Fernández-Montesinos R, González-Rey E, Delgado M, Pozo D (2006) Protective role for plasmid DNA-mediated VIP gene transfer in non-obese diabetic mice *Ann N Y Acad Sci* 1070:337-341.
- Herrera JL, Gonzalez-Rey E, Fernandez-Montesinos R, Quintana FJ, Najmanovich R, Pozo D (2009) Toll-like receptor stimulation differentially regulates vasoactive intestinal peptide type 2 receptor in macrophages *J Cell Mol Med* 13(9B):3209-3217.
- Herrero-Beaumont G, Martínez Calatrava MJ, Castañeda S (2012) Abatacept mechanism of action: concordance with its clinical profile *Reumatol Clin* 8(2):78-83.
- Heutinck KM, Kassies J, Florquin S, ten Berge IJ, Hamann J, Rowshani AT (2012) SerpinB9 expression in human renal tubular epithelial cells is induced by triggering of the viral dsRNA sensors TLR3, MDA5 and RIG-I *Nephrol Dial Transplant* 27(7):2746-2754.
- Hoffmann JA (2003) The immune response of Drosophila *Nature* 426(6962):33-38.
- Honorati MC, Bovara M, Cattini L, Piacentini A, Facchini A (2002) Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis *Osteoarthritis Cartilage* 10(10):799-807.
- Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G (2006) 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I *Science* 314(5801):994-997.
- Hosoya M, Onda H, Ogi K, Masuda Y, Miyamoto Y, Ohtaki T, Okazaki H, Arimura A, Fujino M (1993) Molecular cloning and functional expression of rat cDNAs encoding the receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) *Biochem Biophys Res Commun* 194, 133-143.
- Hot A, Miossec P (2011) Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes *Ann Rheum Dis* 70(5):727-732.
- Houdeau E, Prudhomme MJ, Rousseau, JP (1998) Regional difference in the distribution of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerve fibres along the uterus and between myometrial muscle layers in the rat *Histochem J* 30, 525-529.
- Huang MN, Yu H, Moudgil KD (2010) The involvement of heat-shock proteins in the pathogenesis of autoimmune arthritis: a critical appraisal *Semin Arthritis Rheum* 40(2):164-175.
- Huyton T, Rossjohn J, Wilce M (2007) Toll-like receptors: structural pieces of a curve-shaped puzzle *Immunol Cell Biol* 85(6):406-410.

- Hwang SY, Kim HY (2005) Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients *Mol. Cells* 19: 180-184.
- Ibrahim H, Barrow P, Foster N (2011) Transcriptional modulation by VIP: a rational target against inflammatory disease *Clin Epigenetics* 2(2):213-222.
- Igarashi H, Ito T, Mantey SA, Pradhan TK, Hou W, Coy DH, Jensen RT (2005) Development of simplified vasoactive intestinal peptide analogs with receptor selectivity and stability for human vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors *J Pharmacol Exp Ther* 315(1):370-381.
- Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y (2005) Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine *Arthritis Rheum* 52(4):1037-1046.
- Imaizumi T, Aratani S, Nakajima T, Carlson M, Matsumiya T, Tanji K, Ookawa K, Yoshida H, Tsuchida S, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Satoh K (2002) Retinoic acid-inducible gene-1 is induced in endothelial cells by LPS and regulates expression of COX-2 *Biochem Biophys Res Commun* 292(1):274-279.
- Imaizumi T, Sashinami H, Mori F, Matsumiya T, Yoshida H, Nakane A, Wakabayashi K, Oyama C, Satoh K (2006) *Listeria monocytogenes* induces the expression of retinoic acid-inducible gene-1 *Microbiol Immunol* 50(10):811-815.
- Imaizumi T, Yagihashi N, Kubota K, Yoshida H, Sakaki H, Yagihashi S, Kimura H, Satoh K. (2007) Expression of retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I) in macrophages: possible involvement of RIG-I in atherosclerosis *J Atheroscler Thromb* 14(2):51-55.
- Imaizumi T, Arikawa T, Sato T, Uesato R, Matsumiya T, Yoshida H, Ueno M, Yamasaki S, Nakajima T, Hirashima M, Sakata K, Ishibashi Y, Toh S, Ohyama C, Satoh K (2008) Involvement of retinoic acid-inducible gene-1 in inflammation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes *Clin Exp Immunol* 153(2):240-244.
- Imaizumi T, Matsumiya T, Yoshida H, Naraoka T, Uesato R, Ishibashi Y, Ota K, Toh S, Fukuda S, Satoh K (2009) Tumor-necrosis factor-alpha induces retinoic acid-inducible gene-1 in rheumatoid fibroblast-like synoviocytes *Immunol Lett* 122(1):89-93.
- Imaizumi T, Tanaka H, Matsumiya T, Yoshida H, Tanji K, Tsuruga K, Oki E, Aizawa-Yashiro T, Ito E, Satoh K (2010) Retinoic acid-inducible gene-1 is induced by double-stranded RNA and regulates the expression of CC chemokine ligand (CCL) 5 in human mesangial cells *Nephrol Dial Transplant* 25(11):3534-3539.
- Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S (1992) Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide *Neuron* 8, 811-819.
- Itoh N, Obata K, Yanaihara N, Okamoto H (1983) Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27 *Nature* 304, 547-549.
- Itri J, Colwell CS (2003) Regulation of inhibitory synaptic transmission by vasoactive intestinal peptide (VIP) in the mouse suprachiasmatic nucleus *J Neurophysiol* 90(3):1589-1597.
- Ivanova M, Belcheva S, Belcheva I, Negrev N, Tashev R (2012) Lateralized hippocampal effects of vasoactive intestinal peptide on learning and memory in rats in a model of depression *Psychopharmacology (Berl)* 221(4):561-574.
- Iwamoto T, Okamoto H, Iikuni N, Takeuchi M, Toyama Y, Tomatsu T, Kamatani N, Momohara S (2006) Monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4)/CCL13 is highly expressed in cartilage from patients with rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 45(4):421-424.
- Iwamoto T, Okamoto H, Toyama Y, Momohara S (2008) Molecular aspects of rheumatoid arthritis: chemokines in the joints of patients *FEBS J* 275(18):4448-4455.
- Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Del Rey MJ, Usategui A, Marsal S, Sanmartí R, Criado G, Pablos JL (2011) Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy *Arthritis Rheum* 63(9):2575-2583.
- Janssens S, Beyaert R (2003) Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members *Mol Cell* 11, 293-302.
- Jara LJ, Navarro C, Medina G, Vera-Lastra O, Blanco F (2006) Immune-neuroendocrine interactions and autoimmune diseases *Clin Dev Immunol* 13(2-4):109-123.
- Jenkins KA, Mansell A (2010) TIR-containing adaptors in Toll-like receptor signalling *Cytokine* 49(3):237-244.

- Jensen S L, Fahrenkrug J, Holst JJ, Nielsen OV, Schaffalitzky de Muckadell, OB (1978) Secretory effects of VIP on isolated perfused porcine pancreas *Am J Physiol* 235, E387-391.
- Jiang S, Kopras E, McMichael M, Bell RH Jr, Ulrich CD 2nd (1997) Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates in vitro growth of VIP-1 receptor-bearing human pancreatic adenocarcinoma-derived cells *Cancer Res* 57, 1475-1480.
- Jiang W, Gao SG, Chen XG, Xu XC, Xu M, Luo W, Tu M, Zhang FJ, Zeng C, Lei GH (2012) Expression of synovial fluid and articular cartilage VIP in human osteoarthritic knee: A new indicator of disease severity? *Clin Biochem* Aug 29. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.08.020. [Epub ahead of print]
- Jin MS, Lee JO (2008) Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes *Immunity* 29(2):182-191.
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases *Science* 298(5600):1911-1912.
- Johnston CA, Siderovski DP (2007) Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins: current structural insights *Mol Pharmacol* 72(2):219-230.
- Joosten LA, Koenders MI, Smeets RL, Heuvelmans-Jacobs M, Helsen MM, Takeda K, Akira S, Lubberts E, van de Loo FA, van den Berg WB (2003) Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: critical role of myeloid differentiation factor 88 *J Immunol* 171, 6145-6153.
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP (1998) IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages *J Immunol* 160(7):3513-3521.
- Juarez M, Filer A, Buckley CD (2012) Fibroblasts as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and cancer *Swiss Med Wkly* 24;142:w13529.
- Juarranz MG, Van Rampelbergh J, Gourlet P, De Neef P, Cnudde J, Robberecht P, Waelbroeck M (1999) Different vasoactive intestinal polypeptide receptor domains are involved in the selective recognition of two VPAC(2)-selective ligands *Mol Pharmacol* 56, 1280-1287.
- Juarranz MG, Bodega G, Prieto JC, Guijarro LG (2001) Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates rat prostatic epithelial cell proliferation *Prostate* 47, 285-292.
- Juarranz MG, Santiago B, Torroba M, Gutiérrez-Canas I, Palao G, Galindo M, Abad C, Martinez C, Leceta J, Pablos JL, Gomariz RP (2004) Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells *Rheumatology (Oxford)* 43, 416-422.
- Juarranz Y, Abad C, Martinez C, Arranz A, Gutiérrez-Canas I, Rosignoli F, Gomariz RP, Leceta J (2005) Protective effect of vasoactive intestinal peptide on bone destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 7, R1034-1045.
- Juarranz Y, Gutiérrez-Canas I, Arranz A, Martinez C, Abad C, Leceta J, Pablos JL, Gomariz RP (2006) VIP decreases TLR4 expression induced by LPS and TNF-alpha treatment in human synovial fibroblasts *Ann N Y Acad Sci* 1070, 359-364.
- Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S (2002) Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848 *Nat Immunol* 3, 499.
- Kaisho T, Tanaka T (2008) Turning NF-kappaB and IRFs on and off in DC *Trends Immunol* 29(7):329-336.
- Kakurai M, Fujita N, Murata S, Furukawa Y, Demitsu T, Nakagawa H (2001) Vasoactive intestinal peptide regulates its receptor expression and functions of human keratinocytes via type I vasoactive intestinal peptide receptors *J Invest Dermatol* 116, 743-749.
- Källberg H, Ding B, Padyukov L, Bengtsson C, Rönnelid J, Klareskog L, Alfredsson L; EIRA Study Group (2011) Smoking is a major preventable risk factor for rheumatoid arthritis: estimations of risks after various exposures to cigarette smoke *Ann Rheum Dis* 70(3):508-511.
- Kane D, Roth J, Frosch M, Vogl T, Bresnihan B, FitzGerald O (2003) Increased perivascular synovial membrane expression of myeloid-related proteins in psoriatic arthritis *Arthritis Rheum* 48(6):1676-1685.
- Kang DC, Gopalkrishnan RV, Lin L, Randolph A, Valerie K, Pestka S, Fisher PB (2004) Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene *Oncogene* 23(9):1789-1800.
- Kang JY, Lee JO (2011) Structural biology of the Toll-like receptor family *Annu Rev Biochem* 80:917-941.

- Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Pelletier JP, Fahmi H (2011) Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis *Nat Rev Rheumatol* 7(1):33-42.
- Kariko K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D (2004) mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3 *J Biol Chem* 279, 12542-12550.
- Kariko K, Buckstein M, Ni H, Weissman D (2005) Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA *Immunity* 23, 165-175.
- Karlson EW, Deane K (2012) Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis *Rheum Dis Clin North Am* 38(2):405-426.
- Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S (2006) Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction *Immunol Lett* 106(1):8-13.
- Karouzakis E, Gay RE, Gay S, Neidhart M (2011) Epigenetic deregulation in rheumatoid arthritis *Adv Exp Med Biol* 711:137-149.
- Karpus ON, Heutinck KM, Wijinker PJ, Tak PP, Hamann J (2012) Triggering of the dsRNA sensors TLR3, MDA5, and RIG-I induces CD55 expression in synovial fibroblasts *PLoS One* 7(5):e35606.
- Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S (2005) Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response *Immunity* 23(1):19-28.
- Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S (2006) Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses *Nature* 441(7089):101-105.
- Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Sato E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-1 and melanoma differentiation-associated gene 5 *J Exp Med* 205(7):1601-1610.
- Katz Y, Nadiv O, Beer Y (2001) Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1, 6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes *Arthritis Rheum* 44(9):2176-2184.
- Kawai T, Akira S (2007) TLR signaling *Semin Immunol* 19: 24-32.
- Kawai T, Akira S (2008) Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling *Ann NY Acad Sci* 1143: 1-20.
- Kawai T, Akira S (2009) The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition *Int Immunol* 21(4):317-337.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors *Nat Immunol* 11(5):373-384.
- Kawai T, Akira S (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity *Immunity* 34(5):637-650.
- Kawakami M, Kimura T, Kishimoto Y, Tatekawa T, Baba Y, Nishizaki T, Matsuzaki N, Taniguchi Y, Yoshihara S, Ikegame K, Shirakata T, Nishida S, Masuda T, Hosen N, Tsuboi A, Oji Y, Oka Y, Ogawa H, Sonoda Y, Sugiyama H, Kawase I, Soma T (2004) Preferential expression of the vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor VPAC1 in human cord blood-derived CD34+CD38- cells: possible role of VIP as a growth-promoting factor for hematopoietic stem/progenitor cells *Leukemia* 18(5):912-921.
- Kawane K, Ohtani M, Miwa K, Kizawa T, Kanbara Y, Yoshioka Y, Yoshikawa H, Nagata S (2006) Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages *Nature* 443(7114):998-1002.
- Kawasaki T, Kawai T, Akira S (2011) Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity *Immunol Rev* 243(1):61-73.
- Kehlen A, Thiele K, Riemann D, Langner J (2002) Expression, modulation and signalling of IL-17 receptor in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis *Clin. Exp. Immunol* 127: 539-546.
- Kennedy A, Fearon U, Veale DJ, Godson C (2011) Macrophages in synovial inflammation *Front Immunol* 2:52.
- Keystone EC, Smolen J, van Riel P (2012) Developing an effective treatment algorithm for rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 51 Suppl 5:v48-54.

- Kim HR, Cho ML, Kim KW, Juhn JY, Hwang SY, Yoon CH, Park SH, Lee SH, Kim HY (2007) Up-regulation of IL-23p19 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by IL-17 through PI3-kinase-, NF-kappaB- and p38 MAPK-dependent signalling pathways *Rheumatology (Oxford)* 46(1):57-64.
- Kim KW, Cho ML, Kim HR, Ju JH, Park MK, Oh HJ, Kim JS, Park SH, Lee SH, Kim HY (2007a) Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction *Arthritis Rheum* 56(4):1076-1086.
- Kim KW, Cho ML, Lee SH, Oh HJ, Kang CM, Ju JH, Min SY, Cho YG, Park SH, Kim HY (2007b) Human rheumatoid synovial fibroblasts promote osteoclastogenic activity by activating RANKL via TLR-2 and TLR-4 activation *Immunol Lett* 110(1):54-64.
- Kim KW, Cho ML, Oh HJ, Kim HR, Kang CM, Heo YM, Lee SH, Kim HY (2009) TLR-3 enhances osteoclastogenesis through upregulation of RANKL expression from fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis *Immunol Lett* 124(1):9-17.
- Kim KW, Kim HR, Park JY, Park JS, Oh HJ, Woo YJ, Park MK, Cho ML, Lee SH (2012) Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts *Arthritis Rheum* 64(4):1015-1023.
- Kim MJ, Hwang SY, Imaizumi T, Yoo JY (2008) Negative feedback regulation of RIG-I-mediated antiviral signaling by interferon-induced ISG15 conjugation *J Virol* 82(3):1474-1483.
- Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL (2008) UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes *Nature* 452(7184):234-238.
- Kim W, Min S, Cho M, Youn J, Min J, Lee S, Park S, Cho C, Kim H (2000) The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis(RA) *Clin Exp Immunol* 119: 175-181.
- Kitamura H, Matsuzaki Y, Kimura K, Nakano H, Imaizumi T, Satoh K, Hanada K (2007) Cytokine modulation of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) expression in human epidermal keratinocytes *J Dermatol Sci* 45(2):127-134.
- Kiu H, Nicholson SE (2012) Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways *Growth Factors* 30(2):88-106.
- Kobilka BK, Deupi X (2007) Conformational complexity of G-protein-coupled receptors *Trends Pharmacol Sci* 28(8):397-406.
- Koenders MI, Marijnissen RJ, Devesa I, Lubberts E, Joosten LA, Roth J, van Lent PL, van de Loo FA, van den Berg WB (2011) Tumor necrosis factor-interleukin-17 interplay induces S100A8, interleukin-1 β , and matrix metalloproteinases, and drives irreversible cartilage destruction in murine arthritis: rationale for combination treatment during arthritis *Arthritis Rheum* 63(8):2329-2339.
- Koh SW, Waschek JA (2000) Corneal endothelial cell survival in organ cultures under acute oxidative stress: effect of VIP *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(13):4085-4092.
- Koh SW, Chandrasekara K, Abbondandolo CJ, Coll TJ, Rutzen AR (2008) VIP and VIP gene silencing modulation of differentiation marker N-cadherin and cell shape of corneal endothelium in human corneas ex vivo *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(8):3491-3498.
- Koh SW, Cheng J, Dodson RM, Ku CY, Abbondandolo CJ (2009) VIP down-regulates the inflammatory potential and promotes survival of dying (neural crest-derived) corneal endothelial cells ex vivo: necrosis to apoptosis switch and up-regulation of Bcl-2 and N-cadherin *J Neurochem* 109(3):792-806.
- Koh SW, Gloria D, Molloy J (2011) Corneal endothelial autocrine VIP enhances its integrity in stored human donor corneoscleral explant *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(8):5632-5640.
- Komatsu N, Takayanagi H (2012) Inflammation and bone destruction in arthritis: synergistic activity of immune and mesenchymal cells in joints *Front Immunol* 3:77.
- Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog EM (2012) Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis *Nat Rev Rheumatol* 8(3):153-162.
- Koopman FA, Stoof SP, Straub RH, Van Maanen MA, Vervordeldonk MJ, Tak PP (2011) Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis *Mol Med* 17(9-10):937-948.

- Korkmaz OT, Tunçel N, Tunçel M, Oncü EM, Sahintürk V, Celik M. 2010 Vasoactive intestinal peptide (VIP) treatment of Parkinsonian rats increases thalamic gamma-aminobutyric acid (GABA) levels and alters the release of nerve growth factor (NGF) by mast cells *J Mol Neurosci* 41(2):278-287.
- Kotani E, Usuki S, Kubo T (1997) Rat corpus luteum expresses both PACAP and PACAP type IA receptor mRNAs *Peptides* 18, 1453-1455.
- Kotani E, Usuki S, Kubo T (1998) Effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on progesterone biosynthesis in cultured granulosa cells from rat ovary and expression of mRNA encoding PACAP type IA receptor *J Reprod Fertil* 112, 107-114.
- Krause A, Scaletta N, Ji JD, Ivashkiv LB (2002) Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3 *J Immunol* 169(11):6610-6616.
- Kreppeels K, Usdin TB, Harta G, Mezey E (1995) PACAP acts through VIP type 2 receptors in the rat testis *Neuropeptides* 29, 315-320.
- Krishnadas A, Onyuksek H, Rubinstein I (2003) Interactions of VIP, secretin and PACAP(1-38) with phospholipids: a biological paradox revisited *Curr Pharm Des* 9, 1005-1012.
- Krupnick JG, Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 289-319.
- Kumar H, Kawai T, Akira S (2011) Pathogen recognition by the innate immune system *Int Rev Immunol* 30(1):16-34.
- Kusunoki N, Kitahara K, Kojima F, Tanaka N, Kaneko K, Endo H, Suguro T, Kawai S (2010) Adiponectin stimulates prostaglandin E(2) production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts *Arthritis Rheum* 62(6):1641-1649.
- Kyburz D, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Gay RE, Carson DA, Gay S (2003) Bacterial peptidoglycans but not CpG oligodeoxynucleotides activate synovial fibroblasts by toll-like receptor signaling *Arthritis Rheum* 48, 642-650.
- Kyttaris VC (2012) Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs *Drug Des Devel Ther* 6:245-250.
- Laburthe M, Rousset M, Boissard C, Chevalier G, Zweibaum A, Rosselin, G (1978) Vasoactive intestinal peptide a potent stimulator of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate accumulation in gut carcinoma cell lines in culture *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 2772-2775.
- Laburthe M, Couvineau A (2002) Molecular pharmacology and structure of VPAC Receptors for VIP and PACAP *Regul Pept* 108, 165-173.
- Laburthe M, Couvineau A, Marie JC (2002) VPAC receptors for VIP and PACAP *Receptors Channels* 8, 137-153.
- Laburthe M, Couvineau A, Tan V (2007) Class II G protein-coupled receptors for VIP and PACAP: structure, models of activation and pharmacology *Peptides* 28(9):1631-1639.
- Laitinen LA, Laitinen A, Salonen RO, Widdicombe JG (1987) Vascular actions of airway neuropeptides *Am Rev Respir Dis* 136(6 Pt 2):S59-64.
- Lang T, Mansell, A (2007) The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways *Immunol Cell Biol* 85, 425-434.
- Langer I (2012) Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012;3:129.
- Lara-Marquez M, O'Dorisio M, O'Dorisio T, Shah M, Karacay B (2001) Selective gene expression and activation-dependent regulation of vasoactive intestinal peptide receptor type 1 and type 2 in human T cells *J Immunol* 166(4):2522-2530.
- Laurence A, Pesu M, Silvennoinen O, O'Shea J (2012) JAK Kinases in Health and Disease: An Update *Open Rheumatol J* 6:232-244.
- Leandro MJ, Becerra-Fernandez E (2011) B-cell therapies in established rheumatoid arthritis *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25(4):535-548.
- Leceta J, Gomariz RP, Martinez C, Carrion M, Arranz A, Juarranz Y (2007) Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation *Neuroimmunomodulation* 14, 134-138.

- Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL (2012) Accessory molecules for Toll-like receptors and their function *Nat Rev Immunol* 12(3):168-179.
- Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, Takeichi M, Brenner MB (2007) Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis *Science* 315(5814):1006-1010.
- Lee YK, Turner H, Maynard CL, Oliver JR, Chen D, Elson CO, Weaver CT (2009) Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage *Immunity* 30(1):92-107.
- Lefèvre S, Kneda A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, Korb A, Schnäker EM, Turner IH, Robbins PD, Evans CH, Stürz H, Steinmeyer J, Gay S, Schölerich J, Pap T, Müller-Ladner U, Neumann E (2009) Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints *Nat Med* 15(12):1414-1420.
- Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptors III New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization *J Biol Chem* 273, 18677-18680.
- Leipe J, Schramm MA, Grunke M, Baeuerle M, Dechant C, Nigg AP, Witt MN, Vielhauer V, Reindl CS, Schulze-Koops H, Skapenko A (2011) Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 70(8):1453-1457.
- Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ, Lerner MR (1991) Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* *J Biol Chem* 266, 11234-11236.
- Li GH, Qian W, Song GQ, Hou XH (2007) Effect of vasoactive intestinal peptide on gastric adenocarcinoma *J Gastroenterol Hepatol* 22(8):1328-1335.
- Li H, Mei Y, Wang Y, Xu L (2006) Vasoactive intestinal peptide suppressed experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting T helper 1 responses *J Clin Immunol* 26: 430-437.
- Li M, Funahashi H, Mbikay M, Shioda S, Arimura A (2004) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated intracrine signaling in the testicular germ cells *Endocrine* 23(1):59-75.
- Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW (2009) Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis *Curr Opin Rheumatol* 21(3):279-283.
- Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses *Nat Rev Immunol* 5, 446-458.
- Lindén A, Hansson L, Andersson A, Palmqvist M, Arvidsson P, Löfdahl CG, Larsson P, Lötvall J (2003) Bronchodilation by an inhaled VPAC(2) receptor agonist in patients with stable asthma *Thorax* 58(3):217-221.
- Lindstrom TM, Robinson WH (2010) A multitude of kinases--which are the best targets in treating rheumatoid arthritis? *Rheum Dis Clin North Am* 36(2):367-383.
- Liu D, Krajniak K, Chun D, Sena M, Casillas R, Lelievre V, Nguyen T, Bravo D, Colburn S, Waschek JA (2001) VIP gene transcription is regulated by far upstream enhancer and repressor elements *Biochem Biophys Res Commun* 284, 211-218.
- Liu FL, Chen CH, Chu SJ, Chen JH, Lai JH, Sytwu HK, Chang DM (2007) Interleukin (IL)-23 p19 expression induced by IL-1beta in human fibroblast-like synoviocytes with rheumatoid arthritis via active nuclear factor-kappaB and AP-1 dependent pathway *Rheumatology (Oxford)* 46(8):1266-1273.
- Liu H, Eksarko P, Temkin V, Haines GK 3rd, Perlman H, Koch AE, Thimmapaya B, Pope RM (2005) Mcl-1 is essential for the survival of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis *J Immunol* 175(12):8337-8345.
- Liu ZQ, Deng GM, Foster S, Tarkowski A (2001) Staphylococcal peptidoglycans induce arthritis *Arthritis Res* 3, 375-380.
- Lodde BM, Delporte C, Goldsmith CM, Tak PP, Baum BJ (2004) A recombinant adenoviral vector encoding functional vasoactive intestinal peptide *Biochem Biophys Res Commun* 319(1):189-192.
- Lodde BM, Mineshiba F, Wang J, Cotrim AP, Afione S, Tak PP, Baum BJ (2006) Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of Sjogren's syndrome *Ann Rheum Dis* 65:195-200.
- Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB (2012) Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ *Arthritis Rheum* 64(6):1697-1707.

- Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, García-Sastre A, Katze MG, Gale M Jr (2008) Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity *J Virol* 82(1):335-345.
- Loo YM, Gale M Jr (2011) Immune signaling by RIG-I-like receptors *Immunity* 34(5):680-692.
- Lundberg P, Bostrom I, Mukohyama H, Bjurholm A, Smans K, Lerner UH (1999) Neuro-hormonal control of bone metabolism: vasoactive intestinal peptide stimulates alkaline phosphatase activity and mRNA expression in mouse calvarial osteoblasts as well as calcium accumulation mineralized bone nodules *Regul Pept* 85, 47-58.
- Lundberg P, Lie A, Bjurholm A, Lehenkari PP, Horton MA, Lerner UH, Ransjo M (2000) Vasoactive intestinal peptide regulates osteoclast activity via specific binding sites on both osteoclasts and osteoblasts *Bone* 27, 803-810.
- Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes *Arthritis Res Ther* 9(1):202.
- Luo JL, Kamata H, Karin M (2005) IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy *J Clin Invest* 115(10):2625-2632.
- Luthra P, Sun D, Silverman RH, He B (2011) Activation of IFN- β ; expression by a viral mRNA through RNase L and MDA5 *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(5):2118-2123.
- Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Harmor AJ (1993) The VIP2 receptor molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide *FEBS Lett* 334, 3-8.
- Luu TN, Dashwood MR, Chester AH, Tadjkarimi S, Yacoub MH (1993) Action of vasoactive intestinal peptide and distribution of its binding sites in vessels used for coronary artery bypass grafts *Am J Cardiol* 71(15):1278-1282.
- Ma HL, Liang S, Li J, Napierata L, Brown T, Benoit S, Senices M, Gill D, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Nickerson-Nutter C, Fouser LA, Young DA (2008) IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation *J Clin Invest* 118(2):597-607.
- Maciejewska Rodrigues H, Jüngel A, Gay RE, Gay S (2009) Innate immunity, epigenetics and autoimmunity in rheumatoid arthritis *Mol Immunol* 47(1):12-18.
- Mackay M, Fantes J, Scherer S, Boyle S, West K, Tsui LC, Belloni E, Lutz E, Van Heyningen V, Harmor AJ (1996) Chromosomal localization in mouse and human of the vasoactive intestinal peptide receptor type 2 gene a possible contributor to the holoprosencephaly 3 phenotype *Genomics* 37, 345-353.
- Madsen B, Georg B, Madsen MW, Fahrenkrug J (2001) Estradiol down regulates expression of vasoactive intestinal polypeptide receptor type-1 in breast cancer cell lines *Mol Cell Endocrinol* 172, 203-211.
- Magistretti PJ, Dietl MM, Hof PR, Martin JL, Palacios JM, Schaad N, Schorderet M (1988) Vasoactive intestinal peptide as a mediator of intercellular communication in the cerebral cortex Release, receptors, actions, and interactions with norepinephrine *Ann N Y Acad Sci* 527, 110-129.
- Magnusson M, Zare F, Tarkowski A (2006) Requirement of type I interferon signaling for arthritis triggered by double-stranded RNA *Arthritis Rheum* 54(1):148-157.
- Makkonen KM, Pasonen-Seppänen S, Törrönen K, Tammi MI, Carlberg C (2009) Regulation of the hyaluronan synthase 2 gene by convergence in cyclic AMP response element-binding protein and retinoid acid receptor signaling *J Biol Chem* 284(27):18270-18281.
- Malhotra RK, Wakade, TD, Wakade AR (1988) Vasoactive intestinal polypeptide and muscarine mobilize intracellular Ca²⁺ through breakdown of phosphoinositides to induce catecholamine secretion Role of IP3 in exocytosis *J Biol Chem* 263, 2123-2126.
- Mapp PI, Kidd BL, Gibson SJ, Terry JM, Revell PA, Ibrahim NB, Blake DR, Polak JM (1990) Substance P-, calcitonin gene-related peptide- and C-flanking peptide of neuropeptide Y-immunoreactive fibres are present in normal synovium but depleted in patients with rheumatoid arthritis *Neuroscience* 7(1):143-13.
- Mapp PI, Walsh DA (2012) Mechanisms and targets of angiogenesis and nerve growth in osteoarthritis *Nat Rev Rheumatol* 8(7):390-398.

- Marinova-Mutafchieva L, Williams RO, Funa K, Maini RN, Zvaifler NJ (2002) Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis *Arthritis Rheum* 46(2):507-513
- Martel-Pelletier J, Pelletier JP (2010) Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? *Eklemler Hastalik Cerrahisi* 21(1):2-14.
- Martinez C, Delgado M, Abad C, Gomariz RP, Ganea D, Leceta J (1999) Regulation of VIP production and secretion by murine lymphocytes *J Neuroimmunol* 93, 126-138.
- McCartney SA, Thackray LB, Gitlin L, Gilfillan S, Virgin HW, Colonna M (2008) MDA-5 recognition of a murine norovirus *PLoS Pathog* 4(7):e1000108.
- McCulloch DA, Lutz EM, Johnson MS, MacKenzie CJ, Mitchell R (2000) Differential activation of phospholipase D by VPAC and PAC1 receptors *Ann N Y Acad Sci* 921:175-185.
- McInnes IB, Schett G (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis *Nat Rev Immunol* 7:429-442.
- McInnes IB, Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis *N Engl J Med* 365(23):2205-2219.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity *Nature* 388, 394-397.
- Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH (2000) The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages *FASEB J* 14(13):2097-2107.
- Miossec P, Kolls JK (2012) Targeting IL-17 and T(H)17 cells in chronic inflammation *Nat Rev Drug Discov* 11(10):763-776.
- Miranda-Carús ME, Balsa A, Benito-Miguel M, Pérez de Ayala C, Martín-Mola E (2004) IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate *J Immunol* 173(2):1463-1476.
- Mitra A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP (2012) Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis *Arthritis Res Ther* 14(2):R65
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells *Biochem Biophys Res Commun* 164, 567-574.
- Molinero P, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM (1985) The interaction of vasoactive intestinal peptide (VIP) with isolated bovine thyroid plasma membranes *Biochem Biophys Res Commun* 128, 1336-1341.
- Moody T W, Hill JM, Jensen RT (2003) VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells *Peptides* 24, 163-177.
- Moody TW, Ito T, Osefo N, Jensen RT (2011) VIP and PACAP: recent insights into their functions/roles in physiology and disease from molecular and genetic studies *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 18(1):61-67.
- Moore CA, Milano SK, Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins *Annu Rev Physiol* 69, 451-482.
- Mor A, Abramson SB, Pillinger MH (2005) The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction *Clin Immunol* 115(2):118-128.
- Moran EM, Mullan R, McCormick J, Connolly M, Sullivan O, Fitzgerald O, Bresnihan B, Veale DJ, Fearon U (2009) Human rheumatoid arthritis tissue production of IL-17A drives matrix and cartilage degradation: synergy with tumor necrosis factor-alpha, Oncostatin M and response to biologic therapies *Arthritis Res Ther* 11(4):R113.
- Moreno D, Gourellet P, De Neef P, Cnudde J, Waelbroeck M, Robberecht P (2000) Development of selective agonists and antagonists for the human vasoactive intestinal polypeptide VPAC(2) receptor *Peptides* 21, 1543-1549.
- Morice A, Unwin RJ, Sever PS (1983) Vasoactive intestinal peptide causes bronchodilatation and protects against histamine-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects *Lancet* 2(8361):1225-1227.
- Morisset J, Douziech N, Rydzewska G, Buscail L, Rivard N (1995) Cell signalling pathway involved in PACAP-induced AR4-2J cell proliferation *Cell Signal* 7(3):195-205.

- Morrow JA, Lutz EM, West KM, Fink G, Harmar AJ (1993) Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a receptor for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) *FEBS Lett* 329, 99-105.
- Moskowitz RW, Altman RD, Hochberg MC, Buckwalter JA, Goldberg VM (2007) Diagnosis and medical/surgical management. 4th edition. Section 1
- Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S (1996) Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice *Am J Pathol* 149(5):1607-1615.
- Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T (2007) Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts *Arthritis Res Ther* 9(6):223.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation *J Exp Med* 198: 1951-1957.
- Nakken B, Munthe LA, Kontinen YT, Sandberg AK, Szekanecz Z, Alex P, Szodoray P (2011) B-cells and their targeting in rheumatoid arthritis--current concepts and future perspectives *Autoimmun Rev* 11(1):28-34.
- Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, Yavuz S, Lipsky PE (2000) Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium *J Immunol* 165(11):6590-6598.
- Nanki T, Lipsky PE (2000) Cytokine, activation marker, and chemokine receptor expression by individual CD4(+) memory T cells in rheumatoid arthritis synovium *Arthritis Res* 2(5):415-423.
- Neumann E, Frommer KW, Vasile M, Müller-Ladner U (2011) Adipocytokines as driving forces in rheumatoid arthritis and related inflammatory diseases? *Arthritis Rheum* 63(5):1159-1169.
- Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U (2010) Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts *Trends Mol Med* 16(10):458-468.
- Neumann JM, Couvineau A, Murail S, Lacapère JJ, Jamin N, Laburthe M (2008) Class-B GPCR activation: is ligand helix-capping the key? *Trends Biochem Sci* 33: 314-319.
- Ng SY, Chow BK, Kasamatsu J, Kasahara M, Lee LT (2012) Agnathan VIP, PACAP and Their Receptors: Ancestral Origins of Today's Highly Diversified Forms *PLoS One* 7(9):e44691.
- Nicole P, Du K, Couvineau A, Laburthe M (1998) Site-directed mutagenesis of human vasoactive intestinal peptide receptor subtypes VIP1 and VIP2 evidence for difference in the structure-function relationship *J Pharmacol Exp Ther* 284, 744-750.
- Nicole P, Lins L, Rouyer-Fessard C, Drouot C, Fulcrand P, Thomas A, Couvineau A, Martinez J, Brasseur R, Laburthe M (2000a) Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide *J Biol Chem* 275, 24003-24012.
- Nicole P, Rouyer-Fessard C, Couvineau A, Drouot C, Fulcrand P, Martinez J, Laburthe M (2000b) Alanine scanning of VIP Structure-function relationship for binding to human recombinant VPAC1 receptor *Ann N Y Acad Sci* 921, 352-356.
- Nilsson SF, De Neef P, Robberecht P, Christophe J (1994) Characterization of ocular receptors for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and their coupling to adenylate cyclase *Exp Eye Res* 58, 459-467.
- Nistala K, Adams S, Cambrook H, Ursu S, Olivito B, de Jager W, Evans JG, Cimaz R, Bajaj-Elliott M, Wedderburn LR (2010) Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33):14751-14756.
- Noss EH, Brenner MB (2008) The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis *Immunol Rev* 223:252-270.
- Odink K, Cerletti N, Brügggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C (1987) Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis *Nature* 330(6143):80-82.
- Ogi K, Miyamoto Y, Masuda Y, Habata Y, Hosoya M, Ohtaki T, Masuo Y, Onda H, Fujino M (1993) Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor *Biochem Biophys Res Commun* 196(3):1511-1521.

- Okamoto H, Cujec TP, Yamanaka H, Kamatani N (2008) Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of transcription factors *FEBS J* 275(18):4463-4470.
- Okamoto K, Takayanagi H (2011a) Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development *Int Immunopharmacol* 11(5):543-548.
- Okamoto K, Takayanagi H (2011b) Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis *Arthritis Res Ther* 13(3):219.
- Oliva D, Nicosia S, Spada A, Giannattasio G (1982) VIP stimulates ACTH release and adenylate cyclase in human ACTH-secreting pituitary adenomas *Eur J Pharmacol* 83, 101-105.
- Olsson C, Holmgren S (2001) The control of gut motility *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 128(3):481-503.
- Omary MB, Kagnoff MF (1987) Identification of nuclear receptors for VIP on a human colonic adenocarcinoma cell line *Science* 238(4833):1578-1581.
- Onyüksel H, Mohanty PS, Rubinstein I (2009) VIP-grafted sterically stabilized phospholipid nanomicellar 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin: a novel targeted nanomedicine for breast cancer *Int J Pharm* 365: 157-161.
- O'Shea JJ, Park H, Pesu M, Borie D, Changelian P (2005) New strategies for immunosuppression: interfering with cytokines by targeting the Jak/Stat pathway *Curr Opin Rheumatol* 17(3):305-311.
- Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP, Gay RE, Gay S, Kyburz D (2008) 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* 58(12):3684-3692.
- Ospelt C, Gay S (2008) The role of resident synovial cells in destructive arthritis *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22(2):239-252.
- Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gómez-Reino JJ, Gualillo O (2005) Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights *FEBS Lett* 579(2):295-301.
- Ottesen B, Fahrenkrug J (1995) Vasoactive intestinal polypeptide and other preprovasoactive intestinal polypeptide-derived peptides in the female and male genital tract: localization, biosynthesis, and functional and clinical significance *Am J Obstet Gynecol* 172, 1615-1631.
- Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG (2011) Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease *Annu Rev Immunol* 29:71-109.
- Pablos Álvarez JL (2006) Nuevas dianas terapéuticas en artritis reumatoide *IV Simposio de Artritis Reumatoide* S9-S12 Volume 2, Supplement 2 (March).
- Palmer JB, Cuss FM, Barnes PJ (1986) VIP and PHM and their role in nonadrenergic inhibitory responses in isolated human airways *J Appl Physiol* 61(4):1322-1328.
- Pandolf SJ, Dharmasathaphorn K, Schoeffield MS, Vale W, Rivier J (1986) Vasoactive intestinal peptide receptor antagonist [4Cl-D-Phe⁶, Leu¹⁷] VIP *Am J Physiol* 250, G553-557.
- Pap T, Franz JK, Hummel KM, Jeisy E, Gay R, Gay S (2000) Activation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: lack of Expression of the tumour suppressor PTEN at sites of invasive growth and destruction *Arthritis Res* 2(1):59-64.
- Papadimitraki ED, Bertsias GK, Boumpas DT (2007) Toll like receptors and autoimmunity: A critical appraisal *J Autoimmun* 29, 310-318.
- Passemard S, Sokolowska P, Schwendimann L, Gressens P (2011) VIP-induced neuroprotection of the developing brain *Curr Pharm Des* 17(10):1036-1039.
- Peck A, Mellins ED (2010) Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example *Immunology* 129(2):147-153.
- Pei L (1996) Identification of a negative glucocorticoid response element in the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene *J Biol Chem* 271, 20879-20884.
- Pereira D, Peleteiro B, Araújo J, Branco J, Santos RA, Ramos E (2011) The effect of osteoarthritis definition on prevalence and incidence estimates: a systematic review *Osteoarthritis Cartilage* 19(11):1270-1285.
- Perera C, McNeil HP, Geczy CL (2010) S100 Calgranulins in inflammatory arthritis *Immunol Cell Biol* 88(1):41-49.

- Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G (2011) An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: a never-ending story *Autoimmun Rev* 10(10):599-608.
- Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Müller R, Goldring SR, Choi Y, Benoist C, Gravallesse EM (2001) TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis *Am J Pathol* 159(5):1689-1699.
- Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravallesse EM (2006) RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis *Rheumatology (Oxford)* 45(9):1068-1076.
- Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Way M, Schiavo G, Reis e Sousa C (2009) Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection *J Virol* 83(20):10761-10769.
- Pierer M, Rethage J, Seibl R, Lauener R, Brentano F, Wagner U, Hantzschel H, Michel BA, Gay RE, Gay S, Kyburz D (2004) Chemokine secretion of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts stimulated by Toll-like receptor 2 ligands *J Immunol* 172(2):1256-1265.
- Pierer M, Wagner U, Rossol M, Ibrahim S (2011) Toll-like receptor 4 is involved in inflammatory and joint destructive pathways in collagen-induced arthritis in DBA1J mice *PLoS One* 6: e23539.
- Pierer M, Rothe K, Quandt D, Schulz A, Rossol M, Scholz R, Baerwald C, Wagner U (2012) Association of anticytomegalovirus seropositivity with more severe joint destruction and more frequent joint surgery in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 64(6):1740-1749.
- Pifer R, Benson A, Sturge CR, Yarovinsky F (2011) UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii* *J Biol Chem* 286(5):3307-3314
- Pilling D, Akbar AN, Girdlestone J, Orteu CH, Borthwick NJ, Amft N, Scheel-Toellner D, Buckley CD, Salmon M (1999) Interferon-beta mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis *Eur J Immunol* 29(3):1041-1050.
- Pillinger MH, Rosenthal PB, Tolani SN, Apsel B, Dinsell V, Greenberg J, Chan ES, Gomez PF, Abramson SB (2003) Cyclooxygenase-2-derived E prostaglandins down-regulate matrix metalloproteinase-1 expression in fibroblast-like synoviocytes via inhibition of extracellular signal-regulated kinase activation *J Immunol* 171(11):6080-6089.
- Pincus DW, DiCicco-Bloom EM, Black IB (1990) Vasoactive intestinal peptide regulation of neuroblast mitosis and survival: role of cAMP *Brain Res* 514, 355-357.
- Pincus DW, DiCicco-Bloom E, Black IB (1994) Trophic mechanisms regulate mitotic neuronal precursors: role of vasoactive intestinal peptide (VIP) *Brain Res* 663, 51-60.
- Pisegna JR, Wank SA (1996) Cloning and characterization of the signal transduction of four splice variants of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor Evidence for dual coupling to adenylate cyclase and phospholipase C *J Biol Chem* 271, 17267-17274.
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases *Annu Rev Biochem* 67, 653-692.
- Plumet S, Herschke F, Bourhis JM, Valentin H, Longhi S, Gerlier D (2007) Cytosolic 5'-triphosphate ended viral leader transcript of measles virus as activator of the RIG I-mediated interferon response *PLoS One* 2(3):e279.
- Pope RM, Shahrara S (2012) Possible roles of IL-12-family cytokines in rheumatoid arthritis *Nat Rev Rheumatol* Oct 23. doi: 10.1038/nrrheum.2012.170. [Epub ahead of print]
- Prieto JC, Laburthe M, Rosselin G (1979) Interaction of vasoactive intestinal peptide with isolated intestinal epithelial cells from rat 1 Characterization, quantitative aspects and structural requirements of binding sites *Eur J Biochem* 96, 229-237.
- Prieto JC, Laburthe M, Hoa DH, Rosselin G (1981) Quantitative studies of vasoactive intestinal peptide (VIP) binding sites and VIP-induced adenosine 3'5'-monophosphate production in epithelial cells from duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon and rectum in the rat *Acta Endocrinol (Copenh)* 96, 100-106.
- Qu F, Liu HJ, Xiang Y, Tan YR, Liu C, Zhu XL, Qin XQ (2011) Activation of CFTR trafficking and gating by vasoactive intestinal peptide in human bronchial epithelial cells *J Cell Biochem* 112(3):902-908.

- Radaeva S, Sun R, Pan HN, Hong F, Gao B (2004) Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation *Hepatology* 39:1332-1328.
- Radstake TR, Roelofs MF, Jenniskens YM, Oppers-Walgreen B, van Riel PL, Barrera P, Joosten LA, van den Berg WB (2004) Expression of toll-like receptors 2 and 4 in rheumatoid synovial tissue and regulation by proinflammatory cytokines interleukin-12 and interleukin-18 via interferon-gamma *Arthritis Rheum* 50(12):3856-3865.
- Rafferty S, Alcolado N, Norez C, Chappe F, Pelzer S, Becq F, Chappe V (2009) Rescue of functional F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by vasoactive intestinal peptide in the human nasal epithelial cell line JME/CF15 *J Pharmacol Exp Ther* 331(1):2-13.
- Rainbow R, Ren W, Zeng L (2012) Inflammation and Joint Tissue Interactions in OA: Implications for Potential Therapeutic Approaches *Arthritis* 2012 ID:741582.
- Rajan P, Symes AJ, Fink JS (1996) STAT proteins are activated by ciliary neurotrophic factor in cells of central nervous system origin *J Neurosci Res* 43, 403-411.
- Rameshwar P, Gascon P, Oh HS, Denny TN, Zhu G, Ganea D (2002) Vasoactive intestinal peptide (VIP) inhibits the proliferation of bone marrow progenitors through the VPAC1 receptor *Exp Hematol* 30, 1001-1009.
- Reed HE, Cutler DJ, Brown TM, Brown J, Coen CW, Piggins HD (2002) Effects of vasoactive intestinal polypeptide on neurones of the rat suprachiasmatic nuclei in vitro *J Neuroendocrinol* 14, 639-646.
- Reginster JY (2002) The prevalence and burden of arthritis *Rheumatology* 41 Supp 1:3-6.
- Reichlin S (1988) Neuroendocrine significance of vasoactive intestinal polypeptide *Ann N Y Acad Sci* 527, 431-449.
- Rekasi Z, Varga JL, Schally AV, Halmos G, Groot K, Czompoly T (2000) Antagonistic actions of analogs related to growth hormone-releasing hormone (GHRH) on receptors for GHRH and vasoactive intestinal peptide on rat pituitary and pineal cells in vitro *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1218-1223.
- Ren J, Feng Z, Lv Z, Chen X, Li J (2011) Natural killer-22 cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis are an innate source of interleukin 22 and tumor necrosis factor- α *J Rheumatol* 38(10):2112-2118.
- Revell PA, al-Saffar N, Fish S, Osei D (1995) Extracellular matrix of the synovial intimal cell layer *Ann Rheum Dis* 54:404-407.
- Rhee DK, Marcelino J, Baker M, Gong Y, Smits P, Lefebvre V, Jay GD, Stewart M, Wang H, Warman ML, Carpten JD (2005) The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth *J Clin Invest* 115(3):622-631.
- Rico MC, Rough JJ, Del Carpio-Cano FE, Kunapuli SP, DeLa Cadena RA (2010) The axis of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor: an emerging therapeutic target in rheumatoid arthritis *Curr Vasc Pharmacol* 8(3):338-343.
- Riou F, Cespuglio R, Jouvet M (1981) Hypnogenic properties of the vasoactive intestinal polypeptide in rats *C R Seances Acad Sci III* 293, 679-862.
- Rissoan MC, Van Kooten C, Chomarar P, Galibert L, Durand I, Thivolet-Bejui F, Miossec P, Banchereau J (1996) The functional CD40 antigen of fibroblasts may contribute to the proliferation of rheumatoid synovium *Clin Exp Immunol* 106(3):481-490.
- Rodriguez-Henche N, Rodriguez-Pena MS, Guijarro LG, Prieto JC (1994) Characterization of vasoactive intestinal peptide receptors in human liver *Biochim Biophys Acta* 1221, 193-198.
- Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, van Lieshout AW, Sprong T, van den Hoogen FH, van den Berg WB, Radstake TR (2005) The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells *Arthritis Rheum* 52(8):2313-2322.
- Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB, Radstake TR (2006) Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis *J Immunol* 176(11):7021-7027.
- Roelofs MF, Wenink MH, Brentano F, Abdollahi-Roodsaz S, Oppers-Walgreen B, Barrera P, van Riel PL, Joosten LA, Kyburz D, van den Berg WB, Radstake TR (2009) Type I interferons might form the link between Toll-

- like receptor (TLR) 3/7 and TLR4-mediated synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA) *Ann Rheum Dis* 68(9):1486-1493.
- Román-Blas JA, Jimenez SA (2006) NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis *Osteoarthritis Cartilage* 14(9):839-48.
- Román-Blas JA, Contreras-Blasco MA, Largo R, Alvarez-Soria MA, Castañeda S, Herrero-Beaumont G (2009) Differential effects of the antioxidant n-acetylcysteine on the production of catabolic mediators in IL-1beta-stimulated human osteoarthritic synoviocytes and chondrocytes *Eur J Pharmacol* 623(1-3):125-131.
- Romanelli F, Fillo S, Isidori A, Conte D (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide regulates rat Leydig cell function in vitro *Neuropeptides* 31, 311-317.
- Rong C, Hu W, Wu FR, Cao XJ, Chen FH (2012) Interleukin-23 as a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis *Mol. Cell Biochem* 361: 243-248.
- Rooney M, Condell D, Quinlan W, Daly L, Whelan A, Feighery C, Bresnihan B (1988) Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 31(8):956-963.
- Rosengren S, Corr M, Boyle DL (2010) Platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta synergistically potentiate inflammatory mediator synthesis by fibroblast-like synoviocytes *Arthritis Res Ther* 12(2):R65.
- Ross MH, Ross, Pawlina W (2007) *Histología Ed. Médica Panamericana*, 5ª ed, ISBN 9500604353, 9789500604352.
- Roth-Cross JK, Bender SJ, Weiss SR (2008) Murine coronavirus mouse hepatitis virus is recognized by MDA5 and induces type I interferon in brain macrophages/microglia *J Virol* 82(20):9829-9838.
- Ruland J (2011) Return to homeostasis: downregulation of NF-kB responses *Nat Immunol* 12(8):709-714.
- S.E.R. *Manual de las enfermedades reumáticas* (2008) Ed. Médica Panamericana, 5ª ed, ISBN 8498351057, 9788498351057.
- Saal JG, Krimmel M, Steidle M, Gerneth F, Wagner S, Fritz P, Koch S, Zacher J, Sell S, Einsele H, Müller CA (1999) Synovial Epstein-Barr virus infection increases the risk of rheumatoid arthritis in individuals with the shared HLA-DR4 epitope *Arthritis Rheum* 42(7):1485-1496.
- Sabeh F, Fox D, Weiss SJ (2010) Membrane-type I matrix metalloproteinase-dependent regulation of rheumatoid arthritis synovocyte function *J Immunol* 184(11):6396-6406.
- Sachs A, Wahle E (1993) Poly(A) tail metabolism and function in eucaryotes *J Biol Chem* 268(31):22955-22958.
- Sadouk MB, Pelletier JP, Tardif G, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J (1995) Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor *Lab Invest* 73(3):347-355.
- Said SI (1986) Vasoactive intestinal peptide *J Endocrinol Invest* 9, 191-200.
- Said SI, Mutt V (1970) Potent peripheral and splanchnic vasodilator peptide from normal gut *Nature* 225(5235):863-864.
- Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M Jr (2007) Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2 *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(2):582-587.
- Saitoh S, Miyake K (2009) Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors *Immunol Rev* 227(1):32-43.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N (2005) Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system *Curr Opin Immunol* 17(6):589-594.
- Salminen-Mankonen HJ, Morko J, Vuorio E (2007) Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis *Curr Drug Targets* 8(2):315-323.
- Salmon M, Scheel-Toellner D, Huissoon AP, Pilling D, Shamsadeen N, Hyde H, D'Angeac AD, Bacon PA, Emery P, Akbar AN (1997) Inhibition of T cell apoptosis in the rheumatoid synovium *J Clin Invest* 99(3):439-446.
- Salvador G, Sanmarti R, Garcia-Peiró A, Rodríguez-Cros JR, Muñoz-Gómez J, Cañete JD (2005) p53 expression in rheumatoid and psoriatic arthritis synovial tissue and association with joint damage *Ann Rheum Dis* 64(2):183-187.

- Samanta M, Iwakiri D, Kanda T, Imaizumi T, Takada K (2006) EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN *EMBO J* 25(18):4207-4214.
- Sandell LJ (2012) Etiology of osteoarthritis: genetics and synovial joint development *Nat Rev Rheumatol* 8(2):77-89.
- Santana-de Anda K, Gómez-Martín D, Díaz-Zamudio M, Alcocer-Varela J (2011) Interferon regulatory factors: beyond the antiviral response and their link to the development of autoimmune pathology *Autoimmun Rev* 11(2):98-103.
- Santangelo KS, Johnson AL, Ruppert AS, Bertone AL (2007) Effects of hyaluronan treatment on lipopolysaccharide-challenged fibroblast-like synovial cells *Arthritis Res Ther* 9(1):R1.
- Sarkar S, Fox DA (2010) Targeting IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis *Rheum Dis Clin North Am* 36(2):345-366.
- Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H (2006) Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction *J Exp Med* 203(12):2673-2682.
- Sato M, Hata N, Asagiri M, Nakaya T, Taniguchi T, Tanaka N (1998) Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7 *FEBS Lett* 441(1):106-110.
- Savarese E, Chae OW, Trowitzsch S, Weber G, Kastner B, Akira S, Wagner H, Schmid RM, Bauer S, Krug A (2006) U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7 *Blood* 107(8):3229-3234.
- Sawada S, Takei M, Inomata H, Nozaki T, Shiraiwa H (2007) What is after cytokine-blocking therapy, a novel therapeutic target--synovial Epstein-Barr virus for rheumatoid arthritis *Autoimmun Rev* 6(3):126-130.
- Scaldefferri L, Arora K, Lee SH, Catt KJ, Moretti C (1996) Expression of PACAP and its type-I receptor isoforms in the rat ovary *Mol Cell Endocrinol* 117, 227-232.
- Scanzello CR, Goldring SR (2012) The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis *Bone* 51(2):249-257.
- Schedel J, Seemayer CA, Pap T, Neidhart M, Kuchen S, Michel BA, Gay RE, Müller-Ladner U, Gay S, Zacharias W (2004) Targeting cathepsin L (CL) by specific ribozymes decreases CL protein synthesis and cartilage destruction in rheumatoid arthritis *Gene Ther* 11(13):1040-1047.
- Schelbergen RF, Blom AB, van den Bosch MH, Sløetjes A, Abdollahi-Roodsaz S, Schreurs BW, Mort JS, Vogl T, Roth J, van den Berg WB, van Lent PL (2012) Alarmins S100A8 and S100A9 elicit a catabolic effect in human osteoarthritic chondrocytes that is dependent on Toll-like receptor 4 *Arthritis Rheum* 64(5):1477-1487.
- Schett G, Tohidast-Akrad M, Smolen JS, Schmid BJ, Steiner CW, Bitzan P, Zenz P, Redlich K, Xu Q, Steiner G (2000) Activation, differential localization, and regulation of the stress-activated protein kinases, extracellular signal-regulated kinase, c-JUN N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase, in synovial tissue and cells in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 43(11):2501-2512.
- Schett G, Zwerina J, Firestein G (2008) The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 67(7):909-916.
- Schett G, Firestein GS (2010) Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 69(5):787-789.
- Schmidt A, Rothenfusser S, Hopfner KP (2012) Sensing of viral nucleic acids by RIG-I: from translocation to translation *Eur J Cell Biol* 91(1):78-85.
- Schroepel JP, Crist JD, Anderson HC, Wang J (2011) Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis *Histol Histopathol* 26(3):377-394.
- Scott BB, Weisbrot LM, Greenwood JD, Bogoch ER, Paige CJ, Keystone EC (1997) Rheumatoid arthritis synovial fibroblast and U937 macrophage/monocyte cell line interaction in cartilage degradation *Arthritis Rheum* 40(3):490-498.
- Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW (2010) Rheumatoid arthritis *Lancet* 376(9746):1094-1108.
- Scott DL (2012) Biologics-based therapy for the treatment of rheumatoid arthritis *Clin Pharmacol Ther* 91(1):30-43.

- Seibl R, Birchler T, Loeliger S, Hossle JP, Gay RE, Saurenmann T, Michel BA, Seger RA, Gay S, Lauener RP (2003) Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium *Am J Pathol* 162, 1221-1227.
- Sellam J, Berenbaum F (2010) The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis *Nat Rev Rheumatol* 6(11):625-635.
- Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM 2nd, Pope RM (2008) TH-17 cells in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 10(4):R93.
- Shahrara S, Pickens SR, Mandelin AM 2nd, Karpus WJ, Huang Q, Kolls JK, Pope RM (2010) IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction *J Immunol* 184(8):4479-4487.
- Sherwood NM, Krueckl SL, McRory JE (2000): The origin and function of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/glucagon superfamily *Endocr Rev* 21, 619-670.
- Sheward WJ, Lutz EM, Harmar AJ (1995) The distribution of vasoactive intestinal peptide2 receptor messenger RNA in the rat brain and pituitary gland as assessed by in situ hybridization *Neuroscience* 67, 409-418.
- Shi K, Hayashida K, Kaneko M, Hashimoto J, Tomita T, Lipsky PE, Yoshikawa H, Ochi T (2001) Lymphoid chemokine B cell-attracting chemokine-1 (CXCL13) is expressed in germinal center of ectopic lymphoid follicles within the synovium of chronic arthritis patients *J Immunol* 166(1):650-655.
- Shibakawa A, Aoki H, Masuko-Hongo K, Kato T, Tanaka M, Nishioka K, Nakamura H (2003) Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character *Osteoarthritis Cartilage* 11(2):133-140.
- Shiozawa S, Tsumiyama K (2009) Pathogenesis of rheumatoid arthritis and c-Fos/AP-1 *Cell Cycle* 8(10):1539-1543.
- Shiozawa S, Tsumiyama K, Yoshida K, Hashiramoto A (2011) Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 59(2):89-95.
- Simmonds RE, Foxwell BM (2008) Signalling, inflammation and arthritis: NF- κ B and its relevance to arthritis and inflammation *Rheumatology (Oxford)* 47:584-590.
- Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom EE, Sims JE, Dower SK (2000) Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways *J Biol Chem* 275(7):4670-4678.
- Smeets TJ, Dayer JM, Kraan MC, Versendaal J, Chicheportiche R, Breedveld FC, Tak PP (2000) The effects of interferon-beta treatment of synovial inflammation and expression of metalloproteinases in patients with rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 43(2):270-274.
- Smeets TJ, Barg EC, Kraan MC, Smith MD, Breedveld FC, Tak PP (2003) Analysis of the cell infiltrate and expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in arthroscopic synovial biopsies: comparison with synovial samples from patients with end stage, destructive rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 62(7):635-638.
- Smith MD, Kraan MC, Slavotinek J, Au V, Weedon H, Parker A, Coleman M, Roberts-Thomson PJ, Ahern MJ (2001) Treatment-induced remission in rheumatoid arthritis patients is characterized by a reduction in macrophage content of synovial biopsies *Rheumatology (Oxford)* 40(4):367-374.
- Smith MD, Barg E, Weedon H, Papangelis V, Smeets T, Tak PP, Kraan M, Coleman M, Ahern MJ (2003) Microarchitecture and protective mechanisms in synovial tissue from clinically and arthroscopically normal knee joints *Ann Rheum Dis* 62(4):303-307.
- Smith MD (2011) The Normal Synovium *Open Rheumatol J* 5: 100-106.
- Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P (2007) New therapies for treatment of rheumatoid arthritis *Lancet* 370(9602):1861-1874.
- Sobotta J, Welsch U (2009) Histología Ed. Médica Panamericana, 2ª ed, ISBN 8498351782, 9788498351781.
- Solano RM, Carmena MJ, Carrero I, Cavallaro S, Roman F, Hueso C, Travali S, Lopez-Fraile N, Guijarro LG, Prieto JC (1996) Characterization of vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptors in human benign hyperplastic prostate *Endocrinology* 137, 2815-2822.

- Solano RM, Carmena MJ, Busto R, Sanchez-Chapado M, Guijarro LG, Prieto JC (1999) Identification and functional properties of the pituitary adenylate cyclase activating peptide (PAC1) receptor in human benign hyperplastic prostate *Cell Signal* 11, 813-819.
- Sonnerberg GF, Fouse LA, Artis D (2011) Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22 *Nat Immunol* 12:383-390.
- Sorg O, Magistretti PJ (1992) Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition *J Neurosci* 12, 4923-4931.
- Souza-Moreira L, Campos-Salinas J, Caro M, Gonzalez-Rey E (2011) Neuropeptides as pleiotropic modulators of the immune response *Neuroendocrinology* 94(2):89-100.
- Spector NH (1987) Old and new strategies in the conditioning of immune responses *Ann N Y Acad Sci* 496:522-531.
- Spector NH (1996) Neuroimmunomodulation: a brief review. Can conditioning of natural killer cell activity reverse cancer and/or aging? *Regul Toxicol Pharmacol* 24(1 Pt 2):S32-38.
- Sreedharan SP, Huang JX, Cheung MC, Goetzl EJ (1995) Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2939-2943.
- Stanton H, Rogerson FM, East CJ, Golub SB, Lawlor KE, Meeker CT, Little CB, Last K, Farmer PJ, Campbell IK, Fourie AM, Fosang AJ (2005) ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro *Nature* 434(7033):648-652.
- Steenvoorden MM, Bank RA, Roodman CD, Toes RE, Huizinga TW, DeGroot J (2007) Fibroblast-like synoviocyte-chondrocyte interaction in cartilage degradation *Clin Exp Rheumatol* 25(2):239-245.
- Sterberg, E.M (2006) Neural regulation of innate immunity: a coordinates nonspecific host response to pathogens *Nat Rev Immunol* 6:318-328.
- Summers MA, O'Dorisio MS, Cox MO, Lara-Marquez M, Goetzl EJ (2003) A lymphocyte-generated fragment of vasoactive intestinal peptide with VPAC1 agonist activity and VPAC2 antagonist effects *J Pharmacol Exp Ther* 306, 638-645.
- Sumpter R Jr, Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M Jr (2005) Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I *J Virol* 79(5):2689-2699.
- Sunahori K, Yamamura M, Yamana J, Takasugi K, Kawashima M, Yamamoto H, Chazin WJ, Nakatani Y, Yui S, Makino H (2006) The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 8(3):R69.
- Sundarrajan M, Boyle DL, Chabaud-Riou M, Hammaker D, Firestein GS (2003) Expression of the MAPK kinases MKK-4 and MKK-7 in rheumatoid arthritis and their role as key regulators of JNK *Arthritis Rheum* 48(9):2450-2460.
- Suri P, Morgenroth DC, Hunter DJ (2012) Epidemiology of osteoarthritis and associated comorbidities *PM R* 4(5 Suppl):S10-9.
- Suzuki K, Imaizumi T, Tsugawa K, Ito E, Tanaka H (2007) Expression of retinoic acid-inducible gene-I in lupus nephritis *Nephrol Dial Transplant* 22(8):2407-2409.
- Suzuki M, Tetsuka T, Yoshida S, Watanabe N, Kobayashi M, Matsui N, Okamoto T (2000) The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF-alpha- or IL-1beta-stimulated rheumatoid synovial fibroblasts *FEBS Lett* 465(1):23-27.
- Sweeney SE, Firestein GS (2004) Rheumatoid arthritis: regulation of synovial inflammation *Int J Biochem Cell Biol* 36(3):372-378.
- Sweeney SE, Mo L, Firestein GS (2007) Antiviral gene expression in rheumatoid arthritis: role of IKKepsilon and interferon regulatory factor 3 *Arthritis Rheum* 56(3):743-752.
- Sweeney SE, Kimbler TB, Firestein GS (2010) Synoviocyte innate immune responses: II. Pivotal role of IFN regulatory factor 3 *J Immunol* 184(12):7162-7168.

- Symes A, Lewis S, Corpus L, Rajan P, Hyman SE, Fink JS (1994) STAT proteins participate in the regulation of the vasoactive intestinal peptide gene by the ciliary neurotrophic factor family of cytokines *Mol Endocrinol* 8, 1750-1763.
- Symes A, Gearan T, Eby J, Fink JS (1997) Integration of Jak-Stat and AP-1 signaling pathways at the vasoactive intestinal peptide cytokine response element regulates ciliary neurotrophic factor-dependent transcription *J Biol Chem* 272, 9648-9654.
- Szekanecz Z, Pakozdi A, Szentpetery A, Besenyei T, Koch AE (2009) Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis *Front Biosci (Elite Ed)* 1:44-51.
- Szekanecz Z, Besenyei T, Szentpétery A, Koch AE (2010) Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis *Curr Opin Rheumatol* 22(3):299-306.
- Szekanecz Z, Koch AE, Tak PP (2011) Chemokine and chemokine receptor blockade in arthritis, a prototype of immune-mediated inflammatory diseases *Neth J Med* 69(9):356-366.
- Szema AM, Hamidi SA, Koller A, Martin DW. 2011 Vasoactive Intestinal Peptide Knockout (VIP KO) mouse model of sulfite-sensitive asthma: up-regulation of novel lung carbonyl reductase *BMC Immunol* 21;12:66.
- Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10):3516-3521.
- Tachibana T, Saito ES, Takahashi H, Saito S, Tomonaga S, Boswell T, Furuse M (2004) Anorexigenic effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in the chick brain are mediated by corticotrophin-releasing factor *Regul Pept* 120(1-3):99-105.
- Tak PP, Hart BA, Kraan MC, Jonker M, Smeets TJ, Breedveld FC (1999) The effects of interferon beta treatment on arthritis *Rheumatology (Oxford)* 38(4):362-369.
- Tak PP, Zvaifler NJ, Green DR, Firestein GS (2000) Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases *Immunol Today* 21(2):78-82.
- Takahashi Y, Murai C, Ishii T, Sugamura K, Sasaki T (1998) Human parvovirus B19 in rheumatoid arthritis *Int Rev Immunol* 17(5-6):309-321.
- Takayanagi H, Oda H, Yamamoto S, Kawaguchi H, Tanaka S, Nishikawa T, Koshihara Y (1997) A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis *Biochem Biophys Res Commun* 240(2):279-286.
- Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, Koshihara Y, Oda H, Nakamura K, Tanaka S (2000) Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 43(2):259-269.
- Takayanagi H (2009) Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone *Nat Rev Rheumatol* 5(12):667-676.
- Takei M, Mitamura K, Fujiwara S, Horie T, Ryu J, Osaka S, Yoshino S, Sawada S (1997) Detection of Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 and latent membrane protein 1 in synovial lining cells from rheumatoid arthritis patients *Int Immunol* 9(5):739-743.
- Takemura S, Braun A, Crowson C, Kurtin PJ, Cofield RH, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM J (2001) Lymphoid Neogenesis in Rheumatoid Synovitis *J Immunol* 167:1072-1080.
- Tams JW, Jorgensen RM, Holm A, Fahrenkrug J (2000) Creation of a selective antagonist and agonist of the rat VPAC(1) receptor using a combinatorial approach with vasoactive intestinal peptide 6-23 as template *Mol Pharmacol* 58, 1035-1041.
- Tan YV, Waschek JA (2011) Targeting VIP and PACAP receptor signalling: new therapeutic strategies in multiple sclerosis *ASN Neuro* 6;3(4).
- Terabe F, Kitano M, Kawai M, Kuwahara Y, Hirano T, Arimitsu J, Hagihara K, Shima Y, Narazaki M, Tanaka T, Kawase I, Sano H, Ogata A (2009) Imatinib mesylate inhibited rat adjuvant arthritis and PDGF-dependent growth of synovial fibroblast via interference with the Akt signaling pathway *Mod Rheumatol* 19(5):522-529.
- Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM (2008) MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation *Rheumatology (Oxford)* 47(4):409-414

- Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH (2005) Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity *Annu Rev Immunol* 23:307-336.
- Theofilopoulos AN, Gonzalez-Quintal R, Lawson BR, Koh YT, Stern ME, Kono DH, Beutler B, Baccala R (2010) Sensors of the innate immune system: their link to rheumatic diseases *Nat Rev Rheumatol* 6(3):146-156.
- Timmer TC, Baltus B, Vondenhoff M, Huizinga TW, Tak PP, Verweij CL, Mebius RE, van der Pouw Kraan TC (2007) Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomics technology: identification of the interleukin-7 signaling pathway in tissues with lymphoid neogenesis *Arthritis Rheum* 56(8):2492-2502.
- Toccafondi RS, Brandi ML, Melander A (1984) Vasoactive intestinal peptide stimulation of human thyroid cell function *J Clin Endocrinol Metab* 58, 157-160.
- Tompkins JD, Hardwick JC, Locknar SA, Merriam LA, Parsons RL (2006) Ca²⁺ influx, but not Ca²⁺ release from internal stores, is required for the PACAP-induced increase in excitability in guinea pig intracardiac neurons *J Neurophysiol* 95(4):2134-2142.
- Too CL, Yahya A, Murad S, Dhaliwal JS, Larsson PT, Muhamad NA, Abdullah NA, Mustafa AN, Klareskog L, Alfredsson L, Padyukov L, Bengtsson C; MyEIRA study group (2012) Smoking interacts with HLA-DRB1 shared epitope in the development of anti-citrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis: results from the Malaysian Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (MyEIRA) *Arthritis Res Ther* 14(2):R89.
- Tornøe K, Hannibal J, Fahrenkrug J, Holst JJ (1997) PACAP-(1-38) as neurotransmitter in pig pancreas: receptor activation revealed by the antagonist PACAP-(6-38) *Am J Physiol* 273, G436-446.
- Triantaphyllopoulos KA, Williams RO, Tailor H, Chernajovsky Y (1999) Amelioration of collagen-induced arthritis and suppression of interferon-gamma, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha production by interferon-beta gene therapy *Arthritis Rheum* 42(1):90-99.
- Tsukada T, Horovitch SJ, Montminy MR, Mandel G, Goodman RH (1985) Structure of the human vasoactive intestinal polypeptide gene *DNA* 4, 293-300.
- Turner JT, Jones SB, Bylund DB (1986) A fragment of vasoactive intestinal peptide, VIP(10-28), is an antagonist of VIP in the colon carcinoma cell line, HT29 *Peptides* 7, 849-854.
- Uchida D, Tatsuno I, Tanaka T, Hirai A, Saito Y, Moro O, Tajima M (1998) Maxadilan is a specific agonist and its deleted peptide (M65) is a specific antagonist for PACAP type 1 receptor *Ann N Y Acad Sci* 865, 253-258.
- Uematsu S, Akira S (2006) Toll-like receptors and innate immunity *J Mol Med (Berl)* 84(9):712-25
- Ueno A, Yamamura M, Iwahashi M, Okamoto A, Aita T, Ogawa N, Makino H (2005) The production of CXCR3-agonistic chemokines by synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis *Rheumatol Int* 25(5):361-367.
- Unverferth DV, O'Dorisio TM, Muir WW 3rd, White J, Miller MM, Hamlin RL, Magorien RD (1985) Effect of vasoactive intestinal polypeptide on the canine cardiovascular system *J Lab Clin Med* 106(5):542-550.
- Usdin TB, Bonner TI, Mezey E (1994) Two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions *Endocrinology* 135, 2662-2680.
- Valdehita A, Bajo AM, Fernández-Martínez AB, Arenas MI, Vacas E, Valenzuela P, Ruíz-Villaespesa A, Prieto JC, Carmena MJ (2010) Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer *Peptides* 31(11):2035-2045.
- Valencia X, Higgins JM, Kiener HP, Lee DM, Podrebarac TA, Dascher CC, Watts GF, Mizoguchi E, Simmons B, Patel DD, Bhan AK, Brenner MB (2004) Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes *J Exp Med* 200(12):1673-1679.
- van den Berg WB (2008) Lessons from animal models of osteoarthritis *Curr Rheumatol Rep* 10(1):26-29.
- van der Heijden IM, Wilbrink B, Tchetverikov I, Schrijver IA, Schouls LM, Hazenberg MP, Breedveld FC, Tak PP (2000) Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides *Arthritis Rheum* 43(3):593-598.
- van der Helm-van Mil AHM, Verpoort KN, Breedveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ (2005) Antibodies to citrullinated proteins and differences in clinical progression of rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 7: R949-958.

- van der Pouw Kraan TC, van Gaalen FA, Kasperkovitz PV, Verbeet NL, Smeets TJ, Kraan MC, Fero M, Tak PP, Huizinga TW, Pieterman E, Breedveld FC, Alizadeh AA, Verweij CL (2003) Rheumatoid arthritis is a heterogeneous disease: evidence for differences in the activation of the STAT-1 pathway between rheumatoid tissues *Arthritis Rheum* 48(8):2132-2145.
- van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Mus AM, Colin EM, Hazes JM, Dolhain RJ, Lubberts E (2011) Th17 cells, but not Th1 cells, from patients with early rheumatoid arthritis are potent inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17A production *Arthritis Rheum* 63(1):73-83.
- van Holten J, Pavelka K, Vencovsky J, Stahl H, Rozman B, Genovese M, Kivitz AJ, Alvaro J, Nuki G, Furst DE, Herrero-Beaumont G, McInnes IB, Musikic P, Tak PP (2005) A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 64(1):64-69.
- van Lent PL, Grevers L, Blom AB, Sloetjes A, Mort JS, Vogl T, Nacken W, van den Berg WB, Roth J (2008) Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis *Ann Rheum Dis* 67(12):1750-1758.
- van Lent PL, Blom AB, Schelbergen RF, Sloetjes A, Lafeber FP, Lems WF, Cats H, Vogl T, Roth J, van den Berg WB (2012) Active involvement of alarmins S100A8 and S100A9 in the regulation of synovial activation and joint destruction during mouse and human osteoarthritis *Arthritis Rheum* 64(5):1466-1476.
- van Loo G, Beyaert R (2011) Negative regulation of NF- κ B and its involvement in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 13(3):221.
- van Oosterhout M, Bajema I, Levarht EW, Toes RE, Huizinga TW, van Laar JM (2008) Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis *Arthritis Rheum* 58: 53–60.
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery *Pharmacol Rev* 61(3):283-357.
- Vessillier S, Adams G, Montero-Melendez T, Jones R, Seed M, Perretti M, Chernajovsky Y (2012) Molecular engineering of short half-life small peptides (VIP, α MSH and γ MSH) fused to latency-associated peptide results in improved anti-inflammatory therapeutics *Ann Rheum Dis* 71(1):143-149.
- Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A (2003) Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA *Immunity* 19, 837-847.
- Vignali DA, Kuchroo VK (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers *Nat Immunol* 13: 722-728.
- Vijayan E, Samson WK, Said SI, McCann SM (1979) Vasoactive intestinal peptide: evidence for a hypothalamic site of action to release growth hormone, luteinizing hormone, and prolactin in conscious ovariectomized rats *Endocrinology* 104, 53-57.
- Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J (2007) Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock *Nat Med* 13(9):1042-1049.
- Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, Akira S, Kelly KM, Reeves WH, Bauer S, Krieg AM (2005) Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8 *J Exp Med* 202(11):1575-1585.
- Waelbroeck M, Robberecht P, Coy DH, Camus JC, De Neef P, Christophe J (1985) Interaction of growth hormone-releasing factor (GRF) and 14 GRF analogs with vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors of rat pancreas. Discovery of (N-Ac-Tyr¹,D-Phe²)-GRF(1-29)-NH₂ as a VIP antagonist *Endocrinology* 116, 2643-2649.
- Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, Weedon H, Papangelis V, Beroukas D, Roberts-Thomson PJ, Smith MD (2006) Changes in synovial tissue Jak-STAT expression in rheumatoid arthritis in response to successful DMARD treatment *Ann Rheum Dis* 65(12):1558-1564.
- Walsh NC, Gravallesse EM (2010) Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance *Immunol Rev* 233(1):301-312.

- Wang F, Gao X, Barrett JW, Shao Q, Bartee E, Mohamed MR, Rahman M, Werden S, Irvine T, Cao J, Dekaban GA, McFadden G (2008) RIG-I mediates the co-induction of tumor necrosis factor and type I interferon elicited by myxoma virus in primary human macrophages *PLoS Pathog* 4(7):e1000099.
- Wang Q, Ma Y, Liu D, Zhang L, Wei W (2011) The roles of B cells and their interactions with fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis *Int Arch Allergy Immunol* 155(3):205-211.
- Webster JL, Tonelli L, Sternberg EM (2002) Neuroendocrine regulation of immunity *Annu Rev Immunol* 20:125-163.
- Wei Y, Mojsov S (1996) Tissue specific expression of different human receptor types for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide implications for their role in human physiology *J Neuroendocrinol* 8, 811-817.
- Weigent DA, Carr DJ, Blalock JE (1990) Bidirectional communication between the neuroendocrine and immune systems. Common hormones and hormone receptors *Ann N Y Acad Sci* 579:17-27.
- Weigent DA, Blalock JE (1995) Associations between the neuroendocrine and immune systems *J Leukoc Biol* 58(2):137-150.
- Weyand CM, Goronzy JJ (2003) Ectopic germinal center formation in rheumatoid synovitis *Ann N Y Acad Sci* 987:140-149.
- Widdicombe JG (1998) Autonomic regulation. i-NANC/e-NANC *Am J Respir Crit Care Med* 158(5 Pt 3):S171-175.
- Wilkinson LS, Edwards JC, Poston RN, Haskard DO (1993) Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in normal and inflamed synovium *Lab Invest* 68(1):82-88.
- Wing K, Sakaguchi S (2010) Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity *Nat Immunol* 11(1):7-13.
- Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K (2010) Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection *Cytokine Growth Factor Rev* 21(5):365-379.
- Wolford JK, Signs SA (1995) Binding of sequence-specific proteins to the 3'-untranslated region of vasoactive intestinal peptide mRNA *Biochem Biophys Res Commun* 211, 819-825.
- Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R (2004) IL-22 increases the innate immunity of tissues *Immunity* 21(2):241-254.
- Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R (2006) IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis *Eur J Immunol* 36(5):1309-1323.
- Wolk K, Haugen HS, Xu W, Witte E, Waggie K, Anderson M, Vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Philipp S, Johnson-Leger C, Volk HD, Sterry W, Sabat R (2009) IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not *J Mol Med (Berl)* 87(5):523-536.
- Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R (2010) Biology of interleukin-22 *Semin Immunopathol* 32(1):17-31.
- Wray V, Kakoschke C, Nokihara K, Naruse S (1993) Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy *Biochemistry* 32, 5832-5841.
- Xia M, Sreedharan SP, Bolin DR, Gaufo GO, Goetzl EJ (1997) Novel cyclic peptide agonist of high potency and selectivity for the type II vasoactive intestinal peptide receptor *J Pharmacol Exp Ther* 281, 629-633.
- Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD, Gurney AL (2000) Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R *J Biol Chem* 275(40):31335-31339.
- Yadav M, Huang MC, Goetzl EJ (2011) VPAC1 (vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor type 1) G protein-coupled receptor mediation of VIP enhancement of murine experimental colitis *Cell Immunol* 267(2):124-132.
- Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushi JI, Kaibara N, Hori A, Iwamoto Y, Yoshikai Y (2008) Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis *Ann Rheum Dis* 67:1299-1304.

- Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, Maki RA, Tortorella MD, Arner EC, Firestein GS (2002) Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta *J Immunol* 168(3):1405-1412.
- Yamanishi Y, Boyle DL, Green DR, Keystone EC, Connor A, Zollman S, Firestein GS (2005) p53 tumor suppressor gene mutations in fibroblast-like synoviocytes from erosion synovium and non-erosion synovium in rheumatoid arthritis *Arthritis Res Ther* 7(1):R12-18.
- Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A (2000) Negative regulation of cytokine signaling pathways *Annu Rev Immunol* 18:143-164.
- Yazici Y, Regens AL (2011) Promising new treatments for rheumatoid arthritis - the kinase inhibitors *Bull NYU Hosp Jt Dis* 69(3):233-237.
- Yon L, Chartrel N, Feuilloley M, De Marchis S, Fournier A, De Rijk E, Pelletier G, Roubos E, Vaudry H (1994) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates both adrenocortical cells and chromaffin cells in the frog adrenal gland *Endocrinology* 135, 2749-2758.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses *Nat Immunol* 5(7):730-737.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity *J Immunol* 175(5):2851-2858.
- Yoshizawa T, Hammaker D, Sweeney SE, Boyle DL, Firestein GS (2008) Synoviocyte innate immune responses: I. Differential regulation of interferon responses and the JNK pathway by MAPK kinases *J Immunol* 181(5):3252-3258.
- Youssef P, Roth J, Frosch M, Costello P, Fitzgerald O, Sorg C, Bresnihan B (1999) Expression of myeloid related proteins (MRP) 8 and 14 and the MRP8/14 heterodimer in rheumatoid arthritis synovial membrane *J Rheumatol* 26(12):2523-2528.
- Yuan GH, Tanaka M, Masuko-Hongo K, Shibakawa A, Kato T, Nishioka K, Nakamura H (2004) Characterization of cells from pannus-like tissue over articular cartilage of advanced osteoarthritis *Osteoarthritis Cartilage* 12(1):38-45.
- Yung SL, Dela Cruz F, Hamren S, Zhu J, Tsutsumi M, Bloom JW, Caudle M, Rocznik S, Todd T, Lemoine L, MacDougall M, Shanafelt AB, Pan CQ (2003) Generation of highly selective VPAC2 receptor agonists by high throughput mutagenesis of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating peptide *J Biol Chem* 278, 10273-10281.
- Zare F, Bokarewa M, Nenonen N, Bergstrom T, Alexopoulou L, Flavell RA, Tarkowski A (2004) Arthritogenic properties of double-stranded (viral) RNA *J Immunol* 172, 5656-5663.
- Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA (2007) Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation *Immunity* 27:647-659.
- Zenewicz LA, Flavell RA (2011) Recent advances in IL-22 biology *Int Immunol* 23(3):159-163.
- Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF (2008) Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease *Arthritis Res Ther* 10(1):201.
- Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, Hu NW, Ma DX, Li ZF, Yang Q, Li W, Li JM (2012) Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis *PLoS One* 7(4):e31000. Epub 2012 Apr 2.
- Zhang N, Pan HF, Ye DQ (2011) Th22 in inflammatory and autoimmune disease: prospects for therapeutic intervention *Mol Cell Biochem* 353(1-2):41-46.
- Zhang SY, Jouanguy E, Ugolini S, Smahi A, Elain G, Romero P, Segal D, Sancho-Shimizu V, Lorenzo L, Puel A, Picard C, Chapgier A, Plancoulaine S, Titeux M, Cognet C, von Bernuth H, Ku CL, Casrouge A, Zhang XX, Barreiro L, Leonard J, Hamilton C, Lebon P, Héron B, Vallée L, Quintana-Murci L, Hovnanian A, Rozenberg F, Vivier E, Geissmann F, Tardieu M, Abel L, Casanova JL (2007) TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis *Science* 317(5844):1522-1527.
- Zhang Z, Schluesener HJ (2006) Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration *Cell Mol Life Sci* 63, 2901-2907.

- Zhou L, Chong MM, Littman DR (2009) Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation *Immunity* 30(5):646-655.
- Zhou S, Cerny AM, Zacharia A, Fitzgerald KA, Kurt-Jones EA, Finberg RW (2010) Induction and inhibition of type I interferon responses by distinct components of lymphocytic choriomeningitis virus *J Virol* 84(18):9452-9462.
- Zhu P, Lu N, Shi ZG, Zhou J, Wu ZB, Yang Y, Ding J, Chen ZN (2006) CD147 overexpression on synoviocytes in rheumatoid arthritis enhances matrix metalloproteinase production and invasiveness of synoviocytes *Arthritis Res Ther* 8(2):R44.
- Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U, Laube A, Liesaus E, Roth A, Palombo-Kinne E, Emmrich F, Kinne RW (2001) Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture--primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells *Arthritis Res* 3(1):72-76.
- Zrioual S, Toh ML, Tournadre A, Zhou Y, Cazalis MA, Pachot A, Miossec V, Miossec P (2008) IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR+ CXC chemokine expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood *J Immunol* 180(1):655-63.
- Zrioual S, Ecochard R, Tournadre A, Lenief V, Cazalis MA, Miossec P (2009) Genome-wide comparison between IL-17A- and IL-17F-induced effects in human rheumatoid arthritis synoviocytes *J Immunol* 182(5):3112-20.
- Zreiqat H, Howlett CR, Gronthos S, Hume D, Geczy CL (2007) S100A8/S100A9 and their association with cartilage and bone *J Mol Histol* 38(5):381-391.
- Zvaifler NJ (2006) Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases *Arthritis Res Ther* 8(3):210.

8. OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS

Effect of VIP on the balance between cytokines and master regulators of activated helper T cells.

Jimeno R, Leceta J, Martínez C, Gutiérrez-Cañas I, Pérez-García S, **Carrión M**, Gomariz RP, Juarranz Y. *Immunol Cell Biol.* 2012 Feb;90(2):178-86.

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

Pérez-García S, Juarranz Y, **Carrión M**, Gutiérrez-Cañas I, Margioris A, Pablos JL, Tsatsanis C, Gomariz RP. *J Cell Physiol.* 2011 Dec;226(12):3261-9.

VIP reverses the expression profiling of TLR4-stimulated signaling pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.

Arranz A, Gutiérrez-Cañas I, **Carrión M**, Juarranz Y, Pablos JL, Martínez C, Gomariz RP. *Mol Immunol.* 2008 Jun;45(11):3065-73.

Vasoactive intestinal peptide regulates Th17 function in autoimmune inflammation.

Leceta J, Gomariz RP, Martínez C, **Carrión M**, Arranz A, Juarranz Y. *Neuroimmunomodulation.* 2007;14(3-4):134-8.