



Seminarios de la Fundación Española de Reumatología

www.elsevier.es/semreuma



Revisión

Fibroblastos sinoviales

Elena Izquierdo^{a,*} y José Luis Pablos^b

^a Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), CSIC, Madrid, España

^b Servicio de Reumatología, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 3 de junio de 2013

Aceptado el 11 de junio de 2013

Palabras clave:

Fibroblastos sinoviales

Artritis reumatoide

Inflamación

R E S U M E N

Los fibroblastos sinoviales (FS) o sinoviocitos de tipo fibroblástico son el componente celular residente más importante de la membrana sinovial articular. Numerosos estudios apoyan la hipótesis de que los FS desempeñan una función relevante en la patogenia de la artritis reumatoide (AR). En la membrana sinovial reumatoide, los FS aumentan en número (hiperplasia) y muestran un fenotipo alterado que persiste en cultivo en ausencia de estímulos externos. Estas alteraciones se asocian a la activación de determinadas vías de señalización intracelular, que promueven el crecimiento celular y la expresión de múltiples factores como citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión o enzimas de degradación de la matriz. La activación y expansión de los FS puede contribuir a procesos de reclutamiento, retención y activación de células inflamatorias, formación de nuevos vasos (angiogénesis), y destrucción del hueso y del cartílago. La contribución relativa de los FS a estos procesos es muy importante en los modelos animales, pero no se ha podido determinar en la AR humana donde no es posible intervenir terapéuticamente de manera específica sobre estas células. La identificación de las vías moleculares implicadas en las alteraciones de los FS reumatoide y su contribución fisiopatológica es la base para el desarrollo de terapias alternativas de la inflamación crónica y daño articular no dirigidas al sistema inmunitario.

© 2013 SER. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Synovial fibroblasts

A B S T R A C T

Synovial fibroblasts (SF) or fibroblast-like synoviocytes are the major resident cellular component of joint synovial membrane. Numerous studies support the hypothesis that SF play an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). In the RA synovial membrane, SF increase in number (hyperplasia) and exhibit an altered phenotype that persists in culture in the absence of external stimuli. These abnormalities are associated with the activation of specific signalling pathways that promote cell growth and the expression of multiple factors such as cytokines, chemokines, growth factors, adhesion molecules, and matrix degradation enzymes. The activation and expansion of SF appear to contribute to the recruitment, retention and activation of inflammatory cells, new blood vessel formation (angiogenesis), and bone and cartilage destruction. The relative contribution of SF to these processes is very important in animal models but has not been determined in human RA due to the lack of treatment interventions specifically targeting these cells. The identification of the molecular pathways involved in the altered phenotype of rheumatoid SF and their pathophysiological contribution are the basis for the development of new therapeutic alternatives for chronic inflammation and joint damage not targeting the immune system.

© 2013 SER. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica de mecanismo autoinmune caracterizada por la presencia de

autoanticuerpos (factor reumatoide y antipéptidos citrulinados) que preceden a la enfermedad, pero cuyo papel patogénico no ha sido completamente aclarado¹. La enfermedad parece causada por numerosas influencias genéticas, comunes en parte a otras enfermedades autoinmunes, y relacionadas mayoritariamente con factores propios del sistema inmunitario adaptativo, con la concurrencia de algunos agentes ambientales como el humo del tabaco^{2,3}.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: elenaial@cib.csic.es (E. Izquierdo).

Aunque se trata de un proceso de autoinmunidad sistémico, el desarrollo de la AR se localiza principalmente en las articulaciones verdaderas o diartrodiales y en las vainas tendinosas que comparten una estructura conjuntiva específica denominada membrana sinovial. El proceso inflamatorio se localiza en esta membrana y produce una destrucción de los elementos adyacentes, hueso, cartílago y tendones produciendo una severa pérdida funcional.

La membrana sinovial normal es una estructura especializada que tapiza la cavidad sinovial de las articulaciones diartrodiales y que elabora el líquido sinovial que lubrica y nutre al cartílago. La membrana sinovial está dividida en 2 capas: una capa íntima superficial limitante o *lining*, de una o 2 capas celulares de grosor, y una capa más profunda y menos definida de tejido conjuntivo vascularizado e innervado denominada *sublining*. El *lining* está formado fundamentalmente por 2 tipos celulares denominados sinoviocitos de tipo A o macrófagos sinoviales, y de tipo B o fibroblastos sinoviales (FS)⁴. Los macrófagos sinoviales son células fagocíticas con características similares a los macrófagos tisulares residentes en otros tejidos conjuntivos. Los FS tienen funciones sintéticas relacionadas con la homeostasis de la matriz extracelular y la secreción de componentes esenciales del líquido sinovial⁵.

En la fisiopatología de la AR participan todas las células responsables de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa y las células residentes en la membrana sinovial objeto de esta revisión. La membrana sinovial reumatoide experimenta una serie de transformaciones que combinan la infiltración progresiva por células mononucleares reclutadas de la circulación junto a los cambios en las células residentes. En estas últimas, los cambios morfológicamente más evidentes son una transformación y crecimiento de la microvasculatura (angiogénesis), y un incremento de la celularidad de la zona limitante o del *lining* sinovial (hiperplasia). Así, la membrana sinovial se transforma en una masa de tejido creciente que se puede superponer e invadir la superficie del cartílago y del hueso (*pannus*)⁶. Este *pannus* se comporta como un tumor localmente invasivo cuyos componentes, macrófagos, osteoclastos y FS degradan hueso y cartílago⁷.

La formación de osteoclastos activos (osteoclastogénesis) es un proceso crítico en la erosión del hueso, dependiente de múltiples factores moleculares como M-CSF (del inglés *macrophage colony stimulating factor*) y el receptor activador de NFκB, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (RANKL), sobre el que influyen indirectamente numerosas citocinas como TNF-α (del inglés *tumor necrosis factor-alpha*). Las células capaces de promover la osteoclastogénesis desde sus precursores son los linfocitos T y los FS que expresan el RANKL. Por otra parte, los FS se han considerado los principales efectores de la destrucción del cartílago por su capacidad de invasión y producción de colagenasas y otras proteasas de la matriz⁸.

Por tanto, aunque la patogenia de la AR implica una respuesta autoinmune, una vez establecida la enfermedad el proceso local es muy complejo y no exclusivamente dependiente de la respuesta inmunitaria. Desde hace décadas se investiga la contribución de los FS en la iniciación, perpetuación o destrucción articular en la AR, con la expectativa de desarrollar agentes terapéuticos alternativos a los actuales, dirigidos a factores o células del sistema inmunitario y con efectos inevitables sobre los mecanismos naturales de defensa.

Fibroblasto sinovial

Los fibroblastos son células de origen mesenquimatosas residentes en el tejido conjuntivo que sintetizan los componentes de la matriz extracelular necesarios para la homeostasis o la reparación de lesiones. Se suelen identificar indirectamente por su morfología en forma de huso, su capacidad de adherencia al plástico en cultivo y la ausencia de marcadores leucocitarios (CD45-negativos) o

de otras estirpes celulares. Son morfológica y funcionalmente heterogéneos, con diversos fenotipos dependiendo de su localización y del estado tisular⁹. El patrón de expresión genética específico de cada tejido podría depender de mecanismos epigenéticos de regulación. Estos mecanismos parecen alterarse en las enfermedades inflamatorias, y ello podría explicar los diferentes cambios fenotípicos observados en los fibroblastos procedentes de distintas lesiones inflamatorias.

Los fibroblastos son células metabólicamente activas y capaces de desarrollar características específicas en respuesta al microambiente. Los fibroblastos de diferentes tejidos cutáneos, viscerales o sinoviales muestran patrones diferentes de expresión génica, diferencias que se acentúan en respuesta a estímulos¹⁰. Los FS y dérmicos tienen patrones basales similares de expresión génica, pero divergen después de su estimulación con TNF-α, produciendo diferentes cantidades de IL-6, IL-8 y de la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1)/CCL2, y estas diferencias parecen funcionalmente importantes¹¹.

Es posible que los denominados FS incluyan una población celular heterogénea en términos de origen, localización y fisiología. De forma simplificada, los FS parecen proceder de células pericondriales que durante el desarrollo fetal expresan altos niveles del receptor del hialuronato CD44, y que forman la interzona que dará lugar a la cavidad articular, una región de células aplanadas y agrupadas en capas que producen matriz extracelular y colágenos tipo I y III⁴. Estas células progenitoras también dan lugar a las células estromales de la médula ósea con las que los FS reumatoides tienen además de este origen común, diversas similitudes funcionales como la capacidad de producir la quimiocina CXCL12/SDF-1 (del inglés *stromal cell-derived factor-1*) o la molécula de adhesión VCAM-1 (del inglés *vascular cell adhesion molecule-1*), críticas en el mantenimiento del nicho hematopoyético. Estos factores pueden cobrar especial relevancia en la inflamación sinovial, donde pueden ejercer funciones similares de retención y soporte a las células mieloides y linfoides que infiltran la sinovial inflamada.

Existen también similitudes en el desarrollo del estroma de los órganos linfoides secundarios y el estroma sinovial, que durante la inflamación expresa quimiocinas asociadas al *homing* linfocitario como CXCL13, CCL19 y CCL21, y ejerce funciones de células reticulares o foliculares dendríticas, constitutivamente presentes solo en órganos linfoides^{12,13}. La persistencia de progenitores estromales (MSC, *mesenchymal stem cells*) capaces de rediferenciarse en otras poblaciones celulares como osteoblastos o condrocitos, es otra característica común al estroma medular y sinovial¹⁴. Algunas vías potencialmente relacionadas con el desarrollo embrionario y el fenotipo de los FS y las MSC se han relacionado con el sistema Wnt y sus ligandos¹⁵.

La función principal de los FS en la articulación sinovial normal es contribuir a la homeostasis de la articulación, produciendo los componentes de la matriz extracelular y del líquido sinovial. En la membrana sinovial, los FS ocupan 2 posiciones o subpoblaciones, con diferentes características morfológicas y biológicas. Unos forman la capa íntima o *lining*, formando una estructura mesotelial que limita la cavidad sinovial, y otros forman parte de la subíntima o *sublining*, similares a los fibroblastos intersticiales de otros tejidos. Los FS del *lining* expresan marcadores específicos como la enzima uridina difosfato glucosa deshidrogenasa (UDPGD), las moléculas de adhesión VCAM-1 y cadherina-11 o el factor del complemento CD55 (DAF, *decay-accelerating factor*)⁴. Estos marcadores definen funciones específicas de los FS del *lining* como la producción de elevadas cantidades de ácido hialurónico debida a la alta actividad de la enzima UDPGD¹⁶. En modelos animales deficientes en la molécula de adhesión homotípica cadherina-11 se ha demostrado que esta es esencial en la formación y organización pseudoepitelial del *lining*, y en la destrucción del cartílago durante la artritis, pero no del hueso¹⁷.

Tanto los FS del *lining* como los del *sublining* pueden interactuar con las células inflamatorias mieloides o linfoides mediante moléculas de adhesión como VCAM-1 o a través de la producción de numerosos factores paracrinicos como citocinas y quimiocinas relacionadas con el reclutamiento, migración, activación o supervivencia de la mismas. Esta capacidad de las células del estroma de influir en otras poblaciones se ha demostrado en la médula ósea y los tejidos linfoides normales donde constituyen el nicho de las células hematopoyéticas o del sistema inmunitario, y parece también relevante para el mantenimiento crónico de la infiltración celular en la sinovial^{12,13}.

Estudio de los fibroblastos sinoviales

Los procedimientos habituales de estudio de los FS incluyen la histopatología del tejido sinovial acompañada de técnicas de estudio de expresión molecular y su expansión y cultivo en placas de plástico. El estudio de las características y comportamiento de los FS *in vitro* ha generado abundante información sobre el fenotipo de los FS en la AR. Los FS en cultivo proliferan con facilidad y pueden mantener algunas características durante múltiples generaciones. Sin embargo, no está claro si el cultivo de los FS representa una mezcla heterogénea de las poblaciones fibroblásticas originalmente presentes en la membrana sinovial (fibroblastos de *lining* o *sublining*, MSC y pericitos) y en qué proporción, o si existe una expansión preferente de determinadas subpoblaciones a través de la proliferación^{18,19}.

La proliferación forzada en cultivos monocapa sobre plástico también es un factor importante no presente en el medio sinovial, donde estas células proliferan lentamente y viven en una matriz tridimensional. Por lo tanto, el estudio de los FS en cultivo presenta ciertas limitaciones, y aunque permite analizar diferencias entre grupos estas deben ser confirmadas en estudios tisulares.

La mayor parte de la investigación sobre los FS se ha realizado en la AR, existiendo poca información en otras enfermedades articulares. Los tejidos y cultivos tradicionalmente se han obtenido durante la cirugía de sustitución protésica, una situación terminal alejada de las fases iniciales del proceso artrítico. Los FS reumatoides han sido generalmente comparados con los artrósicos, usados como control, mientras que muy pocos estudios incluyen FS de sinovial normal, cuestionando en gran medida la interpretación de los resultados obtenidos en AR. Los FS artrósicos pueden expresar citocinas inflamatorias o enzimas que degradan la matriz de manera anormal, en algunos estudios en menor grado que los reumatoides, pero no pueden ser considerados «normales»²⁰. Un reciente estudio sistemático de FS de pacientes con artrosis, AR y controles sanos pone de manifiesto esta importante limitación demostrando importantes cambios transcriptómicos en los FS procedentes de articulaciones artrósicas comparadas con las de individuos sanos²¹.

Otros estudios han demostrado alteraciones cromosómicas similares en los FS de pacientes con AR, artrosis y algunas espondiloartropatías, comparados con FS de donantes sanos. Estas modificaciones incluyen regiones que contienen genes de citocinas, factores de crecimiento, moléculas de señalización, factores de transcripción y proteasas, pero su significado y consecuencias funcionales no se conocen²².

En otras enfermedades causantes de artritis crónica como la artritis psoriásica y otras espondiloartropatías se han realizado menos estudios que en general sugieren que los FS también sufren cambios similares a los observados en la AR, como la hiperplasia o la expresión de proteasas de la matriz^{23–25}. Por tanto, la mayoría de las alteraciones de los FS que se describen a continuación corresponden a la AR.

El fibroblasto sinovial en la artritis reumatoide

Crecimiento de los fibroblastos sinoviales en la artritis reumatoide

Una de las observaciones histológicas clásicas en la AR es la expansión de los fibroblastos de la capa del *lining* sinovial, definida como hiperplasia y ligada tradicionalmente al crecimiento de la membrana sinovial y a la formación del *pannus*^{26,27}. Esta descripción morfológica de un aumento en el número de capas del *lining* en tejidos reumatoides corresponde en realidad a una acumulación de macrófagos y fibroblastos⁴. Sobre la población de FS del *sublining* hay pocos datos cuantitativos debido a la falta de marcadores adecuados, ya que los marcadores conocidos como VCAM-1, cadherina-11 o CD55 son principalmente expresados por los FS del *lining*. Por otra parte, estos marcadores son inducibles en FS estimulados con TNF- α , presente en la sinovial reumatoide, y podrían reflejar también un estado de activación además de la localización o cantidad de estos FS^{28–30}.

Recientemente mediante la detección inmunohistoquímica de una chaperona específica de colágeno (hsp47) universalmente expresada por fibroblastos se ha podido estudiar la evolución de ambas subpoblaciones en el curso de la AR. La expansión de los fibroblastos del *lining* se incrementa paralelamente a la actividad y a la progresión de la enfermedad, mientras que la hiperplasia de los fibroblastos del *sublining* se comporta de forma opuesta³¹. Asimismo, la hiperplasia fibroblástica del *lining* disminuye significativamente tras la terapia con antagonistas del TNF- α , aunque no se normaliza completamente ni siquiera en pacientes en remisión. Esta hiperplasia de los FS junto a una expansión vascular persistente tras el tratamiento podrían contribuir a la progresión subclínica y reactivación de la enfermedad en pacientes que han alcanzado la remisión clínica^{31,32}.

Fenotipo del fibroblasto sinovial de la artritis reumatoide

En la AR, diferentes estudios apoyan la hipótesis de que los FS desempeñan un papel central en el daño a la articulación y en la persistencia de la inflamación crónica. Se ha sugerido que los FS reumatoides muestran un fenotipo comparable en determinados aspectos al de algunas células transformadas. Pueden crecer sin adherirse y escapar a la inhibición por contacto como las células tumorales³³. Los FS reumatoides son también más resistentes a la muerte celular por apoptosis³⁴. Además, responden a las citocinas proinflamatorias aumentando su crecimiento y resistencia a la muerte y produciendo numerosos mediadores inflamatorios y de destrucción tisular (fig. 1). Este fenotipo es inicialmente una respuesta a estímulos producidos en el ambiente proinflamatorio que puede después perpetuarse de manera autónoma.

Entre los diversos estímulos que activan a los FS, se incluye la activación de los receptores de tipo Toll (TLR, *Toll-like receptors*), los receptores de citocinas y la unión de integrinas de membrana a la matriz extracelular. Los efectos de las citocinas macrofágicas (TNF- α y IL-1 β) sobre los FS producen una potente respuesta efectora que incluye la inducción de otras citocinas como IL-6, quimiocinas, y proteasas de la matriz extracelular. La estimulación con TNF- α produce cambios epigenéticos en los FS que permiten la prolongación en el tiempo de su estado de activación en ausencia del estímulo inicial, explicando en parte la persistencia de la respuesta proinflamatoria³⁵. Además, la respuesta de los FS a TNF- α parece necesaria en la inflamación crónica articular, de manera que los ratones con fibroblastos deficientes en receptores de TNF- α de tipo I no desarrollan artritis en respuesta al TNF- α ³⁶.

Estudios *ex vivo* de FS reumatoides confirman su fenotipo permanentemente activado. Su implantación subcutánea en ratones inmunodeficientes y en ausencia de estímulos adicionales produce una potente respuesta inflamatoria marcada por el reclutamiento

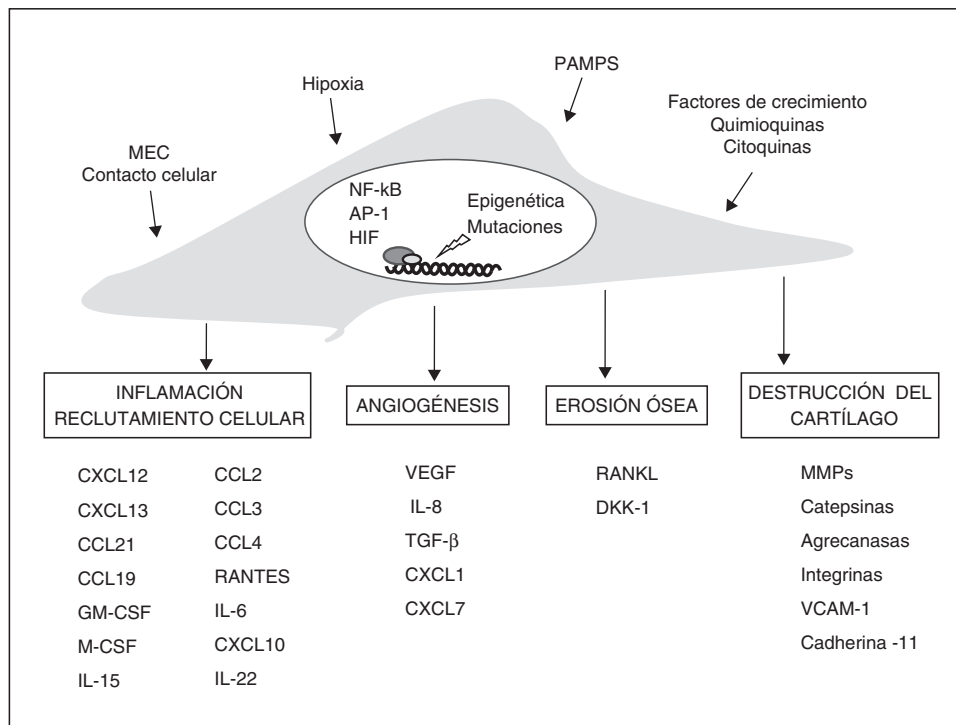


Figura 1. Vías de participación de los fibroblastos sinoviales en la AR. Estímulos y cambios intracelulares más importantes modificadores del fenotipo de los FS y sus mecanismos efectores en la artritis crónica. AP-1: proteína activadora; DKK-1: Dickkopf-1; GM-CSF y M-CSF: factores de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos; HIF: factor inducible por hipoxia; MEC: matriz extracelular; MMPs: metaloproteinasas; NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; PAMPS: patrones moleculares asociados a patógenos; RANKL: receptor activador de NFκB; TGF-β: factor de crecimiento transformante-β; VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

de células mieloides y por la angiogénesis³⁷. En un modelo similar los FS reumatoides, pero no los artrósicos, coimplantados junto a cartílago humano producen su destrucción progresiva³⁸. En este modelo experimental los FS de la AR, pero no los artrósicos o los sanos, son también capaces de migrar de unas articulaciones a otras propagando la enfermedad³⁹.

Alteraciones genéticas y epigenéticas de los fibroblastos sinoviales en la artritis reumatoide

Diversos estudios han intentado explicar esta alteración del fenotipo de los FS reumatoides, bien por mutaciones en distintos genes, bien por modificaciones epigenéticas. Los FS reumatoides tienen una expresión incrementada de oncogenes (c-myc, c-fos) y en algunos pacientes se han descrito mutaciones en genes reguladores del ciclo celular, proliferación y apoptosis, otra similitud con las células tumorales⁵. La mutación mejor caracterizada es la del gen supresor de tumores p53 que podría contribuir a las alteraciones del crecimiento y fenotipo observadas en los FS⁴⁰. La pérdida de función de p53 en los FS disminuye la tasa de apoptosis y aumenta la expresión de citocinas y, en el modelo de artritis inducida por colágeno, conduce a una mayor severidad y destrucción de la articulación⁴¹. Sin embargo, otros estudios han observado que estas mutaciones son infrecuentes en FS, aunque la expresión de p53 funcional puede desempeñar un papel patogénico no relacionado con la supresión del crecimiento en la AR o sus modelos experimentales^{42,43}.

La expresión génica también puede ser regulada de forma estable en el tiempo por mecanismos epigenéticos como los cambios en la metilación del ADN y la acetilación de histonas. Estas modificaciones facilitan o impiden el acceso de los factores necesarios para la transcripción de los genes. Los cambios epigenéticos pueden ser revertidos y están regulados por enzimas específicas.

Desde un punto de vista global se ha observado que en los FS de la AR hay una reducción generalizada de la metilación del ADN y de la acetilación de histonas. Los cambios en los patrones de metilación son heredados durante la proliferación por las células hijas manteniendo el fenotipo en sucesivas generaciones celulares. La hipometilación global de los FS de la AR podría deberse a una menor expresión de la enzima DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) y un aumento en enzimas que intervienen en el reciclado de poliaminas^{44,45}. La hipometilación de los FS reumatoides podría ser responsable de la activación de múltiples genes entre los que se han descrito secuencias repetitivas normalmente silenciadas, como los elementos retrovirales endógenos LINE-1, secuencias Alu y microsatélites⁴⁶. También se ha descrito una demetilación en el promotor del gen de la IL-6 que incrementa su expresión⁴⁷. Otra prueba indirecta de la importancia de este mecanismo es la observación de un fenotipo similar al de los FS reumatoides en FS normales cultivados en un ambiente hipometilante⁴⁸. Además, las citocinas proinflamatorias de la AR (TNF, IL-1β e IL-6) inducen hipometilación del ADN^{49,50}. También se ha descrito la hipermetilación del promotor del gen de receptor de muerte 3 (DDR3), asociada a su menor expresión y a una mayor resistencia a la apoptosis en los FS de la AR⁵¹.

Las modificaciones de histonas incluyen mecanismos de acetilación, metilación y sumoilación. Se ha descrito un aumento en los niveles de las enzimas histona desacetilasas (HDAC), HDAC1 y sirtuina 1 en los FS reumatoides, y además el TNF-α incrementa esta expresión^{52,53}. La sobreexpresión de estas HDAC aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias y la proliferación celular e inhibe la apoptosis en los FS. Diversos estudios investigan el efecto de inhibidores de las HDAC como el MI192, la tricostatina A (TSA) o la nicotinamida⁵⁴. Estos inhibidores disminuyen la expresión de citocinas proinflamatorias y además se ha observado una mejora de las manifestaciones clínicas en ratones con artritis inducida por anticuerpos de colágeno tratados con TSA⁵⁵. Sin embargo, los

cambios en los niveles de acetilación/desacetilación ocurren también en proteínas no histonas y por lo tanto los efectos observados podrían también deberse a otros mecanismos.

Otra importante vía de regulación de la expresión génica son los microARN (miARN), pequeños ARN no codificantes que regulan los niveles y reducen la traducción proteica de múltiples ARN mensajeros (ARNm). Los miARN se han implicado en la regulación de procesos importantes en la AR como la proliferación, diferenciación y muerte celular. Los FS reumatoides tienen constitutivamente aumentados los niveles de miR-146a y miR-155 comparados con los artrósicos, y la expresión de estos miARN aumenta en respuesta a la estimulación por citocinas o agonistas de los TLR. Se ha demostrado que la inducción de miR-155 reduce específicamente la expresión de las MMP-1 y 3, y podría por tanto contribuir a modular la destrucción articular⁵⁶.

Aunque en conjunto estos cambios son complejos y su conocimiento es aún limitado, las observaciones mencionadas apoyan la hipótesis de que las alteraciones epigenéticas explicarían la heredabilidad y persistencia del fenotipo de los FS reumatoides.

El fibroblasto sinovial como mediador de daño articular

Los FS de la AR desempeñan un papel fundamental en la destrucción de cartílago y hueso articular. Actúan directamente degradando la matriz del cartílago, e indirectamente sobre el hueso como inductores de la diferenciación y activación de los osteoclastos.

La degradación del cartílago es un proceso en varias etapas, donde interviene la adhesión de los FS al cartílago y la síntesis de enzimas extracelulares o de membrana que degradan la matriz extracelular compuesta por colágeno y proteoglucanos. Las moléculas de adhesión, particularmente las integrinas, facilitan el anclaje de los fibroblastos a la matriz del cartílago. Los fibroblastos en cultivo expresan abundantemente varias integrinas $\beta 1$ ⁵⁷. *In vitro*, es posible inhibir parcialmente la unión de los fibroblastos al cartílago mediante anticuerpos anti- $\beta 1$. Además, esta unión a integrinas modula señales intracelulares en los FS relevantes en la patogenia de la AR, incluyendo MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) y Ras, que también contribuyen a inducir la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMP)⁵⁸. Otras moléculas de adhesión como VCAM-1 también parecen contribuir a la invasión del cartílago³⁸. Este proceso de adhesión e invasión-degradación del cartílago puede reproducirse *in vitro* mediante cocultivo de FS reumatoides y cartílago normal en ausencia de estímulos. *In vivo*, en ratones inmunodeficientes, los implantes de FS reumatoides sobre injertos de cartílago humano sano se adhieren al cartílago y lo invaden espontáneamente, aunque el proceso puede ser también estimulado por citocinas exógenas como TNF- α e IL-1 β ⁵⁹. La formación de un *lining* hiperplásico mediante la agregación homotípica de FS parece ser relevante en la degradación del cartílago en el modelo de ratones deficientes en cadherina-11, donde la alteración de este proceso previene el daño al cartílago durante la artritis inducida por colágeno¹⁷.

Entre los efectores de la destrucción del cartílago producidos por los FS reumatoides destacan las proteasas MMPs, catepsinas y agreganasas. Entre las MMPs, las collagenasas (MMP-1 y -13) y la estromelisin (MMP-3) parecen especialmente importantes en la degradación del cartílago reumatoide⁶⁰. Su síntesis y activación es inducida por varios factores, incluyendo citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α), factores de crecimiento, ligandos de TLR o especies reactivas de oxígeno⁵⁹ (fig. 1). Los FS en cultivo también producen constitutivamente las proteínas TIMP (*tissue inhibitors of MMPs*), que bloquean específicamente las MMP⁶¹. Las catepsinas son proteasas de amplia especificidad y son también reguladas por citocinas y protooncogenes⁶². Las agreganasas son también importantes mediadores de la destrucción cartilaginosa y algunas son

expresadas constitutivamente por los FS en cultivo (ADAMTS-4 y 5)⁶³.

La erosión ósea es necesariamente mediada por osteoclastos, cuya diferenciación está fundamentalmente regulada por el sistema RANK/RANKL (receptor activador de NF- κ B y su ligando)⁶⁴. Los ratones deficientes en RANKL no pueden formar osteoclastos, pero sí desarrollar sinovitis. La inducción de artritis en estos ratones produce inflamación articular y degradación del cartílago pero no pérdida ósea⁶⁵. Los precursores osteoclásticos responden a la activación del receptor RANK por su ligando específico RANKL, transformándose en osteoclastos multinucleados capaces de degradar el hueso (osteoclastogénesis). El RANKL es exclusivamente expresado en el tejido sinovial por LT activados y FS. Los estudios histológicos sobre la interfase sinovial de las erosiones reumatoides indican que la expresión de RANKL por los FS del *pannus* es crítica en la erosión⁶⁶. Además, los FS de la AR incrementan la expresión del inhibidor osteoblástico Dickkopf-1 (DKK-1), bloqueando los mecanismos de reparación ósea⁶⁷. Por tanto, los FS reumatoides contribuyen significativamente a la erosión ósea a través de múltiples mecanismos.

Fibroblasto sinovial y regulación de la inflamación

Los FS reumatoides participan activamente en el reclutamiento y retención de las células del infiltrado inflamatorio mediante la secreción de citocinas y quimiocinas. Además, secretan diversos factores moleculares que favorecen la supervivencia y proliferación de las células reclutadas. En pacientes con AR se han detectado niveles elevados de numerosas quimiocinas y sus respectivos receptores. Los fibroblastos de la AR pueden producir quimiocinas en exceso de forma constitutiva o después de ser estimulados con citocinas proinflamatorias, micropartículas, hipoxia, ligandos de los TLR u otras quimiocinas (fig. 1).

Los FS producen tanto quimiocinas relacionadas con procesos homeostáticos de tráfico celular mieloide y linfóide (quimiocinas de *homing* medular y linfóide) como aquellas inducibles durante procesos inflamatorios (quimiocinas inflamatorias). Entre las primeras CXCL12/SDF-1 que se han relacionado con el reclutamiento y retención de las células T, particularmente de memoria, en la articulación inflamada⁶⁸. Los FS sinoviales son también la fuente principal de las quimiocinas denominadas homeostáticas o de *homing* linfóide (CXCL13, CCL21, CCL19), normalmente solo presentes en órganos linfoides secundarios, y que se asocian a la formación de estructuras linfoides terciarias (neogénesis linfóide) en la sinovial reumatoide^{69,70}.

Los FS estimulados con IL-1 β o TNF- α producen numerosas quimiocinas inflamatorias, quimiotácticas para monocitos y macrófagos, contribuyendo al reclutamiento de estos tipos celulares a la articulación inflamada. Algunos ejemplos de estas quimiocinas son CCL5/RANTES (*regulated on activation normal T cell expressed and secreted*), la proteína inducible por interferón-10 (IP-10)/CXCL10, ENA-78, CCL2/MCP-1 y las proteínas inflamatorias de macrófagos MIP-1 α /CCL3 y MIP-1 β /CCL4⁷¹. Múltiples quimiocinas pueden desempeñar otras funciones sobre los leucocitos y sobre otros tipos celulares, particularmente células endoteliales o precursores, y como se señala más adelante participan en el proceso de angiogénesis, muy activo en la sinovial reumatoide.

Los mediadores centrales del proceso inflamatorio reumatoide son las citocinas proinflamatorias macrofágicas, particularmente TNF- α , que no es sintetizado por los FS. Sin embargo, estos parecen la fuente más importante de IL-6 cuyo papel central también ha sido confirmado terapéuticamente⁷². Los fibroblastos de la AR en cultivo producen espontáneamente IL-6 y esta producción puede aumentar con la presencia de diversos estímulos, incluidas las citocinas IL-1 β o TNF- α .

La citocina IL-15 es otra citocina de origen fibroblástico muy abundante en el líquido sinovial de pacientes con AR. Los fibroblastos en cultivo de estos pacientes producen constitutivamente elevados niveles de esta citocina^{73,74}. En cocultivos de FS y linfocitos se ha demostrado la importancia de IL-15 en el diálogo entre ambos elementos celulares, contribuyendo finalmente a la supervivencia y activación linfocitaria⁷⁵.

Los pacientes con AR también tienen mayores niveles de IL-22 comparados con los donantes sanos, niveles que se correlacionan con la actividad de la enfermedad y la presencia de erosiones óseas. En la AR, esta citocina se expresa principalmente en FS y macrófagos pero solo los FS expresan el receptor 1 de IL-22. Estudios recientes sugieren que IL-22 tiene efectos proinflamatorios y osteoclastogénicos en la AR, posiblemente por su papel sobre la proliferación y activación de los FS^{76,77}. Otras citocinas descritas en la AR y producidas por fibroblastos estimulados son la IL-18, IL-33 e IL-32⁷⁸.

Los factores de estimulación de colonias de granulocitos (GM-CSF) y de macrófagos (M-CSF) son también abundantes en el tejido y líquido sinovial de pacientes con AR y son liberados principalmente por las células del *lining*. La estimulación de los fibroblastos *in vitro* por IL-1 β o TNF- α aumenta de forma importante la producción de GM-CSF que podría contribuir a la expansión local de los macrófagos⁷⁹.

Los FS reumatoides en cultivo son una fuente importante de interferones (IFN) de tipo I que pueden tener distintas funciones inmunoactivadoras en esta enfermedad. Aunque en general tienen efectos proinflamatorios como la liberación de quimiocinas y MMP, en diversos modelos de artritis también se ha demostrado un efecto antiinflamatorio de IFN- β ⁸⁰. Los fibroblastos tienen también la capacidad de producir otras citocinas antiinflamatorias y factores potencialmente supresores de la sinovitis, como el factor de crecimiento transformante TGF- β , e IL-1RA, el antagonista natural de la IL-1^{81,82}.

Fibroblasto sinovial y angiogénesis en la artritis reumatoide

En la sinovial reumatoide, de manera similar a otras enfermedades inflamatorias crónicas, se ha descrito un aumento de la vascularización sinovial y de la expresión de factores proangiogénicos que reflejan un proceso neoangiogénico activo. Se postula que este proceso es necesario para mantener el metabolismo y la incorporación celular durante el proceso inflamatorio crónico^{83–85}. Los FS de la AR producen múltiples mediadores proangiogénicos capaces de inducir el reclutamiento, la proliferación y la activación de las células endoteliales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Numerosas quimiocinas como IL-8, CXCL12, ENA-78, CXCL1, CXCL7, MCP-1 y fractalina (CXC3CL1) también parecen ejercer efectos proangiogénicos directos o indirectos en la AR^{86,87}. Los FS y macrófagos sinoviales sintetizan VEGF de forma abundante, a niveles detectables sistémicamente. El nivel plasmático de VEGF es un buen marcador sistémico de inflamación articular en la AR⁸⁸. La marcada hipoxia de la sinovial reumatoide parece el factor más potente inductor de VEGF en los FS a través del factor de transcripción inducible por la hipoxia HIF-1 α ⁸⁹. Otros mediadores como TNF- α , IL-17^{90,91}, la activación del TLR2⁹² y la unión de CD40⁹³ pueden contribuir al proceso (fig. 1).

Los fibroblastos reumatoides implantados a ratones inmunodeficientes y en ausencia de estímulos adicionales inducen el reclutamiento de células mieloides y el desarrollo de vasos sanguíneos³⁷. Un proceso similar se ha observado en el estroma tumoral, donde tiene importantes implicaciones en el crecimiento tumoral, que parecen también aplicables a la perpetuación de la inflamación crónica^{94–96}. Esta capacidad de los FS reumatoides depende del eje HIF-1 α , VEGF y CXCL12/CXCR4. Los factores VEGF y CXCL12 son dianas transcripcionales de HIF-1 α en condiciones de hipoxia y representan un nexo adicional entre la hipoxia y la infiltración

por células inflamatorias^{97,98}. Tanto la inhibición de la actividad de HIF-1 α como el uso de antagonistas de VEGF o CXCL12/CXCR4 pueden bloquear la capacidad angiogénica y de reclutamiento celular de los FS de la AR³⁷.

Terapias dirigidas contra el fibroblasto sinovial

Las dianas de las terapias actuales para la AR se dirigen fundamentalmente contra células T, células B o citocinas macrofágicas. Todas estas terapias disminuyen la actividad de la enfermedad y retrasan la destrucción articular. Sobre la membrana sinovial, todas ejercen efectos similares, reduciendo la infiltración celular linfocítica y macrofágica en paralelo a la respuesta clínica⁷⁰. También las células residentes sufren cambios en respuesta a las terapias, reduciéndose la hiperplasia fibroblástica del *lining*, pero no del *sublining*, y modificándose en parte la estructura vascular^{31,32}. Sin embargo, la reducción de estos elementos es solo parcial, persistiendo una importante hiperplasia fibroblástica y vascular tras el tratamiento con anti-TNF- α ^{31,32}. Se desconoce el significado pronóstico de estos cambios residuales sobre el daño estructural o las futuras recidivas inflamatorias una vez alcanzada una mejoría clínicamente aceptable de la inflamación articular.

No existen terapias específicamente dirigidas contra los fibroblastos, pero sí frente a algunos de sus factores. La intervención directa sobre la IL-6 es muy eficaz en la AR pero esta citocina está también producida por otros tipos celulares. Los antagonistas de IL-15, otra citocina fibroblástica, también parecen tener algún efecto terapéutico en la AR, aunque no han alcanzado desarrollo clínico⁹⁹. Los antagonistas de la señalización intracelular o los de NF κ B o MAPK podrían actuar sobre procesos FS-dependientes, además de interferir con la función de otros muchos elementos celulares que contribuyen a la inflamación y respuesta autoinmune.

Las únicas intervenciones fibroblasto-específicas se han realizado en animales, con las limitaciones propias de estos modelos. Como se ha señalado, la interferencia con la formación del *lining* fibroblástico mediante la delección de la molécula cadherina-11 previene en ratones el desarrollo de artritis y de daño cartilaginoso, aunque no óseo¹⁷. La delección específica de los receptores TNFR1 en fibroblastos previene la inflamación articular mediada por TNF- α en ratones, y esto representa la prueba más importante de la importancia de los FS como las principales células efectoras de TNF- α en la artritis³⁶.

Sin embargo, no existen pruebas directas de este concepto en las enfermedades inflamatorias articulares humanas, debido a la falta de terapias específicamente dirigidas a los FS. La investigación de factores involucrados en la artritis específicos de los FS es un paso intermedio necesario para hacer posibles estas intervenciones. Por tanto, la potencial seguridad y eficacia de tales intervenciones es aún incierta. El desarrollo de nuevas estrategias de intervención dirigidas a los FS permitiría el abordaje terapéutico de la artritis crónica desde una perspectiva diferente de la actual, esencialmente dirigida a los elementos del sistema inmunitario y cuyas limitaciones en eficacia y seguridad son bien conocidas.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores han recibido ayudas a la investigación del Instituto de Salud Carlos III a través de la Red de Investigación en Inflamación y Enfermedades Reumáticas (RIER) RD12/09/016 y de la Comunidad Autónoma de Madrid a través de la red S2010/BMD-2350 (RAPHYME). Elena Izquierdo ha recibido apoyo del programa de

formación posdoctoral Juan de la Cierva del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO).

Bibliografía

- Rantapää-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H, et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003;48:2741–9.
- Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, Thomson BP, et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet.* 2010;42:508–14.
- Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2009;21:279–83.
- Edwards JC. Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Res.* 2000;2:344–7.
- Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010;233:233–55.
- Iguchi T, Ziff M. Electron microscopic study of rheumatoid synovial vasculature. Intimate relationship between tall endothelium and lymphoid aggregation. *J Clin Invest.* 1986;77:355–61.
- Bromley M, Woolley DE. Histopathology of the rheumatoid lesion. Identification of cell types at sites of cartilage erosion. *Arthritis Rheum.* 1984;27:857–63.
- Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.* 2000;43:250–8.
- Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, et al. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:12877–82.
- Nolte SV, Xu W, Rennekampff HO, Rodemann HP. Diversity of fibroblasts—a review on implications for skin tissue engineering. *Cells Tissues Organs.* 2008;187:165–76.
- Parsonage G, Falciani F, Burman A, Filer A, Ross E, Boffill M, et al. Global gene expression profiles in fibroblasts from synovial, skin and lymphoid tissue reveals distinct cytokine and chemokine expression patterns. *Thromb Haemost.* 2003;90:688–97.
- Shimaoka Y, Attrep JF, Hirano T, Ishihara K, Suzuki R, Toyosaki T, et al. Nurse-like cells from bone marrow and synovium of patients with rheumatoid arthritis promote survival and enhance function of human B cells. *J Clin Invest.* 1998;102:606–18.
- Lindhout E, van Eijk M, van Pel M, Lindeman J, Dinant HJ, de Groot C. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients have intrinsic properties of follicular dendritic cells. *J Immunol.* 1999;162:5949–56.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001;44:1928–42.
- Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:2791–6.
- Pitsillides AA, Blake SM. Uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity in synovial lining cells in the experimental antigen induced model of rheumatoid arthritis: an indication of synovial lining cell function. *Ann Rheum Dis.* 1992;51:992–5.
- Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science.* 2007;315:1006–10.
- Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U, et al. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture—primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res.* 2001;3:72–6.
- Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Funa K, Maini RN, Zvaifler NJ. Mesenchymal cells expressing bone morphogenetic protein receptors are present in the rheumatoid arthritis joint. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2046–55.
- Buckley CD, Filer A, Haworth O, Parsonage G, Salmon M. Defining a role for fibroblasts in the persistence of chronic inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis.* 2004;63 Suppl 2:S92–5.
- del Rey MJ, Usategui A, Izquierdo E, Canete JD, Blanco FJ, Criado G, et al. Transcriptome analysis reveals specific changes in osteoarthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 2012;71:275–80.
- Kinne RW, Liehr T, Beensen V, Kunisch E, Zimmermann T, Holland H, et al. Mosaic chromosomal aberrations in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and other inflammatory joint diseases. *Arthritis Res.* 2001;3:319–30.
- Ceponis A, Hietanen J, Tamulaitiene M, Partsch G, Patiala H, Kontinen YT. A comparative quantitative morphometric study of cell apoptosis in synovial membranes in psoriatic, reactive and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 1999;38:431–40.
- Ceponis A, Kontinen YT, Imai S, Tamulaitiene M, Li TF, Xu JW, et al. Synovial lining, endothelial and inflammatory mononuclear cell proliferation in synovial membranes in psoriatic and reactive arthritis: a comparative quantitative morphometric study. *Br J Rheumatol.* 1998;37:170–8.
- Cunnane G, FitzGerald O, Hummel KM, Gay RE, Gay S, Bresnihan B. Collagenase, cathepsin B and cathepsin L gene expression in the synovial membrane of patients with early inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 1999;38:34–42.
- Rooney M, Condell D, Quinlan W, Daly L, Whelan A, Feighery C, et al. Analysis of the histologic variation of synovitis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:956–63.
- Shiozawa S, Shiozawa K, Fujita T. Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction. Light and electron microscopic studies of active cellular pannus. *Arthritis Rheum.* 1983;26:472–8.
- Croft D, McIntyre P, Wibulsas A, Kramer I. Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-13 through increased mRNA stability. *Am J Pathol.* 1999;154:1149–58.
- Hamann J, Wisaupt JO, van Lier RA, Smeets TJ, Breedveld FC, Tak PP. Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 1999;42:650–8.
- Vandooren B, Cantaert T, ter Borg M, Noordenbos T, Kuhlman R, Gerlag D, et al. Tumor necrosis factor alpha drives cadherin 11 expression in rheumatoid inflammation. *Arthritis Rheum.* 2008;58:3051–62.
- Izquierdo E, Canete JD, Celis R, del Rey MJ, Usategui A, Marsal S, et al. Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Rheum.* 2011;63:2575–83.
- Izquierdo E, Canete JD, Celis R, Santiago B, Usategui A, Sanmarti R, et al. Immature blood vessels in rheumatoid synovium are selectively depleted in response to anti-TNF therapy. *PLoS One.* 2009;4:8131.
- Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest.* 1989;83:1267–76.
- Baier A, Meinecke I, Gay S, Pap T. Apoptosis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15:274–9.
- Lee A, Qiao Y, Grigoriev G, Chen J, Park-Min KH, Park SH, et al. Tumor necrosis factor alpha induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2013;65:928–38.
- Armaka M, Apostolaki M, Jacques P, Kontoyiannis DL, Elewaut D, Kollias G. Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *J Exp Med.* 2008;205:331–7.
- del Rey MJ, Izquierdo E, Caja S, Usategui A, Santiago B, Galindo M, et al. Human inflammatory synovial fibroblasts induce enhanced myeloid cell recruitment and angiogenesis through a hypoxia-inducible transcription factor 1alpha/vascular endothelial growth factor-mediated pathway in immunodeficient mice. *Arthritis Rheum.* 2009;60:2926–34.
- Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol.* 1996;149:1607–15.
- Lefevre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med.* 2009;15:1414–20.
- Reme T, Travaglio A, Gueydon E, Adla L, Jorgensen C, Sany J. Mutations of the p53 tumour suppressor gene in erosive rheumatoid synovial tissue. *Clin Exp Immunol.* 1998;111:353–8.
- Sun Y, Cheung HS. p53, proto-oncogene and rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 2002;31:299–310.
- Tak PP, Zvaifler NJ, Green DR, Firestein GS. Rheumatoid arthritis and p53: how oxidative stress might alter the course of inflammatory diseases. *Immunol Today.* 2000;21:78–82.
- Tak PP, Smeets TJ, Boyle DL, Kraan MC, Shi Y, Zhuang S, et al. p53 overexpression in synovial tissue from patients with early and longstanding rheumatoid arthritis compared with patients with reactive arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:948–53.
- Liu CC, Fang TJ, Ou TT, Wu CC, Li RN, Lin YC, et al. Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. *Immunol Lett.* 2011;135:96–9.
- Karouzakis E, Gay RE, Gay S, Neidhart M. Increased recycling of polyamines is associated with global DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2012;64:1809–17.
- Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;310:211–50.
- Nile CJ, Read RC, Akil M, Duff GW, Wilson AG. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2686–93.
- Karouzakis E, Gay RE, Michel BA, Gay S, Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2009;60:3613–22.
- Hmadcha A, Bedoya FJ, Sobrinho F, Pintado E. Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1beta via nitric oxide production. *J Exp Med.* 1999;190:1595–604.
- Wehbe H, Henson R, Meng F, Mize-Berge J, Patel T. Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression. *Cancer Res.* 2006;66:10517–24.
- Takami N, Osawa K, Miura Y, Komai K, Taniguchi M, Shiraishi M, et al. Hyper-methylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum.* 2006;54:779–87.
- Grabiec AM, Reedquist KA. Histone deacetylases in RA: epigenetics and epiphenomena. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:142.

53. Niederer F, Ospelt C, Brentano F, Hottiger MO, Gay RE, Gay S, et al. SIRT1 overexpression in the rheumatoid arthritis synovium contributes to proinflammatory cytokine production and apoptosis resistance. *Ann Rheum Dis.* 2011;70:1866–73.
54. Klein K, Gay S. Epigenetic modifications in rheumatoid arthritis, a review. *Curr Opin Pharmacol.* 2013.
55. Nasu Y, Nishida K, Miyazawa S, Komiyama T, Kadota Y, Abe N, et al. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses synovial inflammation and subsequent cartilage destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2008;16:723–32.
56. Stanczyk J, Pedrioli DM, Brentano F, Sanchez-Pernaute O, Kolling C, Gay RE, et al. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58:1001–9.
57. Rinaldi N, Schwarz-Eywill M, Weis D, Leppelmann-Jansen P, Lukoschek M, Keilholz U, et al. Increased expression of integrins on fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis in vitro correlates with enhanced binding to extracellular matrix proteins. *Ann Rheum Dis.* 1997;56:45–51.
58. Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E, Damsky CH. Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol.* 1989;109:877–89.
59. Pretzel D, Pohlers D, Weinert S, Kinne RW. In vitro model for the analysis of synovial fibroblast-mediated degradation of intact cartilage. *Arthritis Res Ther.* 2009;11:R25.
60. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE. Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci.* 2006;11:529–43.
61. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002;115 Pt 19:3719–27.
62. Hou WS, Li W, Keyszer G, Weber E, Levy R, Klein MJ, et al. Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum.* 2002;46:663–74.
63. Yamanishi Y, Boyle DL, Clark M, Maki RA, Tortorella MD, Arner EC, et al. Expression and regulation of aggrecanase in arthritis: the role of TGF-beta. *J Immunol.* 2002;168:1405–12.
64. Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43:259–69.
65. Pettit AR, Ji H, von Stechow D, Muller R, Goldring SR, Choi Y, et al. TRANCE/RANKL knockout mice are protected from bone erosion in a serum transfer model of arthritis. *Am J Pathol.* 2001;159:1689–99.
66. Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravalles EM. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2006;45:1068–76.
67. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007;13:156–63.
68. Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, et al. 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.* 2000;165:6590–8.
69. Manzo A, Paoletti S, Carulli M, Blades MC, Barone F, Yanni G, et al. Systematic microanatomical analysis of CXCL13 and CCL21 in situ production and progressive lymphoid organization in rheumatoid synovitis. *Eur J Immunol.* 2005;35:1347–59.
70. Canete JD, Celis R, Moll C, Izquierdo E, Marsal S, Sanmarti R, et al. Clinical significance of synovial lymphoid neogenesis and its reversal after antitumor necrosis factor alpha therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:751–6.
71. Koch AE. Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: future targets? *Arthritis Rheum.* 2005;52:710–21.
72. Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: the tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis Rheum.* 2008;58:2968–80.
73. Harada S, Yamamura M, Okamoto H, Morita Y, Kawashima M, Aita T, et al. Production of interleukin-7 and interleukin-15 by fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1508–16.
74. McInnes IB, Liew FY. Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today.* 1998;19:75–9.
75. Miranda-Carus ME, Balsa A, Benito-Miguel M, Perez de Ayala C, Martin-Mola E. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate. *J Immunol.* 2004;173:1463–76.
76. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* 2005;52:1037–46.
77. da Rocha Jr LF, Duarte AL, Dantas AT, Mariz HA, Pitta Ida R, Galdino SL, et al. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *J Rheumatol.* 2012;39:1320–5.
78. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 2008;118:3537–45.
79. Alvaro-Gracia JM, Zvaifler NJ, Brown CB, Kaushansky K, Firestein GS. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol.* 1991;146:3365–71.
80. Page CE, Smale S, Carty SM, Amos N, Lauder SN, Goodfellow RM, et al. Interferon-gamma inhibits interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R49.
81. Goddard DH, Grossman SL, Williams WV, Weiner DB, Gross JL, Eidsvoog K, et al. Regulation of synovial cell growth. Coexpression of transforming growth factor beta and basic fibroblast growth factor by cultured synovial cells. *Arthritis Rheum.* 1992;35:1296–303.
82. Firestein GS, Boyle DL, Yu C, Paine MM, Whisenand TD, Zvaifler NJ, et al. Synovial interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 balance in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1994;37:644–52.
83. FitzGerald O, Soden M, Yanni G, Robinson R, Bresnihan B. Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1991;50:792–6.
84. Walsh DA, Wade M, Mapp PI, Blake DR. Focally regulated endothelial proliferation and cell death in human synovium. *Am J Pathol.* 1998;152:691–702.
85. Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, et al. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med.* 1994;180:341–6.
86. Szekanecz Z, Koch AE. Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis. *Vasc Pharmacol.* 2009;51:1–7.
87. Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Torres C, Brehmer MT, Blanco FJ, et al. Synovial cell-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2003;170:2147–52.
88. Taylor PC. VEGF and imaging of vessels in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S99–107.
89. Taylor PC, Sivakumar B. Hypoxia and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;17:293–8.
90. Ryu S, Lee JH, Kim SI. IL-17 increased the production of vascular endothelial growth factor in rheumatoid arthritis synoviocytes. *Clin Rheumatol.* 2006;25:16–20.
91. Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1998;41:1258–65.
92. Cho ML, Ju JH, Kim HR, Oh HJ, Kang CM, Jhun JY, et al. Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol Lett.* 2007;108:121–8.
93. Cho CS, Cho ML, Min SY, Kim WU, Min DJ, Lee SS, et al. CD40 engagement on synovial fibroblast up-regulates production of vascular endothelial growth factor. *J Immunol.* 2000;164:5055–61.
94. Du R, Lu KV, Petrutsch C, Liu P, Ganss R, Passegue E, et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell.* 2008;13:206–20.
95. Ahn GO, Brown JM. Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell.* 2008;13:193–205.
96. Seandel M, Butler J, Lyden D, Rafii S. A catalytic role for proangiogenic marrow-derived cells in tumor neovascularization. *Cancer Cell.* 2008;13:181–3.
97. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004;10:858–64.
98. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996;16:4604–13.
99. Baslund B, Tvede N, Danneskiold-Samsøe B, Larsson P, Panayi G, Petersen J, et al. Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.* 2005;52:2686–92.