



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

**Facultad de Medicina
Dpto. de Biología Molecular**

**“Respuesta inmune innata en enfermedades
inflamatorias asociadas al envejecimiento:
*Arteritis de Células Gigantes
y Polimialgia Reumática*”**

Directores:

Dr. Víctor M. Martínez Taboada

Dr. Marcos López Hoyos

**Tesis doctoral presentada por Lorena Álvarez Rodríguez
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Cantabria**

Santander, Junio 2013



D. Victor M. Martínez Taboada, Doctor en Medicina y Cirugía y Facultativo Especialista de Área de Reumatología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Investigador del Grupo de Trasplante y Autoinmunidad del IFIMAV, Profesor Asociado del Departamento de Medicina y Psiquiatría de la Universidad de Cantabria,

D. Marcos López Hoyos, Doctor en Medicina y Cirugía y Jefe de Sección de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Investigador del Grupo de Trasplante y Autoinmunidad del IFIMAV.

CERTIFICAMOS que D^{ña}. Lorena Álvarez Rodríguez, Licenciada en Ciencias Biológicas y en Bioquímica ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo de investigación titulado ***“Respuesta immune innata en enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento: Arteritis de Células Gigantes y Polimialgia Reumática”***, cuya parte experimental se ha realizado en el Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Cantabria y en el Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Consideramos que el trabajo reúne los requisitos de originalidad y calidad necesarios para ser presentando y defendido ante un tribunal con el fin de poder optar al título de Doctor por la Universidad de Cantabria.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente en
Santander, 21 de Junio de 2013

Victor M. Martínez Taboada

Marcos López Hoyos

Victor M. Martínez Taboada
Facultativo Esp.de Área de Reumatología
Hospital U. Marqués de Valdecilla
Tf. 942 315453
vmartinezt@medynet.com

Marcos Lopez Hoyos
Jefe de Sección de Inmunología
Hospital U. Marqués de Valdecilla
Tf. 942 203453
mlopezhoyos@humv.es



Jesús Merino Pérez
Catedrático de Inmunología
Dpto Biología Molecular (Facultad de Medicina)
Vicedecano de Posgrado, Facultad de Medicina
Universidad de Cantabria - IFIMAV
Tf: 942 201956 Fax: 942 201945
e-mail: merinoj@unican.es

Jesús Merino Pérez, Catedrático de Inmunología de la Universidad de Cantabria y Coordinador del grupo de investigación “Inmunopatología”

EXPONE:

Que ha llevado a cabo las funciones de TUTOR de la Licenciada en Ciencias Biológicas y en Bioquímica Lorena Álvarez Rodríguez durante todos los periodos de su programa de DOCTORADO en el Programa Interdepartamental Biología Molecular y Biomedicina. Durante este periodo ha desarrollado el proyecto de investigación titulado: ***“Respuesta immune innata en enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento: Arteritis de Células Gigantes y Polimialgia Reumática”*** bajo la codirección científica del Dr Víctor M. Martínez Taboada, Doctor en Medicina y Cirugía y Facultativo Especialista de Área de Reumatología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Investigador del Grupo de Trasplante y Autoinmunidad del IFIMAV, Profesor Asociado del Departamento de Medicina y Psiquiatría de la Universidad de Cantabria, y del Dr. Marcos López Hoyos, Doctor en Medicina y Cirugía y Jefe de Sección de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Investigador del Grupo de Trasplante y Autoinmunidad del IFIMAV.

Lo que hace constar, a efectos de admisión de la Tesis Doctoral, en Santander a veintiuno de junio de dos mil trece.

Fdo: Jesús Merino Pérez

AGRADECIMIENTOS

¡Quién me iba a decir que la parte más dura de la tesis iba a ser esta!. Antes de nada y porque seguramente las lágrimas me nublen la vista y hasta el sentido, quiero agradecer por adelantado a toda aquellas personas que bien directa o indirectamente hayan contribuido a qué haya llegado hasta aquí. Sois muchas, así que espero no olvidarme de nadie, pero si fuese el caso, perdonadme.

Quisiera agradecer en primer lugar y con el corazón en la mano a mis directores de tesis, al Dr. Víctor M. Martínez Taboada y al Dr. Marcos López Hoyos por brindarme la gran oportunidad de formar parte del maravilloso equipo de investigación que dirigen. Por transmitirme su pasión por el mundo de la investigación. Por depositarme su confianza e intentar sacar lo mejor de mí. Por su incansable enseñanza y motivación. Por su gran paciencia y permitirme escribir esta tesis como yo creía que necesitaba hacerlo, a pesar de tener un punto de vista diferente. Pero más importante que todo esto, por ser mis AMIGOS más que mis jefes y apoyarme en los muchos momentos difíciles por los que tenido que pasar durante estos años y especialmente en el último tramo de esta tesis. Marcos, al final tenías razón, pero esta es la única parte de la tesis en la que voy a llorar.

A los Dres. Jesús y Ramón Merino, por enseñarme y hacerme sentir con una más de su laboratorio. Aún recuerdo el día que os presenté la suficiencia investigadora y me la distéis vuelta a un par de días vista. De verdad, muchas gracias por esa maravillosa enseñanza. Sois todo un ejemplo de cómo se hace un excelente trabajo. Y cómo no, agradecer a su genial equipo que he tenido la gran suerte de conocer, en especial a Marcos y Jorge. Chicos, sois geniales, muchísimas gracias por todo vuestro apoyo en los buenos y malos momentos. Por fin os he alcanzado!!!

Al Dr. Francisco Leyva-Cobián, por permitirme realizar mi tesis doctoral en el Servicio de Inmunología, y tratarme como si fuese una más del servicio.

Agradecer especialmente al Dr. Pedro Muñoz por su inestimable ayuda con los análisis de regresión logística y el metaanálisis. Por tener siempre su puerta del despacho abierta para cualquier duda que me pudiese surgir con las estadísticas.

Agradecer a la Unidad de Genética Molecular, en especial al Dr. Jose Luis Fernández Luna, por estar siempre dispuesto a colaborar y por su gran ayuda en parte de los experimentos presentados en esta tesis. Agradecer a su equipo, que siempre me han tratado genial cuando he necesitado algo. En especial a Lara, por no importarle nunca que le llevase muestras cuando yo estaba hasta arriba de congresos y no podía quedarme con ella para ayudarle. Y a los que ya no están en el equipo pero que he tenido la gran suerte de conocer, Lore, duro el camino pero ya aquí estoy. Y qué decir de Patricia, un gran descubrimiento. Nunca olvidaré ese día de los santos inocentes. Muchísimas gracias Patri, por estar ahí. Me has demostrado que puedo contar siempre contigo.

Al Dr. Jose Antonio Amado y a la Dra. Maite García-Unzueta del Servicio de Endocrino por su colaboración con todos los experimentos de la vitamina D.

Al Servicio de Microbiología, en especial a Dr. Jesús Agüero y a Maitane por su ayuda en los experimentos de identificación de virus. Maitane, una suerte además haber compartido contigo laboratorio en inmuno. Gracias por transmitirnos esa alegría. Y en especial, gracias por estar pendiente a mis llamadas personales. De verdad, mil gracias.

Agradecer a los Servicios de Reumatología del Hospital U. Marqués de Valdecilla y Hospital de Sierrallana, por el reclutamiento de los pacientes y la revisión de las historias clínicas, sobretudo al Dr. Jaime Calvo y a Cristina Mata por su compromiso con el estudio. Pero en especial a mis compis de Reuma con los que he tenido la gran suerte de compartir desde pipeta hasta congresos, y de los que guardo maravillosos recuerdos, Granada, A Coruña, París, Roma, San Francisco....y más. En especial a mi "Co R" de pipeta Mario. Aún recuerdo nuestros primeros días delante del panel de citometría mirando que anticuerpos teníamos que marcar. Fue una época guay. Una pena que nos trasladarán. Mariete, para mi eres genial, tiruriiii. Y a mis "R" pequeños, Nacho, Kity y Javi. Me ha encantado teneros una temporadita por el laboratorio y poder ampliaros vuestra visión de la reumatología. Espero que vosotros también disfrutáseis de ello. Y Kity, Kity, Kity, siempre que escucho a Scott Mckenzie me acuerdo de ti, "If you going to San Francisco.....". No tengo palabras para agradecerte lo que supuso ese congreso para mí. Hiciste fácil lo difícil. Gracias. De verdad, chicos sois geniales, os quiero, que lo sepáis!!!!. Y ahora ya sabéis lo que toca, a cuadrar agendas con las guardias porque esto habrá que celebrarlo.

A Vicky, por ser cómo eres, maravillosa. Gracias por "visitarme" a mí también, y estar siempre ahí. Sé que siempre puedo contar contigo. Para mí, de verdad, es una gran suerte tener tu amistad. Siempre recordaré con cariño el congreso de A Coruña porque allí nos conocimos.

Mil gracias a Montse, Carmen y M^a José, mis segundas "mamás". Por sus más que cariñosas palabras de apoyo. Por hacerme sentir que puedo contar con ellas mucho más que para extraer sangre a los pacientes de este estudio. Por brindarme esa amistad que llevo muy dentro de mi corazón. No sé dónde acabaré en un futuro pero lo que sí sé es que siempre tendré vuestras puertas abiertas. Os quiero.

A María José Marín, por su gran dedicación y enseñanza para conmigo cuando entré a formar parte de este equipo. Por preocuparse siempre de cómo iban mis experimentos. Y por seguir aún teniendo su apoyo a pesar de que nuestras vidas han seguido caminos diferentes.

A David San Segundo, por tu apoyo en estos años desde que volviste de Oxford, sobretodo con el FACSDiva, y por estar siempre intentándome echar una mano, aunque yo casi nunca me deje. Ya me conoces...

A Iñaki, Ainhoa, Marian, Tato, Maria, Marta, Carolina y David, por su labor como técnicos sin los que esta tesis nunca se podría haber llevado a cabo. Esta tesis es tan mía como vuestra. Gracias por vuestra paciencia, sé que a veces he tenido un elevado nivel de exigencia. Pero sobre todo gracias a la dedicación y al esfuerzo que le habéis puesto, la investigación es así de dura. De forma especial quiero agradecer a Carolina por esos maravillosos consejos. Sin tu ayuda nunca habría conseguido desbloquearme para acabar de escribir la discusión. Me encanta verte así de bien.

A mi pequeño siamés, Iñaki, el mejor compañero que haya podido tener, con el que he compartido muchos y muchos momentos, enfados, lloros, alegrías, risas y más risas y con él que he podido forjar una gran amistad fuera de las paredes del laboratorio. Sin tu ayuda creo que nunca hubiese acabado esta tesis. Gracias por ceder a mis antojos y alquilar la moto en Roma, me encantó.

A Cristina, una de las mejores personas que he podido conocer en esta vida. Por su gran corazón y humanidad. Por tener siempre un minuto para escucharme y una sonrisa, e intentar alegrarte el día. Por tener siempre su apoyo incondicional. No tengo palabras. Gracias de verdad.

A Jose Ramos por llenarme de ilusión, por ver las cosas de diferente manera y por estar siempre dispuesto a colaborar. Trajiste buen rollo al laboratorio. Muchísimas gracias por esa pedazo de foto para poner de portada en la tesis. Es todo un honor. Sara, mucho ánimo que la siguiente eres tú. Quitale el miedo, que esto está "chupao".

Agradecer a Silvia, nuestra nueva predoc, su paciencia durante estos últimos meses en los que no he podido estar muy pendiente de ella.

Al resto de compañeros del Servicio de Inmunología tanto de asistencial como de investigación: Gonzalo, Eugenio, residentes, becarios, técnicos, auxiliares, secretarias, entre los que me he sentido como en familia. A todos aquellos que habéis pasado por el laboratorio y ya no estáis con nosotros, Lorena, Fidel, Mariate, Patricia, Josefa, pero que habéis marcado de alguna manera mi vida.

A Maria Ruiz, mi compañera de tesis con la que comencé esta andadura, y a la que de verdad deseo que todo le vaya bien.

A Marta Peña y Eli por su gran ayuda con las separaciones en el FACS Aria. A Eli, la persona más dulce que he conocido jamás. Gracias por tu preocupación por los experimentos y por lo que no son experimentos. Martita, te deseo lo mejor del mundo.

Quiero agradecer especialmente a todos mis amigos, que por suerte son muchos y he tenido la oportunidad de comprobarlo. En especial a Chus, Jorge, Sandra, Alma, Pati, Héctor, Esther, Jose..... Sois tantos que es prácticamente imposible mencionaros a todos, pero muchísimas gracias por estar pendiente de mí y contad siempre conmigo para todo. Sois geniales, y yo superafortunada por teneros. Os quiero.

En especial, a mis amigas de toda la vida, desde la guardie, sé dice pronto, Esti, Lorena, María, Ana, Silvia. ¿cuántos años? Uffff, demasiados. Qué decir, si siempre habéis estado ahí. Sois como mi familia, en lo bueno y en lo malo. Mery, este es nuestro año.!!!.

A mis compis de carrera de Salamanca, mis hadas, por estar ahí dándome ánimos a pesar de la distancia. Chicas, ahora si que espero poder ir a los siguientes encuentros. Manuel va por ti. Que sepas que te echa mucho en falta.

Pero especialmente a mi familia, por creer siempre en mí y darme fuerzas cuando yo no las tenía. Por dar prioridad siempre a mis estudios antes que a cualquier otra cosa. Por permitirme estudiar lo que me gustaba, a pesar de que era un coste mayor para vosotros. Pero puedo deciros que ha sido una de las mejores experiencias de mi vida. A Terry y Yako, mis perros, por estar a los pies de mi silla vigilando q no me levantara y siguiese estudiando. Cuando os echo en falta, chiquitines. Gracias de todo corazón a mi madre, por su dedicación y paciencia, sobretodo este último mes cuando el agotamiento y el bloque mental me han hecho no tener ganas de hablar ni de nada. A mi hermana por creer y estar orgullosa de mí. Yo lo estoy más de ti, que lo sepas.

A mi padre por enseñarme el significado de la palabra lucha, no rendirse jamás. Por transmitirme su fuerza y positividad. Por inculcarme los mismos valores, que le han hecho a él una persona maravillosa. Has dejado un hueco muy muy grande. Papá, perdóname pero no llegué.

Y ya por último, pero con mi mayor cariño quisiera agradecer a todos aquellos pacientes y controles sanos, que de una forma altruista han querido participar en este proyecto. Sin vuestra colaboración esta tesis no habría sido posible. Mi mayor logro no va a ser la obtención de un título, sino saber que estos resultados algún día sirvan para ayudaros en vuestras patologías.

A mi padre

NO TE RINDAS

*No te rindas, aún estás a tiempo
De alcanzar y comenzar de nuevo,
Aceptar tus sombras,
Enterrar tus miedos,
Liberar el lastre,
Retomar el vuelo.*

*No te rindas que la vida es eso,
Continuar el viaje,
Perseguir tus sueños,
Destruir el tiempo,
Correr los escombros
Y destapar el cielo.*

*No te rindas, por favor no cedas
Aunque el frío queme,
Aunque el miedo muerda,
Aunque el sol se esconda,
Y se calle el viento,
Aún hay fuego en tu alma,
Aún hay vida en tus sueños,
Porque la vida es tuya y tuyo también el deseo
Porque lo has querido y porque te quiero
Porque existe el vino y el amor, es cierto.
Porque no hay heridas que no cure el tiempo.*

*Abrir las puertas,
Quitar los cerrojos,
Abandonar las murallas que te protegieron,
Vivir la vida y aceptar el reto
Recuperar la risa
Ensayar un canto
Bajar la guardia y extender las manos
Desplegar las alas
E intentar de nuevo,
Celebrar la vida y retomar los cielos.*

*No te rindas, por favor no cedas
Aunque el frío queme,
Aunque el miedo muerda
Aunque el sol se ponga
Y se calle el viento,
Aún hay fuego en tu alma
Aún hay vida en tus sueños
Porque cada día es un nuevo comienzo
Porque esta es la hora y el mejor momento
Porque no estás solo, PORQUE YO TE QUIERO.*

Mario Benedett

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	V
ABREVIATURAS	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
1.- Respuesta Inmune Innata	4
1.1.- Fagocitosis.....	6
1.1.1.- Migración o quimiotaxis.....	7
1.1.2.- Reconocimiento e ingestión de patógenos.....	8
1.1.3.- Destrucción de patógenos mediante respiración oxidativa.....	10
1.2.- Toll like receptors	11
1.2.1.- Estructura	12
1.2.2.- Localización	12
1.2.3.- Reconocimiento de PAMPs por TLRs	13
1.2.3.1.- PAMPs bacterianos.....	14
1.2.3.2.- PAMPs virales.....	15
1.2.3.3.- PAMPs fúngicos	16
1.2.3.4.- PAMPs protozoos y parásitos.....	16
1.2.4.- Vías de señalización	17
1.2.4.1.- Vía dependiente de MyD88	20
1.2.4.2.- Vía dependiente de TRIF.....	22
1.2.4.3.- Reguladores negativos.....	23
1.2.5.- TLRs y ligandos endógenos.....	23
2.- Inmunosenescencia.....	24
3- Vitamina D	27
3.1.- Efectos inmunomoduladores de la vitamina D sobre el sistema inmune	28
3.2.- Vitamina D y péptidos antimicrobianos.....	30
3.3.- Receptor nuclear de la vitamina D	30
3.4.- Vitamina D y enfermedades autoinmunes e inflamatorias	32
4.- Arteritis de células gigantes y Polimialgia reumática	33
4.1.- Epidemiología.....	34

4.2.- Criterios de clasificación	35
4.3.- Manifestaciones clínicas	37
4.3.1.- ACG	37
4.3.1.1.- Síndrome constitucional	37
4.3.1.2.- Manifestaciones focales	37
4.3.1.3.- Polimialgia reumática	39
4.3.2.- PMR	39
4.4.- Pruebas diagnósticas	40
4.4.1.- Datos de laboratorio	40
4.4.2.- Biopsia de la arteria temporal	41
4.4.3.- Imagen	42
4.5.- Tratamiento	42
4.6.- Etiopatogénesis	45
4.6.1.- Etiología	45
4.6.2.- Predisposición genética	45
4.6.3.- Anatomía patológica.....	46
4.6.4.- Patogénesis	47
II. OBJETIVOS	53
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
1.- Pacientes	59
2.- Cuantificación de la concentración de IL-8 en suero por citometría de flujo	61
3.- Análisis del proceso fagocítico en granulocitos neutrófilos y monocitos	62
3.1.- Cuantificación de la función quimiotáctica de neutrófilos	62
3.2.- Cuantificación de la actividad fagocítica de neutrófilos y monocitos	64
3.3.- Cuantificación de la respiración oxidativa de neutrófilos y monocitos.....	65
4.- Análisis de TLRs.....	68
4.1.- Determinación de la expresión proteica de TLRs en PBMCs	68
4.2.- Evaluación de la función de TLRs en monocitos	70
4.3.- Genotipado de polimorfismos del TLR7	72
4.4.- Estudio de estimulación de PBMCs de un donante sano con plasma de pacientes	72

4.5.- Estudio de expresión de genes implicados en las vías de señalización del IFN tipo I	73
4.6.- Detección de IFN- α soluble en sobrenadantes de cultivos celulares.....	74
4.7.- Estudio de identificación de virus respiratorios en plasmas.....	75
4.8.- Genotipado de los polimorfismos del gen de TLR4 y TLR9	76
5.- Análisis de la vitamina D	80
5.1.- Determinación de los niveles circulantes de 25-hidroxivitamina D y de la hormona paratiroidea	80
5.2.- Determinación de los niveles circulantes de catelicidina	80
5.3.- Genotipado de los polimorfismos del gen VDR.....	80
6.- Análisis Estadístico	83
IV. RESULTADOS.....	85
1.- Los pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento presentan un aumento en los niveles séricos de IL-8 durante la fase activa de la enfermedad.....	87
2.- Alteración de la función fagocítica en las enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento	89
2.1.- Los pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento presentan un aumento en la actividad quimiotáctica.....	91
2.2.- Los pacientes con ACG poseen un aumento en la capacidad fagocítica	92
2.3.- La respiración oxidativa está reducida en los pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento	94
2.4.- Relación entre las funciones de los leucocitos circulantes y la concentración sérica de proteína C reactiva	96
3.- Expresión y función diferencial de los TLRs en PBMCs de pacientes con Arteritis de Células Gigantes y Polimialgia Reumática.....	97
3.1.- Expresión diferencial de TLRs en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento en fase activa de la enfermedad	98
3.2.- Los pacientes con PMR y ACG tienen un descenso en la respuesta de TLR7 durante la fase aguda de la enfermedad.....	100
3.3.- Los cambios en la expresión y función de los TLRs también pueden ocurrir en otras enfermedades caracterizadas por una fuerte respuesta de fase aguda	101
3.4.- El descenso en la respuesta del TLR7 se recupera tras la remisión completa de la enfermedad	103
3.5.- El descenso en la respuesta del TLR7 principalmente afecta a la producción de citocinas proinflamatorias	105

3.6.- El plasma de pacientes con PMR y ACG aumenta la expresión de genes implicados en la vía de señalización de IFN en PBMCs de individuos sanos	106
3.7.- Identificación de virus respiratorios en plasma de pacientes con PMR y ACG activas	108
4.- Estudios de asociación entre polimorfismos en el gen del TLR4 y TLR9 y susceptibilidad a padecer Arteritis de Células Gigantes y Polimialgia Reumática	110
4.1.- Análisis de las distribuciones alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen de TLR4 y TLR9 en PMR y ACG	110
4.2.- Estudios de asociación de los polimorfismos del gen del TLR4 y TLR9 con la gravedad en pacientes con PMR y ACG	121
4.3.- Expresión y función de los TLRs según el genotipo de los polimorfismos en gen del TLR4 y TLR9 en pacientes con ACG y PMR activas y controles sanos.....	124
5.- Niveles séricos de la Vitamina D y polimorfismos del receptor de la vitamina D en los pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento	128
5.1.- Los niveles disminuidos de vitamina D se asocian con el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento	129
5.2.- Los niveles circulantes de vitamina D se correlacionan con la edad y se localizan en el rango inferior de los valores normales en la mayoría de los individuos sanos	130
5.3.- Los niveles circulantes de vitamina D en individuos sanos se asocian con la expresión y función del TLR7	131
5.4.- Los niveles circulantes de catelicidina descienden con la edad y se correlacionan con los niveles circulantes de vitamina D	132
5.5.- Análisis de las distribuciones alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen de VDR en PMR y ACG.....	134
5.6.- Estudios de asociación de los polimorfismos del gen del VDR con niveles séricos de 25(OH)D ₃ y manifestaciones clínicas en pacientes con PMR y ACG	141
V. DISCUSIÓN.....	145
VI. CONCLUSIONES	159
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	165
ANEXO I: PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS.....	191
ANEXO II: OTRAS PUBLICACIONES DEL PERIODO PREDOCTORAL	241

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Principales características de la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.	3
Tabla 2. Componentes celulares y sistemas de reconocimiento del sistema inmune innato.....	4
Figura 1. Cascada de reclutamiento de neutrófilos y monocitos	7
Figura 2. Reconocimiento e ingestión de patógenos.....	9
Figure 3. Complejo NADPH oxidasa	11
Tabla 3. Detección de PAMPs a través de TLRs	13
Figura 4. Reconocimiento de PAMPs por TLRs de la superficie celular	18
Figura 5. Reconocimiento de PAMPs por TLRs intracelulares.....	19
Figura 6. Vías de señalización de TLRs	21
Tabla 4. Principales alteraciones del envejecimiento inmunológico sobre la inmunidad adquirida	25
Figura 7. Metabolismo de la vitamina D	27
Tabla 5. Efectos de 1,25 (OH) ₂ VD ₃ sobre las células del sistema inmune.....	28
Figura 8. Esquema general de los mecanismos inmunomoduladores de la vitamina D sobre monocitos/macrófagos, células dendríticas, células T, células B y células <i>natural killer</i>	29
Figura 9. -Mecanismo de acción de la vitamina D dentro del núcleo de sus células diana	30
Figura 10. Estructura genómica del locus VDR en el cromosoma 12q13 y posición de algunos polimorfismos en el gen del receptor de la vitamina D	31
Tabla 6. Criterios de clasificación de la ACR (1990) para la Arteritis de Células Gigantes	35
Tabla 7. Criterios diagnósticos de la Polimialgia Reumática	36
Tabla 8. Criterios provisionales PMR (ACR/EULAR)	37
Figura 11. Respuesta inflamatoria sistémica en Arteritis de células gigantes y Polimialgia reumática	47
Figura 12. Mecanismos patogénicos en ACG.....	48

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 1.-Datos demográficos y principales características clínicas de los pacientes con polimialgia reumática (PMR) y arteritis de células gigantes (ACG).	59
Tabla 2.-Número de sujetos sanos y pacientes con ACG y PMR con enfermedad activa antes del tratamiento esteroideo.....	60
Figura 1. Análisis de la función quimiotáctica de granulocitos neutrófilos.....	63
Figura 2. Análisis del descenso de la expresión de la molécula de adhesión celular LECAM-1.	63
Figura 3. Análisis de la actividad fagocítica de granulocitos y monocitos.....	65

Figura 4. Análisis de la actividad enzimática de granulocitos y monocitos.....	67
Figura 5. Análisis de la expresión de TLRs por citometría de flujo en sangre.	69
Tabla 3. Listado de los diferentes agonistas específicos de TLRs humanos y de las concentraciones finales empleadas en los cultivos para evaluar la función de los TLRs.....	70
Figura 6. Evaluación de la función de los TLRs en monocitos mediante citometría de flujo	71
Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para el genotipado de los SNPs.....	72
Figura 7. Estudio de estimulación de células mononucleares (PBMCs) de un donante sano con plasma de pacientes.	73
Tabla 5. Referencias de las sondas Taqman para cada uno de nuestros genes de interés, tomadas de la librería de <i>Applied Biosystems</i>	74
Tabla 6. Listado de virus detectados por el kit <i>Real Accurate® Respiratory RT PCR</i>	75
Tabla 7. Secuencias específicas de los oligonucleótidos y diferentes condiciones utilizadas en la PCR-RFLP para identificar los polimorfismos en el gen del TLR4	77
Figura 8. Fragmentos de ADN obtenidos para los polimorfismos del gen de TLR4.....	78
Tabla 8. Secuencias de los diferentes oligonucleótidos y condiciones utilizadas en la PCR para identificar los polimorfismos en el gen del TLR9.....	79
Figura 9. Fragmentos de ADN obtenidos para los polimorfismos del gen de TLR9.....	79
Tabla 9: Condiciones de genotipado y secuencias de los primers de los genes de VDR estudiados	81
Figura 10. Fragmentos de ADN obtenidos para los polimorfismos del gen VDR	82

IV. RESULTADOS

Figura 1.- Niveles séricos de IL-8 en individuos sanos (HC) jóvenes (<30 años) y mayores (>60 años).	88
Figura 2.- Niveles séricos de IL-8 en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento.....	88
Figure 3- Niveles séricos de IL-8 en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas a la edad en fase activa (pre), en remisión clínica bajo tratamiento (post), y en remisión completa sin tratamiento (remisión)	89
Figura 4.-Influencia del envejecimiento en la función fagocítica en leucocitos en individuos sanos (HC) jóvenes (<30 años) y mayores (>60 años) mediante citometría de flujo.	90
Figura 5.- Determinación de la actividad quimiotáctica en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento	91
Figura 6.- Influencia del tratamiento y del estado de la enfermedad en la actividad quimiotáctica en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento.....	92
Figura 7.- Determinación de la actividad fagocítica en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento.	93
Figura 8.- Influencia del tratamiento y del estado de la enfermedad en la actividad fagocítica en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento.....	93
Figura 9.- Determinación de la respiración oxidativa en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento	94

Figura 10.- Influencia del tratamiento y del estado de la enfermedad en la actividad de la respiración oxidativa en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento.	95
Figura 11.- Correlación entre la respiración oxidativa y la proteína C reactiva en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento..	96
Figura 12.- Determinación de la expresión del TLR7 en PBMCs (linfocitos B, linfocitos T y monocitos)	98
Figura 13.- Determinación de la expresión de TLRs humanos (TLR1-TLR9)	99
Figura 14. Determinación de la función del TLR7	100
Figura 15 A.- Determinación de la expresión y función del TLR4	101
Figura 15 B.- Determinación de la expresión y función del y TLR7.....	102
Figura 16. Influencia del tratamiento con CS en la función del TLR7.	103
Figura 17.- Genotipado de los SNPs del TLR7 mediante el sistema Multiplex SnapShot.	104
Figura 18. Función del TLR7 en pacientes en remisión clínica completa y sin tratamiento	105
Figura 19.- Determinación de los niveles de IFN- α en sobrenadantes de cultivo de pacientes al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento de CS.....	106
Figura 20.- Expresión del TLR7 en PBMCs de un individuo sano tras estimulación con plasma	107
Figura 21. Expresión génica de genes de respuesta viral tras estimulación de PBMCs de un individuo sano con plasma	108
Tabla 1.- Identificación de proteínas virales en plasma de pacientes con PMR y ACG activas y controles sanos.....	109
Tabla 2.- Distribución del p-valor del equilibrio Hardy-Weinberg de los polimorfismos del gen del <i>TLR4</i> en pacientes y controles sanos.....	111
Tabla 3.- Distribución del p-valor del equilibrio Hardy-Weinberg de los polimorfismos del gen del <i>TLR9</i> en pacientes y controles sanos.....	111
Tabla 4.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del <i>TLR4</i> (+896 A/G y +1196 T/C) en pacientes con ACG frente a controles sanos.....	112
Tabla 5.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del <i>TLR4</i> (+896 A/G y +1196 T/C) en pacientes con PMR frente a controles sanos.	113
Tabla 6.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del <i>TLR4</i> (+896 A/G y +1196 T/C) en pacientes con PMR y ACG..	114
Tabla 7.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del <i>TLR9</i> (T-1486C y T-1237C) en pacientes con ACG frente a controles sanos)	115
Tabla 8.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del <i>TLR9</i> (T-1486C y T-1237C) en pacientes con PMR frente a controles sanos	116
Tabla 9.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del <i>TLR9</i> (T-1486C y T-1237C) en pacientes con PMR y ACG	117
Tabla 10. Distribución haplotípica del gen del <i>TLR4</i> (+1196 T/C y +896 A/G) en pacientes y controles	118
Tabla 11. Distribución haplotípica del gen del <i>TLR9</i> (T-1486C y T-1237C) en pacientes y controles	119

Figura 22. Resultados del meta-análisis acumulativo para el polimorfismo del gen del TLR4 (+896A/G).....	120
Figura 23. Gráficos Funnel de error estandar vs log odds ratio	121
Figura 24. Pronóstico de la enfermedad en pacientes con ACG y PMR según el genotipo del TLR4	122
Figura 25A. Pronóstico de la enfermedad en pacientes con ACG y PMR según el genotipo del TLR9 (T-1486C)	123
Figura 25B. Pronóstico de la enfermedad en pacientes con ACG y PMR según el genotipo del TLR9 (T-1237C)	124
Figure 26- Expresión del TLR4 en subpoblaciones de PBMCs (células B, T y monocitos) según el genotipo del TLR4 en pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y en controles sanos	125
Figure 27- Función del TLR4 según el genotipo del TLR4 en pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y en controles sanos.	126
Figure 28- Expresión del TLR9 en subpoblaciones de PBMCs según el genotipo del TLR9 en pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y en controles sanos	127
Figura 29.- Niveles circulantes de 25-OH-Vitamina D en HC y pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo.....	129
Figura 30 Influencia de la edad sobre los niveles de vitamina D en individuos sanos (HC).....	130
Figura 31. Correlación entre niveles circulantes de Vitamina D y la expresión y función de TLRs en individuos sanos (HC)	131
Figure 32. Función del TLR7 según las estaciones soleadas en ancianos	132
Figure 33.- Determinación de lo niveles circulantes de catelicidina en individuos sanos	133
Figura 34. Correlación entre los niveles circulantes de catelicidina y los niveles de 25(OH)D ₃ en individuos sanos	133
Tabla 12.- Distribución del p-valor del equilibrio Hardy-Weinberg de los polimorfismos del gen del VDR en pacientes y controles sanos	134
Tabla 13.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del VDR (<i>FokI</i> , <i>BsmI</i> , <i>Apa I</i> y <i>TaqI</i>) en pacientes con ACG y controles sanos	135
Tabla 14,- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del VDR (<i>FokI</i> , <i>BsmI</i> , <i>Apa I</i> y <i>TaqI</i>) en pacientes con PMR y controles sanos.....	137
Tabla 15,- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del VDR (<i>FokI</i> , <i>BsmI</i> , <i>Apa I</i> y <i>TaqI</i>) en pacientes con PMR y ACG	139
Figura 35- Niveles de vitamina D según el genotipo de los polimorfismos del gen VDR en pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y en controles sanos >60 años.	141/142

V. DISCUSIÓN

Tabla 1. Evidencias sobre una posible etiología infecciosa en ACG/PMR.....	149
Figura 1. Hipótesis posibles que expliquen la disfunción del TLR7.....	150

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	Concepto
1,25(OH)₂VD₃	1,25 dihidroxivitamina D
25(OH)VD₃	25-hidroxivitamina D
ACG	Arteritis de células gigantes
AcMo	Anticuerpo monoclonal
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
ACVA	Accidente cerebro-vascular arterial
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	Alofocianina
APC	Célula presentadora de antígeno
AR	Artritis reumatoide
ARM	Angiografía por resonancia magnética
ARN	Ácido ribonucleico
ARNds	Ácido ribonucleico cadena doble
ARNss	Ácido ribonucleico cadena sencilla
AT	Arteria temporal
ATC	Angiografía por tomografía computerizada de contraste
ATP	Adenosin-trifosfatasa
BAT	Biopsia de la arteria temporal
BFA	Brefeldina A
BSA	Albúmina bovina sérica
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL	Quimiocina-CC ligando
CCR	Receptor de quimiocinas
CMVM	Citomegalovirus murino
CpG	2'desoxicitidina-fosfato guanosina
CS	Corticoides

CVs	Coeficientes de variación
CXC	Quimiocina (cisteína-X aminoácido-cisteína)
CyP24A1	24-hidroxilasa
CyP27A1	25-hidroxilasa
CyP27B1	1- α -hidroxilasa
Cys	Cisteína
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DC	Células dendríticas
DD	<i>Death domain</i>
DE	Desviación estándar
DHR-123	Dihidrorrodamina
dNTP	Desoxirribonucleótido tri-fosfato
EDTA	Etilendiaminotetraacético
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSobert Assay</i>
EORA	Artritis reumatoide de inicio en el anciano
ER	Enzima de restricción
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
FBS	Suero fetal bovino
FCS	Forward scatter
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLS1	<i>Synthetic lipoprotein (Pam2CGDPKHPKSF)</i>
fMLP	N- formil-metionil-leucil-fenilalanina
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gln	Glutamina
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HC	Controles sanos
His	Histamina
HKLM	<i>Heat-killed preparation of Listeria monocytogenes</i>
HOCL	Ácido hipocloroso
HVR	Región hipervariable

IC	Intervalo de confianza del 95%.
ICAM	<i>Intracellular adhesion molecule</i>
IFIT1	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IKK	<i>IkappaB Kinases</i>
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IRAK	<i>IL-1 receptor-associated Kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
LBP	<i>LPS-binding protein</i>
LCR	Receptores lectina tipo C
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LES	Lupus eritematoso sistémico
Leu	Leucina
LFA-1	<i>Leukocyte function-associated antigen type 1</i> o CD11aCD18
LL-37	Catelicidina
LPS	Lipopolisacárido
LRR	<i>Leucine rich repeat domain</i> , repeticiones ricas en leucina
LTA	Ácido lipoteicoico
MAC-1	<i>Macrophage antigen type 1</i> o CD11bCD18
MAPKs	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MBL	<i>Mannose binding lectin</i>
MFI	Intensidad de fluorescencia media
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MICA	Gen A relacionado a la cadena de clase I del MHC
MMP	Metaloproteinasa de la matriz
MPO	Mieloperoxidasa
MyD88	<i>Myeloid-differentiation primary-response protein-s88</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NFkB	<i>Nuclear factor kappa B</i>

NK	Células <i>natural killer</i>
NLR	Receptores tipo nod
NO	Óxido nítrico
O₂⁻	Anión superóxido
O₂	Oxígeno molecular
ODN2006	<i>Oligonucleotides rich in unmethylated CpG dinucleotides</i>
OR	Odd ratio
Pam3CSK4	<i>Pam3CysSerLys4</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBMCs	Células mononucleares
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Proteína C reactiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pDC	Células dendríticas plasmacitoides
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína-Clorofila Peridina
PET	Positron emission tomography
PFA	Paraformaldehído
PGN	Peptidoglicano
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMN	Polimorfonucleares
PMR	Polimialgia reumática
poly I:C	Ácido poliinosínico-policitidílico
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
PTH	Hormona paratiroidea
Q-PCR	PCR cuantitativa
R-123	Rodamina
R848	Resiquimod
RE	Retículo endoplásmico

RFA	Reactantes de fase aguda
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RIA	Radioinmunoensayo
RIA	Respuesta inmune adquirida
RII	Respuesta inmune innata
RNI	Reactivos intermediarios de nitrógeno
ROI	Reactivos intermediarios de oxígeno
rs	Secuencia de referencia
RS3PE	Sinovitis simétrica seronegativa remitente con edema con fovea
RT	Retrotranscripción
RT	Temperatura ambiente
RXR	Receptor del ácido retinoico
SCID	Severe-combined immunodeficiency
Ser	Serina
SNP	Polimorfismos de un único nucleótido
SOD	Superóxido dismutasa
SpA	Espondiloartritis
SSc	Esclerosis sistémica
TAB	<i>TAK1 binding proteins</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TCR	Receptor de la célula T
tGPI	Glicosilfosfatidilinositol
Th	Linfocitos T <i>helper</i> o <i>colaboradores</i>
TIMP	Inhibidor de metaloproteinasas
TIR	<i>Toll-interleukin 1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adapter protein</i>
TLR	Receptores tipo toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAF6	<i>TNF-receptor-associated factor 6</i>
TRAM	<i>TRIF-related adapter molecule</i>
Treg	Células T reguladoras
Tr1	Células T reguladoras
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing-IFN-β</i>

UCTD	Enfermedad del tejido conjuntivo indiferenciada
USP18	<i>Ubiquitin specific peptidase 18</i>
UTR	<i>Untranslated region</i>
UVB	Radiación de la luz ultravioleta B
VD₃	Vitamina D
VDR	Receptor nuclear de la vitamina D
VDRE	<i>Vitamin-D responses elements</i>
VEFG	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEMC	Virus de la encefalomiocarditis
VHS	Virus herpes simplex
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VSG	Velocidad de sedimentación globular
VSR	Virus sincitial respiratorio
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
VTMM	Virus tumor mamario murino
$\Delta\Delta Ct$	Método comparativo Ct

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune tradicionalmente se ha dividido en dos ramas, la inmunidad innata y la inmunidad adquirida, cada una de ellas con unas características y funciones diferentes (**Tabla 1**).

Tabla 1-. Principales características de la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.

	Innata	Adquirida
Tipos celulares	Todas células inmunes	Linfocitos T y B
Generación	Código genético (se heredan)	Mutación somática (no se heredan)
Diversidad	$+ (10^2)$	$++++++ (10^{14})$
Ligandos	Exógenos (PAMPs*)	Exógenos y endógenos
Características ligandos	Nº limitado Muy conservados Familias de patógenos	Posibilidades ilimitadas Estructuras moleculares específicas
Discriminación propio-no propio	Perfecta. Seleccionada durante la evolución	Imperfecta. Depende de células somáticas individuales
Expresión receptores	No clonal	Clonal
Respuesta	Moléculas co-estimuladoras Citocinas (IL-1 β , IL-6) Quimiocinas (IL-8)	Expansión clonal y anergia IL-2 Citocinas efectoras (IFN- γ , IL-4)
Rapidez respuesta	Inmediata	3-5 días
Generación de memoria	No	Sí

Abreviaturas: PAMPs: *pathogen associated molecular patterns*

La inmunidad innata es una forma ancestral de defensa del hospedador, que depende de mecanismos que no son específicos para un determinado antígeno o patógeno. Las células del sistema inmune innato (neutrófilos, monocitos/macrófagos y células dendríticas) basan sus mecanismos en el principio de reconocimiento de patrones. Así, a través de una serie de receptores heredados, estas células detectan la infección y la invasión tisular mediante el reconocimiento de estructuras moleculares altamente conservadas en los patógenos. Tras la estimulación, el sistema inmune innato induce la producción de citocinas y promueve la inflamación. En cambio, la inmunidad adquirida es altamente específica para un antígeno y posee la extraordinaria capacidad de generar memoria. La respuesta inmune adquirida está mediada por las células T y B que poseen receptores

específicos de antígeno, tanto exógenos como endógenos. Esta gran diversidad de receptores específicos de antígeno se genera por recombinación génica. La inmunidad innata y la inmunidad adquirida están altamente conectadas [1,2].

1. RESPUESTA INMUNE INNATA

La principal diferencia entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida se basa en los mecanismos y en los receptores usados para el reconocimiento inmunológico. El reconocimiento de patógenos microbianos es un requisito esencial para el inicio de la respuesta inmune innata, y está mediado por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) codificados en la línea germinal, lo cual significa que la especificidad de cada receptor está predeterminada genéticamente.

Los PRRs se expresan en la membrana de muchas células efectoras del sistema inmune innato (Tabla 2), pero principalmente en fagocitos y en células presentadoras de antígeno (APC) como macrófagos, células dendríticas (DC) y células B. Estos PRRs van a reconocer estructuras moleculares conservadas, ampliamente compartidas por los patógenos, y que reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

Tabla 2. Componentes celulares y sistemas de reconocimiento del sistema inmune innato.

Componentes celulares	
Elementos de alerta	Sistema del complemento, Plaquetas, Mastocitos/Basófilos
Fagocitos	Neutrófilos, Monocitos/Macrófagos
Células Tóxicas	Células <i>Natural Killer</i> , Eosinófilos
Células Presentadoras de Antígeno, conexión con la RIA	Células dendríticas, Macrófagos, Células dendríticas foliculares
Sistemas de reconocimiento	
Directo (PAMPs)	Receptores tipo Toll (TLRs)* Receptores tipo NOD (NLRs)* Receptores Lectina tipo C (LCRs)
Indirecto	Receptores para el complemento Receptores Fc de las Igs

* Receptores señalizadores
Abreviaturas: RIA: respuesta inmune adquirida; PAMPs: *pathogen associated molecular patterns*; Ig: Inmunoglobulina

Aunque estas estructuras son químicamente bastante disitintas entre sí, todos los PAMPs presentan unas características comunes: (i) son producidos exclusivamente por microorganismos y nunca por el hospedador, (ii) son estructuras normalmente esenciales para la supervivencia o patogenicidad del microorganismo y (iii) son estructuras invariantes compartidas por clases enteras de patógenos [2].

Estructuralmente, los PRRs pertenecen a varias familias de proteínas, receptores con repeticiones ricas en leucina, receptores lectina tipo C, receptores proteicos *scavenger* (**Tabla 2**). Las principales funciones de los PRRs incluyen opsonización, activación del complemento y cascadas de coagulación, fagocitosis y activación de vías de señalización proinflamatorias. Funcionalmente, los PRRs se pueden dividir en 3 clases: secretados, endocíticos y señalizadores.

- a. Las **moléculas de reconocimiento de patrones secretadas** funcionan como opsoninas mediante la unión a las paredes celulares de los patógenos y los marcan para el reconocimiento por el sistema del complemento y los fagocitos. El receptor mejor caracterizado de esta clase es el MBL (*mannose binding lectin*) que se une a carbohidratos e inicia la vía de las lectinas para la activación del complemento [3].
- b. Los **PRR endocíticos** se localizan en la superficie de los fagocitos. Tras el reconocimiento de los PAMPs, estos receptores median la ingestión de los patógenos al interior de vesículas donde serán destruidos. Además, las proteínas derivadas de patógenos también pueden ser procesadas en péptidos que serán presentados por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Entre los PRRs endocíticos se encuentran el receptor manosa de macrófagos y el receptor *scavenger* de macrófagos.
- c. Los **PRRs señalizadores** reconocen PAMPs y activan vías de transducción de señales que inducen la expresión de una variedad de genes implicados en proporcionar respuesta inmunológica, incluyendo citocinas proinflamatorias. Los receptores tipo Toll (TLRs) son los PRR señalizadores mejor caracterizados y más importantes en la activación de la inmunidad innata.

Así, tras el reconocimiento de los PAMPs (directa o indirectamente), los PRRs inician una serie de programas de señalización que ejecutan la primera línea de defensa de las respuestas inmunológicas del hospedador necesarias para controlar las infecciones. Además, la señalización de los PRRs simultáneamente induce la maduración de DCs, quiénes son responsables de inducir la segunda línea de defensa que es la inmunidad adquirida [4].

1.1. FAGOCITOSIS

Las células han desarrollado una variedad de estrategias para internalizar partículas y solutos, incluyendo pinocitosis, endocitosis mediada por receptor y fagocitosis. La pinocitosis normalmente se refiere a la ingestión de fluidos y solutos y está íntimamente relacionada con la endocitosis mediada por receptor, proceso específico a través del cual las macromoléculas, virus y partículas pequeñas entran en el interior de las células. Ambos procesos comparten un mecanismo basado en moléculas de clatrina, y generalmente ocurren independientemente de la polimerización de actina. En cambio, la fagocitosis, ingestión de partículas grandes ($>0,5 \mu\text{m}$ de diámetro) al interior celular, ocurre por un mecanismo dependiente de actina y generalmente es independiente de clatrina. Las dianas pueden incluir microorganismos, células muertas y restos celulares [5].

Las células fagocíticas profesionales son los monocitos/macrófagos y los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), quienes constituyen una herramienta esencial en la defensa del hospedador frente a infecciones bacterianas y fúngicas, además de participar en la remodelación tisular, en la respuesta inmune e inflamación. Se cree que una disminución de la respuesta, sobre todo neutrofílica, podría ser clave en el aumento de la susceptibilidad frente a infecciones secundarias.

La fagocitosis es un proceso extremadamente complejo. Esta complejidad se debe a la amplia variedad de microorganismos, así como a la diversidad de receptores especializados capaces de estimular la fagocitosis. A pesar de la complejidad asociada a los múltiples mecanismos fagocíticos, los fagocitos profesionales comparten ciertas características: (i) la internalización de las partículas se inicia por la interacción de los receptores específicos en la superficie de los fagocitos con los ligandos presentes en la superficie de las partículas, (ii) tras la internalización, y a través de una serie de eventos de fusión y fisión con componentes de la vía endocítica, se produce la formación y maduración del fagolisosoma y (iii) finalmente se desencadenan una serie de mecanismos degradativos que culminan en la destrucción y eliminación de las partículas internalizadas [6].

Las respuestas funcionales de los fagocitos en la inmunidad innata constan de varios pasos secuenciales:

1. Migración activa de las células hacia las zonas de inflamación.
2. Reconocimiento de los microorganismos e ingestión.
3. Destrucción de las partículas ingeridas.

1.1.1. Migración o quimiotaxis

Si un microorganismo logra atravesar la barrera epitelial y comienza a replicarse en el tejido de un hospedador, en la mayoría de los casos, es inmediatamente reconocido por los macrófagos residentes en los tejidos, quienes reclutan a un gran número de monocitos y neutrófilos desde la sangre al sitio de inflamación [7]. Estos fagocitos profesionales son capaces de eliminar a los patógenos por múltiples mecanismos, lo cual es crucial para la resolución de la infección. Este proceso de reclutamiento leucocitario consta de múltiples pasos (unión débil, rodamiento, activación de integrinas por quimiocinas, adhesión estable) e implica la unión a moléculas de adhesión situadas en las células endoteliales y la migración a través del endotelio [8] (**Figura 1**).

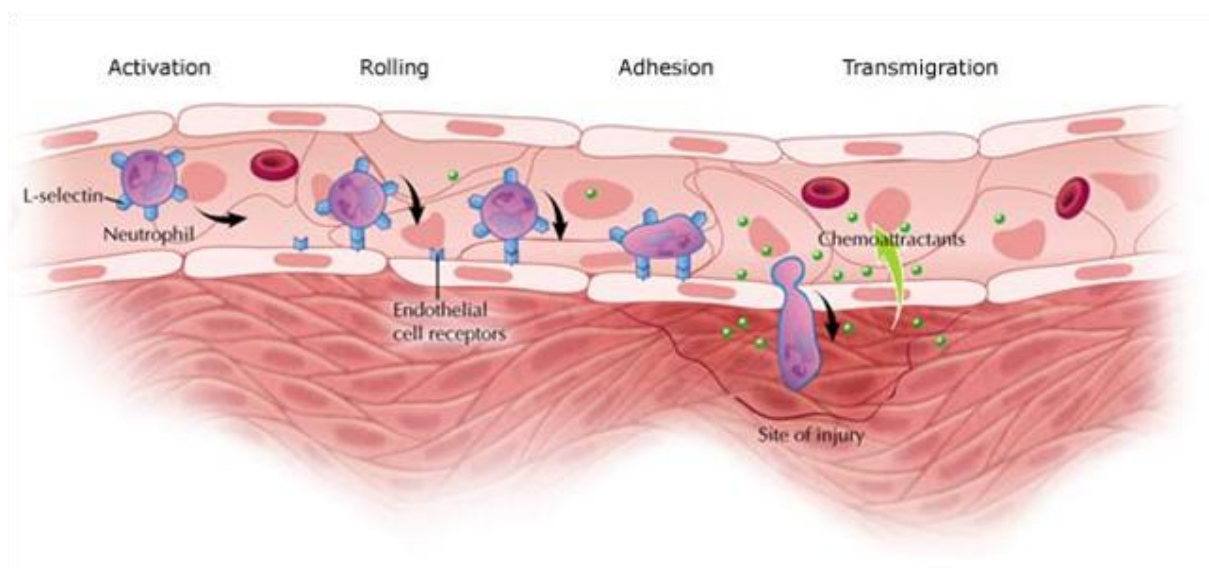


Figura 1. Cascada de reclutamiento de neutrófilos y monocitos. En esta figura se muestran los pasos secuenciales en el reclutamiento de los neutrófilos desde el torrente sanguíneo al tejido. El reclutamiento de los leucocitos se inicia por cambios en la superficie endotelial como resultado de la estimulación de mediadores inflamatorios. El rodamiento es principalmente dependiente de selectinas, mientras que la adhesión y transmigración depende de las interacciones de las integrinas. Las quimiocinas localizadas en la parte luminal del endotelio activan el rodamiento de los neutrófilos, induciendo así cambios conformacionales de las integrinas en la superficie de los neutrófilos y permitiendo los pasos siguientes. Los neutrófilos gatean a través de un gradiente de quimiocinas a lo largo del endotelio, que les indica el sitio preferencial para la trasnmigracion. (<http://www.gluegrant.org/chemotaxis.htm>).

Los macrófagos residentes en los tejidos, tras el reconocimiento del patógeno, liberan mediadores inflamatorios (citocinas proinflamatorias y quimiocinas) que van a actuar sobre las células endoteliales induciendo la expresión de varias moléculas de adhesión, tales como selectinas, ligandos de integrina y quimiocinas [8-10] y reclutando a los neutrófilos y promoviendo la inflamación.

Una vez presentes en la superficie endotelial, las selectinas-P y -E median la unión débil y el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio. El rodamiento de los leucocitos facilita el contacto con quimiocinas, principalmente con la interleucina (IL)-8 [11]. La IL-8 es una citocina de la familia de las quimiocinas CXC (cisteína-X aminoácido-cisteína), sintetizada por varios tipos celulares: fibroblastos, células endoteliales, monocitos y macrófagos y células dendríticas. Se caracteriza por ser uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria actuando como un potente factor quimiotáctico de los neutrófilos [12].

Así, la señal de esta quimiocina, a través de su receptor CXCR2, induce la activación de los neutrófilos y posteriormente su adhesión al endotelio [13]. Los neutrófilos expresan constitutivamente altos niveles de integrinas LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen type 1* o CD11aCD18) y MAC-1 (*macrophage antigen type 1* o CD11bCD18) que, tras la activación, sufren cambios conformacionales y se unen a las moléculas de la superficie endotelial tales como ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule*) e ICAM-2, respectivamente. La unión de las integrinas con sus ligandos activa las vías de señalización en el interior del fagocito estabilizando la adhesión e iniciando la trans migración celular (paracelular o transcelular) hacia los lugares de la infección [8,9].

1.1.2. Reconocimiento e ingestión de los patógenos

Una vez que las células han migrado a los sitios de la infección, es entonces cuando se va a producir el reconocimiento e ingestión del patógeno.

Los macrófagos y neutrófilos reconocen a los patógenos a través de receptores en la superficie celular que permiten discriminar entre las moléculas del patógeno de aquellas del hospedador [5]. Entre los receptores implicados en la fagocitosis se encuentran los siguientes:

- Receptores Fc de las inmunoglobulinas (Ig)
- Receptores del complemento
- Receptores manosa de macrófagos
- Receptores *scavengers*
- Dectina-1

El reconocimiento de los microorganismos por muchos de estos receptores dará lugar a la internalización del patógeno, seguida de su destrucción en el interior del fagocito (**Figura 2**).

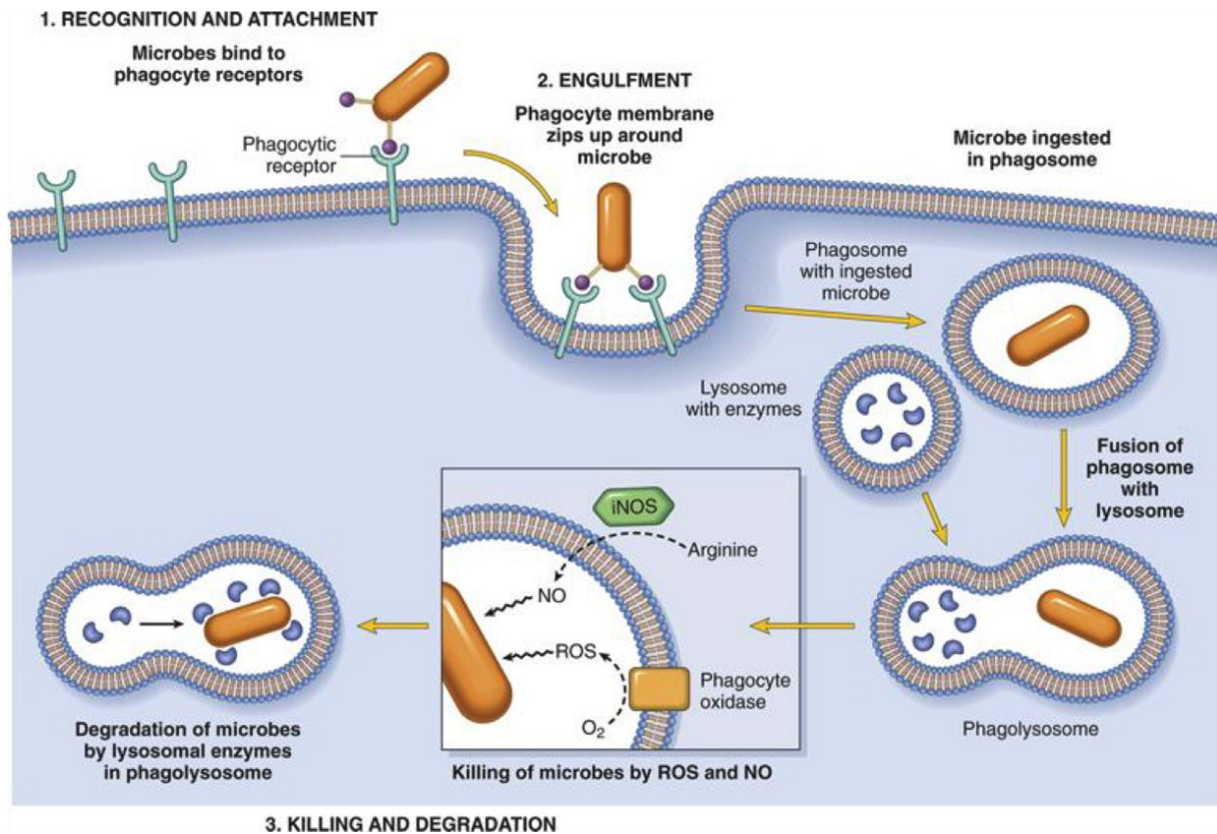


Figura 2. Reconocimiento e ingestión de patógenos. En esta figura se muestran los pasos secuenciales en el reconocimiento e ingestión de patógenos, y su posterior destrucción. Los fagocitos reconocen a los patógenos a través de receptores fagocíticos localizados en la superficie celular. Tras el reconocimiento, los patógenos son internalizados mediante la formación de vesículas endocíticas denominadas fagosomas, los cuales posteriormente se fusionan con lisosomas dando lugar a fagolisosomas y adquiriendo las enzimas necesarias para destruir al patógeno. (<http://classconnection.s3.amazonaws.com/820/flashcards/1273820/png/phagocytosis1332705997571.png>).

La fagocitosis es un proceso activo, en el cual el patógeno es, primeramente, rodeado por la membrana del fagocito y luego internalizado en una vesícula denominada vacuola endocítica o fagosoma. Tras la internalización, los fagosomas se acidifican e inician el proceso de maduración adquiriendo la maquinaria celular necesaria para la destrucción y eliminación de los microorganismos internalizados. La maduración del fagosoma es un proceso dinámico en el que están implicados múltiples eventos de fusión y fisión con componentes de la vía endocítica, dando lugar a la formación de los fagolisosomas. Estas interacciones secuenciales traen consigo importantes cambios en la membrana, y en el contenido fagosomal, incluyendo la adquisición de enzimas microbicidas (proteasas e hidrolasas lisosomales), péptidos (defensinas), ATPasas (adenosín-trifosfatasa) y el complejo NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida) oxidasa, que median la respuesta antimicrobiana intracelular [14].

1.1.3. Destrucción de los patógenos mediante procesos de respiración oxidativa

Tras la fagocitosis, los macrófagos y neutrófilos activados también sintetizan una variedad de moléculas microbicidas, tales como reactivos intermediarios de oxígeno (ROIs) y reactivos intermediarios de nitrógeno (RNIs) que ayudan a destruir a los microorganismos ingeridos. Los más importantes de todos ellos son: el óxido nítrico (NO), el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los cuales son sustancias oxidantes muy reactivas que destruyen a los microorganismos (y a otras células).

El principal sistema generador de radicales libres es el complejo NADPH-oxidasa asociado a la membrana del fagocito en un proceso denominado **respiración oxidativa**. Este complejo NADPH-oxidasa es una enzima con múltiples subunidades que se ensambla principalmente en la membrana fagolisosómica de los fagocitos activados y se induce y activa por numerosos estímulos, como interferón (IFN)- γ y señales procedentes de los TLRs. La función de esta enzima consiste en reducir al oxígeno molecular (O_2) en ROIs, como el O_2^- , de manera que el NADPH actúa como cofactor, oxidándose. A su vez, el O_2^- , por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se convierte en H_2O_2 , que a su vez utiliza a la enzima mieloperoxidasa (MPO) para convertir a los iones haluro en ácidos hipohalosos (principalmente ácido hipocloroso; HOCL), reactivos que son también tóxicos para las bacterias [14,15] (**Figura 3**).

Además de los ROIs, los macrófagos sintetizan RNIs, sobretodo NO, por la acción de una enzima que se denomina óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). La iNOS es una enzima citosólica que cataliza la conversión de arginina en citrulina y libera óxido nítrico que difunde libremente. Dentro de los fagolisosomas, el NO puede combinarse con H_2O_2 o con O_2^- , generados por la NADPH-oxidasa del fagocito, para producir peroxinitritos muy reactivos, que pueden destruir a los microorganismos [15,16] (**Figura 3**).

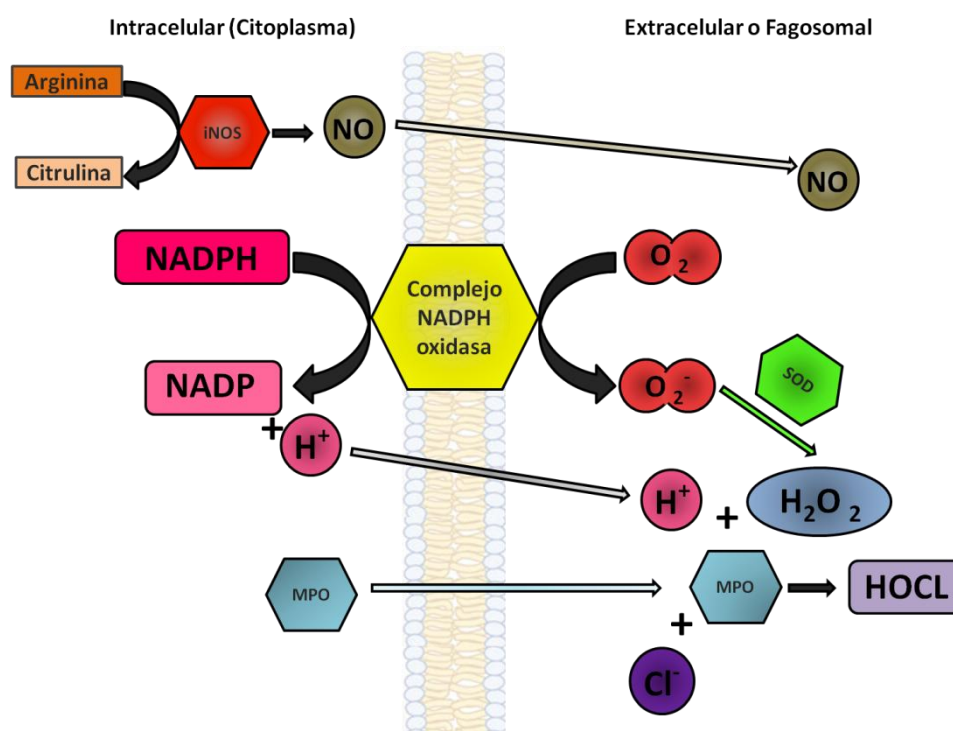


Figure 3. Complejo NADPH oxidasa. El complejo NADPH-oxidasa reduce al O₂ en ROIs, como el O₂⁻, con el NADPH actuando como cofactor. A su vez, el O₂⁻ por la acción de la enzima SOD se convierte en H₂O₂, que a su vez usa la enzima MPO para convertir al Cl⁻ en HOCL. Además de los ROIs, también sintetizan RNIs, sobretudo NO, por la acción de la enzima citosólica iNOS, que cataliza la conversión de arginina en citrulina y libera NO que difunde libremente. Dentro de los fagolisosomas, el NO puede combinarse con H₂O₂ o con O₂⁻, para producir peroxinitritos muy reactivos, que pueden destruir a los microorganismos. **Abreviaturas:** Reactivos intermediarios de oxígeno (ROIs) Oxígeno molecular (O₂), óxido nítrico (NO), anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ion cloruro (Cl⁻), ácido hipocloroso (HOCL), NADPH-oxidasa, mieloperoxidasa (MPO), superóxido dismutasa (SOD), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). (Modificada de Dale et al. Blood 2008).

1.2. TOLL LIKE RECEPTORS

Los TLRs son receptores del sistema inmune innato que reconocen patrones específicos de componentes microbianos y que juegan un papel central en el reconocimiento y en la respuesta inmune frente a patógenos microbianos, incluyendo bacterias, virus, hongos y protozoos.

Los TLRs son los primeros PRR identificados y los mejor caracterizados. Los TLRs están ampliamente distribuidos y se expresan en diferentes tejidos, actuando como defensa inmune local, así como en células inmunes, predominantemente en APCs, tales como monocitos, macrófagos y DCs [17,18] pero también en linfocitos T [19] y linfocitos B [20].

La identificación de estos receptores ha permitido la caracterización de su papel en el inicio de una respuesta inflamatoria durante una infección microbiana. Más importante aún es que las vías de la inmunidad innata, incluyendo TLRs, son consideradas reguladores clave de la respuesta inmune adquirida mediada por linfocitos T y B frente a patógenos [20].

1.2.1. Estructura

En cuanto a su estructura, los TLRs son una familia de proteínas transmembrana tipo I que se caracterizan por presentar un ectodominio que contiene repeticiones ricas en leucina (LRR; *Leucine rich repeat domain*) responsable del reconocimiento de los PAMPs [21], un dominio transmembrana y un dominio citosólico denominado TIR (*Toll-interleukin 1 receptor*), homólogo a la región intracitoplasmática del receptor de la IL-1, requerido para la transducción de señales [22,23].

Hasta la fecha se han identificado de 10 a 12 TLRs funcionales en humanos y en ratones, respectivamente, estando conservados del TLR1 al TLR9 en ambas especies [24]. El TLR10 es probablemente funcional en humanos; sin embargo, el gen *TLR10 murino* presenta un codón de parada, lo que indica que no es funcional. Igualmente, el TLR11 humano es no funcional debido a la presencia de un codón de parada en el gen. El TLR10 humano y el TLR12 y TLR13 de ratón no están bien caracterizados y sus funciones aún son desconocidas [23].

1.2.2. Localización

El reconocimiento de PAMPs por los TLRs ocurre en varios compartimentos celulares. Una localización celular apropiada es muy importante para la accesibilidad al ligando, el mantenimiento de la tolerancia frente a moléculas propias, tales como ácidos nucleicos, y la transducción de señales.

Los TLRs se dividen en dos subgrupos dependiendo de su localización celular y sus respectivos ligandos. Uno de los grupos está compuesto por el TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, los cuales se expresan en la superficie celular y reconocen principalmente a componentes de la membrana de los microorganismos tales como lípidos, lipoproteínas y proteínas. El otro grupo está compuesto por el TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, los cuales se expresan exclusivamente en vesículas intracelulares tales como el retículo endoplásmico (RE), endosomas, lisosomas y endolisosomas, donde reconocen ácidos nucleicos liberados tras la ingestión de virus y otros patógenos o células infectadas, evitando así, posiblemente, el reconocimiento de los ácidos nucleicos del hospedador [4,25].

Recientemente se ha visto que el TLR11 de ratón, relacionado en la superficie celular con el TLR5, también se localiza en los compartimentos intracelulares [26]. El TLR13 de ratón también se expresa en los compartimentos intracelulares aunque su respectivo PAMP aún no se ha identificado [25].

Los TLRs intracelulares están localizados exclusivamente en el RE de células sin estimular y rápidamente son translocados a los endolisosomas, a través del aparato de Golgi, tras la estimulación con sus respectivos ligandos [25]. La liberación del TLR3, TLR7 y TLR9 desde el RE al endolisosoma, lo

cual es un requisito para la inducción de la respuesta, está regulada por la proteína UCN93B1 localizada en el RE (proteína integral que atraviesa la membrana 12 veces), la cual interacciona específicamente con la región transmembrana de TLR3, TLR7 y TLR9 [27]. Una vez dentro de los endolisosomas, la región N-terminal de los TLRs es procesada por múltiples proteasas lisosomales para generar un receptor funcional. Asimismo, se requiere de la acidificación del compartimento endolisosomal para que los TLRs intracelulares se activen tras el reconocimiento del ligando e inicien la transducción de señales [25]. Todos estos requisitos son importantes para prevenir la activación del receptor por ácidos nucleicos propios del hospedador, lo que podría conducir a autoinmunidad.

1.2.3. Reconocimiento de PAMPs por TLRs

Diversos estudios realizados en ratones deficientes en TLRs específicos han demostrado que cada TLR tiene una función diferente, en términos de reconocimiento de PAMPs y de respuesta inmune. Los distintos PAMPs reconocidos por los TLRs incluyen lípidos, lipoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos derivados de un amplio rango de microorganismos tales como bacterias, virus, micobacterias, parásitos y hongos [23,28] (**Tabla 3**).

Tabla 3. Detección de PAMPs a través de TLRs

Especies	PAMPs	TLRs
Bacteria, Micobacteria	LPS	TLR4
	Lipoproteínas, LTA, PGN, Lipodarabinomananos	TLR2/1, TLR2/6
	Flagelina	TLR5
	ADN	TLR9
	ARN	TLR7
Virus	ADN	TLR9
	ARN	TLR3, TLR7, TLR8
	Proteína estructural	TLR2, TLR4
Hongos	Zimosan, β - glucano	TLR2, TLR6
	Manano	TLR2, TLR4
	ADN	TLR9
	ARN	TLR7
Parásitos	tGPI- mutin (Trypanosoma)	TLR2
	Glicoinositolfosfolípido (Trypanosoma)	TLR4
	ADN	TLR9
	Hemozoína (Plasmodium)	TLR9
	Molécula tipo profilina (Toxoplasma gondii)	TLR11

Abreviaturas: LPS, lipopolisacárido; LTA, ácido lipoteicoico; PGN, peptidoglicano; ADN, ácido desoxirribonucleico; ARN, ácido ribonucleico; tGPI, Glicosilfosfatidilinositol PAMPs, patrones moleculares asociados a patógenos; TLRs, receptores tipo Toll.

1.2.3.1. Detección de PAMPs bacterianos por TLRs

Las bacterias contienen varios PAMPs que son detectados por los TLRs. Los componentes de la pared celular bacteriana son ampliamente reconocidos por TLRs de la superficie celular mientras que los ácidos nucleicos son reconocidos por TLRs intracelulares.

El lipopolisacárido (LPS) bacteriano es el ligando de TLRs mejor estudiado. El LPS, principal componente de la pared celular de las bacterias Gram-negativas, es un compuesto glicolípido reconocido por el **TLR4** [28]. Sin embargo, el reconocimiento del LPS requiere de la presencia de la proteína MD2 que, junto con el TLR4, forma el complejo funcional en la superficie celular. Otras proteínas adicionales, como el LBP (*LPS-binding protein*) y el CD14, también están implicadas en la unión a LPS. Así, el LPS se une a la proteína sérica LBP formando un complejo que es reconocido por el correceptor CD14, que está anclado en la membrana y que, a su vez, es capaz de interactuar con el complejo TLR4-MD2 permitiendo la detección del LPS [23].

El **TLR2** reconoce una amplia variedad de PAMPs de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, detectando lipoproteínas y peptidoglicanos (PGN), así como ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias Gram-positivas. Además, el TLR2 es capaz de detectar lipoarabinomananos de micobacterias [28,29]. El TLR2 es capaz de reconocer esta gran variedad de ligandos debido, posiblemente, a su capacidad de formar heterodímeros con el TLR1 y el TLR6, y otras moléculas de la superficie celular como Dectina-1 y CD36, lo cual le permite discriminar entre diferentes componentes microbianos. Así, el heterodímero **TLR2-TLR1** reconoce lipopéptidos triacilados de bacterias Gram-negativas mientras que el heterodímero **TLR2-TLR6** reconoce lipopéptidos diacilados de bacterias Gram-positivas [28].

La flagelina, un componente proteico de las bacterias flageladas, es reconocida por el **TLR5**. Este receptor reconoce una estructura central muy conservada que es esencial para el ensamblaje del protofilamento y la motilidad bacteriana [28]. El TLR5 juega un papel muy importante en la resistencia a infecciones por *Salmonella* [30].

El **TLR11** se expresa ampliamente en riñón y vejiga y está implicado en el reconocimiento de componentes bacterianos uropatogénicos, aunque su respectivo PAMP aún no ha sido identificado [4].

En cuanto al ADN genómico de las bacterias, éste es reconocido por el **TLR9**. El TLR9 reconoce motivos de ADN 2'desoxicitidina fosfato guanosa (CpG) no metilados que se encuentran frecuentemente en bacterias y virus pero raramente en mamíferos [28]. Los oligodesoxinucleótidos (CpG) sintéticos funcionan con ligandos del TLR9 activando directamente a DCs, macrófagos, y células B e induciendo una potente respuesta Th1 [31]. El ARN bacteriano también tiene propiedades

inmunoestimuladoras. Se ha descrito que el **TLR7** reconoce ARN del grupo B de *Streptococci* dentro del compartimento lisosomal de DCs convencionales [28,32].

El reconocimiento de los PAMPs bacterianos por TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 principalmente induce la producción de citocinas proinflamatorias, mientras que el TLR7 y TLR9 inducen IFN tipo I.

1.2.3.2. Detección de PAMPs virales por TLRs

Los ácidos nucleicos virales también actúan como PAMPs y son reconocidos por múltiples TLRs. El TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 están implicados en el reconocimiento de nucleótidos virales tales como ARN de cadena doble (ARNds) (TLR3), ARN de cadena sencilla (ARNss) (TLR7-TLR8) y ADN (TLR9) [25]. La principal característica de los TLRs que detectan ácidos nucleicos virales es promover una potente producción de IFN tipo I, necesario para una respuesta inmune innata antiviral, además de otras citocinas proinflamatorias que también son inducidas por todos TLRs [4].

El **TLR3** originalmente se identificó por reconocer un análogo sintético de ARNds como es el ácido poliinosínico-policitidílico (poly I:C) que mimetiza una infección viral. Además, el TLR3 reconoce específicamente ARN genómico de virus de ARNds (reovirus) y ARNds producido durante la replicación de virus de ARNss, tales como el virus sincitial respiratorio (VSR), el virus de la encefalomiocarditis (VEMC), el virus “*West Nile*” e incluso virus de ADNds como el virus herpes simplex 1 (VHS-1) o el citomegalovirus murino (CMVM) [25,28].

El **TLR7** y el **TLR8** humano (pero no el de ratón) median el reconocimiento de ARNss derivado de virus de ARNss, como son el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la gripe o influenza A o el virus de la estomatitis vesicular (VSV) [25,28,33]. Además, el TLR7 reconoce componentes imidazoquinolinas antivirales sintéticos, como son resiquimod (R848) e imiquimod y análogos de guanina como loxorribina, relacionados estructuralmente con el nucleósido guanosina [34]. En particular, el TLR7 reconoce ARNss rico en uridina y guanosina así como ARN de poliuridina sintéticos que actúan como potentes ligandos. Además, el TLR7 puede detectar complejos ribonucleoproteicos del hospedador, a veces con consecuencias patológicas [25].

El **TLR9** reconoce ADN de virus que contienen secuencias ricas en motivos ADN-CpG. El TLR9 está implicado en el reconocimiento del VHS-1 y VHS-2 y del CMVM [25,28,33].

Aunque el TLR3, TLR7 y TLR9 pueden compartir el mismo compartimento intracelular, no se excluye que algunos compartimentos contengan grupos restringidos de TLRs o incluso un único tipo de TLR [25].

Además de los TLRs intracelulares, se ha visto que TLRs de la superficie celular, tales como **TLR2** y **TLR4**, también reconocen productos virales. Así, el **TLR4** reconoce proteínas de la envoltura del VSR y del virus tumor mamario murino (VTMM) e induce la producción de citocinas proinflamatorias. Por su parte, el **TLR2** detecta componentes virales, como la proteína hemaglutinina del sarampión, el CMV humano y el VHS-1 induciendo citocinas proinflamatorias [28], así como IFN tipo I específicamente según el tipo celular [35].

1.2.3.3. Detección de PAMPs fúngicos por TLRs

Varios hongos, como *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* son detectados por varios TLRs induciendo una respuesta inflamatoria. Sin embargo, este reconocimiento requiere de receptores adicionales como dectinas, CD14 y receptores de manosa [36].

Los hongos contiene múltiples PAMPs como son el β -glucano, mananos, proteínas y ácidos nucleicos los cuales son reconocidos por al menos cinco TLRs (TLR2, TLR4, TLR6, TLR7 y TLR9) [4].

Los β -glucanos, principales componentes de la mayoría de las paredes celulares fúngicas (p.ej *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*), son reconocidos por el **TLR2** en asociación con dectina-1. Además, el heterodímero **TLR2-TLR6** reconoce zimosán (ligando fúngico), una partícula compleja formada por glucanos, mananos y proteínas, procedente de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*. El **TLR4**, también es capaz de reconocer mananos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* induciendo la producción de citocinas proinflamatorias [37,38].

Asimismo, los TLRs intracelulares, como el **TLR7** y **TLR9**, participan en el reconocimiento de ácidos nucleicos fúngicos que son liberados dentro de vesículas durante la digestión por los fagocitos. El ADN fúngico, a través de TLR9, induce la producción de citocinas proinflamatorias en DCs. En el caso del ARN fúngico, es el TLR7 quien lo detecta produciendo IFN tipo I.

1.2.3.4. Detección de protozoos y parásitos por TLRs

Las infecciones por protozoos causan enfermedades tales como toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*), malaria (*Plasmodium species*), leishmaniasis (*Leishmania species*) y enfermedad del sueño (*Trypanosoma brucei*) [36].

Componentes como glicosilfosfatidilinositol y glicoinositolfosfolípido de *Trypanosoma species*, *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii* son reconocidos por el **TLR2** y **TLR4** [39]. Otras moléculas tipo profilina de *T.gondii* son detectadas por el **TLR11 murino**. El ADN genómico y la hemozoína, cristales de hematina, derivados de *P. falciparum* son reconocidos por el **TLR9** e inducen la producción de citocinas inflamatorias e IFN tipo I en DCs [4].

En resumen, un mismo microorganismo puede ser reconocido por varios TLRs. Además se han descrito efectos sinérgicos por coactivación de varios TLRs simultáneamente. Estudiando una amplia variedad de agonistas de TLRs, se ha observado que estos efectos sinérgicos ocurren principalmente cuando la coestimulación implica a TLRs que señalizan a través de diferentes vías de transducción de señales [40].

1.2.4. Vías de Señalización de los TLRs

Los TLRs proporcionan respuestas inmunológicas específicas para cada microorganismo mediante la activación de mecanismos de transducción de señales que provocan, en último término, la inducción de genes que codifican para citocinas inflamatorias, moléculas coestimuladoras, IFN tipo I, quimiocinas y péptidos antimicrobianos. Así, tras el reconocimiento de los respectivos PAMPs, los TLRs reclutan selectivamente diferentes moléculas adaptadoras intracelulares que contienen el dominio TIR, tales como MyD88 (*myeloid-differentiation primary-response protein-s88*), TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing-IFN- β), TIRAP (*TIR-domain-containing adapter protein*) y TRAM (*TRIF-related adapter molecule*) que interaccionan con el dominio TIR de los receptores tipo Toll e inician las cascadas de señalización para ejecutar la primera línea de defensa del hospedador frente a las infecciones [23,41] (**Figuras 4 y 5**).

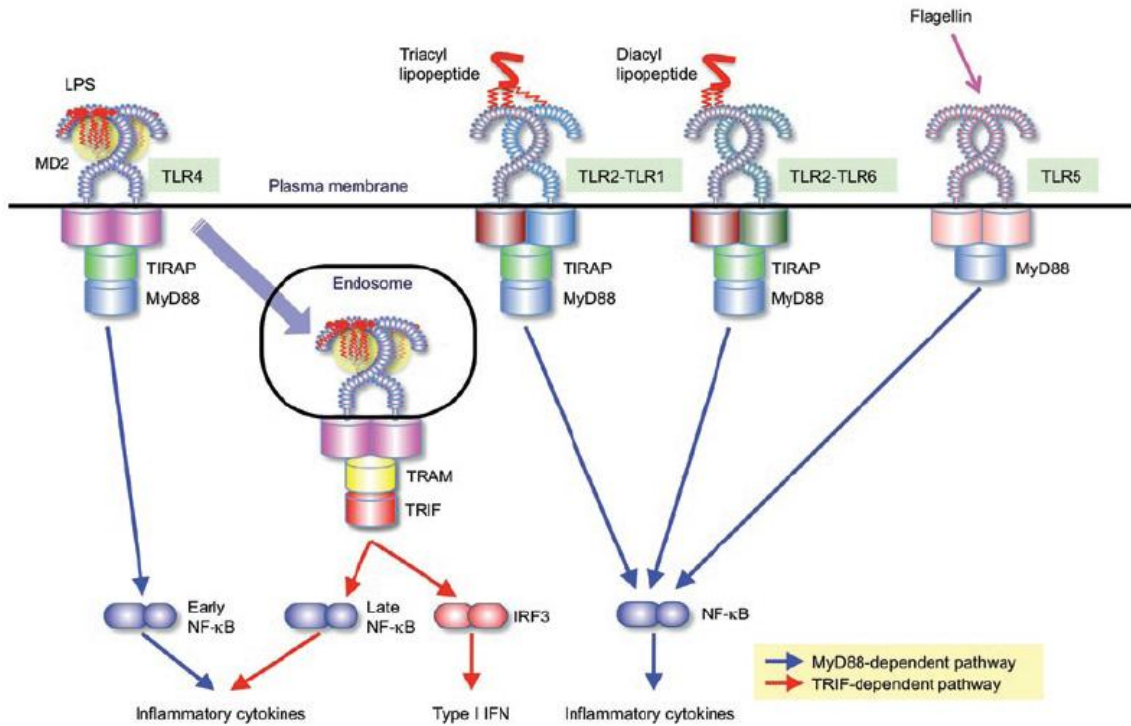


Figura 4. Reconocimiento de PAMPs por TLRs de la superficie celular.

El TLR4 en complejo con MD2 se une a LPS e inicialmente transmiten señales para la activación temprana de NF-κB mediante el reclutamiento de TIRAP y MyD88 (vía dependiente de MyD88). El complejo TLR4-MD2-LPS es entonces internalizado y retenido en el endosoma, donde se desencadena la transducción de señales mediante el reclutamiento de TRAM y TRIF, que dan lugar a la activación de IRF3 y, en fase tardía, de NF-κB para la inducción de IFN tipo I (vía dependiente de TRIF). Ambas fases de activación (temprana y tardía) se requieren para la inducción de citocinas inflamatorias. Los heterodímeros TLR2-TLR1 y TLR2-TLR6 reconocen lipopeptidos triacilados y diacilados, respectivamente. El TLR2-TLR1 y el TLR2-TLR6 inducen la activación de NF-κB a través del reclutamiento de TIRAP y MyD88. El TLR5 reconoce flagelina y activa a NF-κB a través de MyD88. (Kawai et al. Nat Immunol. 2010).

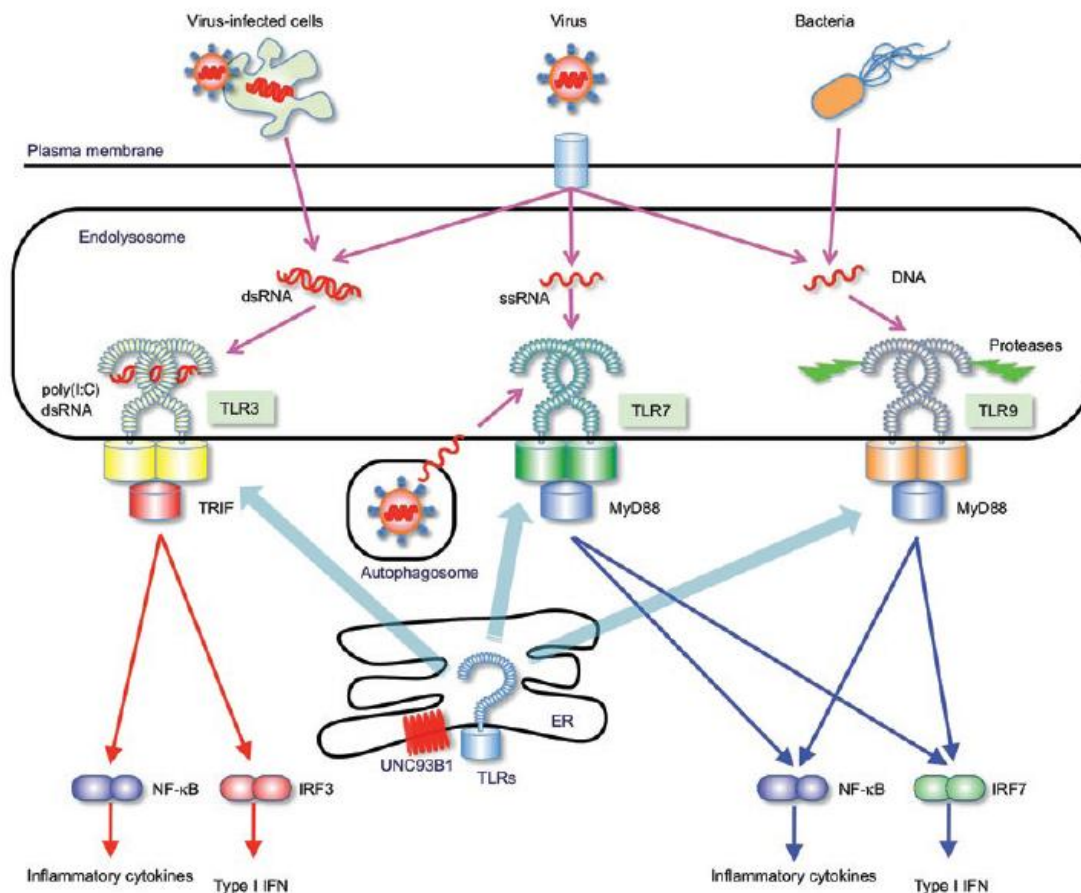


Figura 5. Reconocimiento de PAMPs por TLRs intracelulares.

El TLR3 reconoce ARNs derivados de virus o células infectadas por virus. El TLR3 activa la vía dependiente de TRIF e induce IFN tipo I y citocinas inflamatorias. En pDCs, el TLR7 reconoce ARNs derivados de virus de ARNs en los endolisosomas y activa a NF- κ B y a IRF7 vía MyD88 para inducir la producción de citocinas inflamatorias e IFN tipo I, respectivamente. Además, la autofagia está implicada en la liberación de ARNs en vesículas que expresan TLR7. El TLR9 reconoce ADN derivado de ADN vírico y bacteriano. El procesamiento proteolítico de TLR9 por proteasas celulares se requiere para la posterior transducción de señales. En pDC, el TLR9 recluta a MyD88 para activar a NF- κ B e IRF7. El TLR3, TLR7 y TLR9 se localizan principalmente en el RE en estado de reposo y se translocan a los endolisosomas, donde se unen con sus ligandos. UNC93B1 interactúa con estos TLRs en el RE y es esencial para su translocación. (Kawai et al. Nat Immunol. 2010).

En cuanto a las vías de señalización de los TLRs, la primera molécula adaptadora que se describió fue MyD88, la cual es común a todos los TLRs, excepto al TLR3, y activa al factor de transcripción NF- κ B (*Nuclear factor kappa B*) y a MAPKs (*Mitogen-activated protein kinases*) para la inducción de citocinas inflamatorias [28]. En cambio, la molécula adaptadora TRIF, reclutada por el TLR3 y el TLR4, induce una vía alternativa que da lugar a la activación de los factores de transcripción IRF3 (*Interferon regulatory factor*) y NF- κ B y a la posterior inducción de IFN tipo I y citocinas inflamatorias [28].

Así, las vías de señalización de los TLRs pueden clasificarse en dos: (i) **una vía de transducción de señales dependiente de MyD88**, común a todos los TLRs, excepto TLR3, y esencial para la inducción de citocinas inflamatorias, y (ii) una vía independiente de MyD88 o **vía dependiente de**

TRIF, específica para TLR3 y TLR4, y responsable de la inducción de IFN tipo I y citocinas inflamatorias. En cuanto a otras moléculas adaptadoras, TIRAP participa en la vía dependiente de MyD88, mientras que TRAM participa en la vía dependiente de TRIF. El TLR4 es el único TLR que recluta las 4 moléculas adaptadoras e induce ambas vías de señalización, activándose primero la vía dependiente de MyD88 [23,36].

El TLR4 inicialmente recluta a TIRAP en la membrana plasmática, lo cual facilita el reclutamiento de MyD88 para iniciar la fase temprana de la activación de NFκB y MAPK. Posteriormente, el TLR4 es conducido al endosoma donde forma un complejo de señalización con TRAM y TRIF. Este complejo inicia la vía dependiente de TRIF requerida para la activación de IRF3 dando lugar a la activación IFN tipo I y en fase tardía a la activación de NFκB y MAPK para la inducción de citocinas inflamatorias [42].

En general, cada TLR recluta una combinación específica de moléculas adaptadoras para activar diferentes factores de transcripción, consiguiendo así una respuesta inmunológica adecuada y efectiva frente a los distintos patógenos [43]. Estas respuestas inmunológicas causan el reclutamiento de los neutrófilos, la activación de los macrófagos y la inducción de genes estimulados por IFN, dando lugar a la destrucción directa de los patógenos. Además, la activación de la señalización de los TLRs simultáneamente conduce a la maduración de las DCs, contribuyendo a la inducción de la inmunidad adquirida [4].

1.2.4.1. Vía dependiente de MyD88

La molécula MyD88 contiene en su extremo N-terminal un dominio denominado *Death domain* (DD) y en su extremo C-terminal presenta una secuencia, similar a las regiones intracelulares del receptor tipo Toll y del receptor de la IL-1, denominado dominio TIR. A través de estos dos dominios (TIR y DD), MyD88 actúa como una molécula adaptadora entre los miembros de la familia TLR/IL-1R y otras proteínas implicadas en la transducción de señales.

En los macrófagos y en las DCs convencionales, una vez el ligando interacciona con su TLR correspondiente, el dominio TIR de MyD88 se une con el dominio TIR del TLR y se inicia la vía dependiente de MyD88. MyD88 recluta e interacciona con miembros de la familia IRAK (*IL-1 receptor-associated Kinase*), tales como IRAK4, IRAK1, IRAK2 e IRAK-M (**Figura 6**).

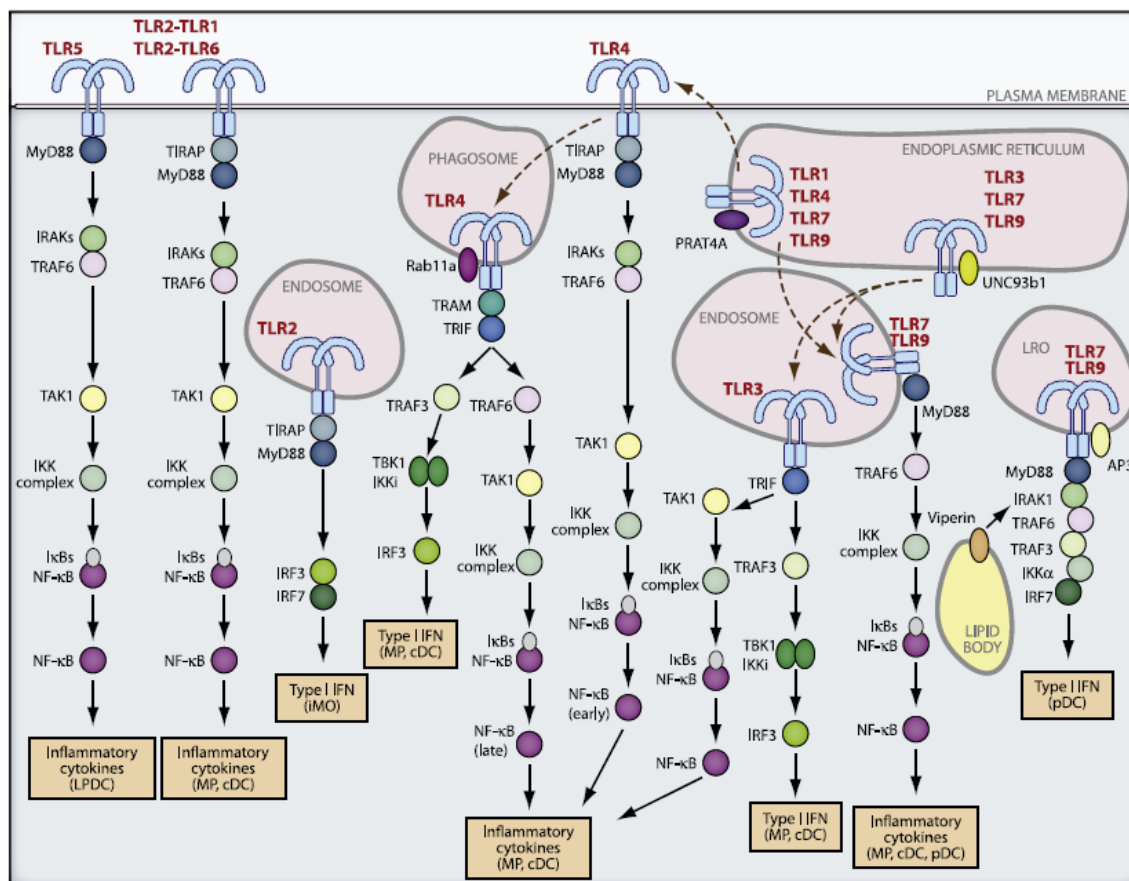


Figura 6. Vías de señalización de TLRs. Los TLRs inician distintas vías de señalización en varios tipos celulares. El reconocimiento de PAMPs induce cambios conformacionales en los TLRs que permiten el reclutamiento de moléculas adaptadoras tales como MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM. MyD88 activa a NFκB a través de IRAKs, TRAF6, TAK1 y el complejo IKK dando lugar a la inducción de citocinas inflamatorias. En macrófagos y en DCs los heterodímeros TLR1-TLR2 y TLR2-TLR6 inducen la activación de NFκB a través del reclutamiento de TIRAP Y MyD88. En monocitos inflamatorios, el TLR2 se encuentra expresado en el interior del endosoma e induce IFN tipo I via IRF3 e IRF7 en respuesta a virus. El TLR4, que se expresa en la superficie celular, inicialmente transmite señales para la activación temprana de NFκB mediante el reclutamiento de TIRAP y MyD88. Posteriormente, el TLR4 es transportado a fagosomas donde recluta a TRAM y TRIF y activa al eje TRAF3-TBK1-IRF3 para la inducción de IFN tipo I, así como a la activación tardía de NFκB. El TLR3 activa la vía dependiente de TRIF para inducir IFN tipo I y citocinas inflamatorias en macrófagos y cDCs. En pDCs, TLR7 y TLR9 activan NFκB e IRF7 vía MyD88 para inducir citocinas inflamatorias e IFN tipo I, respectivamente. La activación de NFκB durante la señalización de TLR7 y TLR9 se inicia a partir del endosoma mientras que la activación de IRF7 se inicia a partir de orgánulos relacionados con los lisosomas. En pDCs la activación de IRF7 dependiente de MyD88 está mediada por la activación de IRAK1, TRAF6, TRAF3 e IKKa. En cDCs y macrófagos, el TLR7 y el TLR9 inducen respuestas inflamatorias mediante la activación de NFκB vía MyD88 pero fallan en activar a IRF7.

Abreviaturas: macrófagos (MP), células dendríticas convencionales (cDC), células dendríticas plasmacitoides (pDC), DC de la lámina propia (LPDC), monocitos inflamatorios (iMO) y. orgánulos relacionados con los lisosomas (LRO). (Kawai et al. Immunity.2011).

En primer lugar, IRAK 4 es activada y se considera esencial para la activación de la vía de transducción de señales dependiente de MyD88. IRAK1 e IRAK2 se activan secuencialmente, y la activación de ambas quinasas se requiere para una activación más robusta de NFκB y MAPK. Una vez

fosforiladas, las proteínas IRAK se disocian de MyD88, formando un complejo de señalización activo e interaccionan con TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*). TRAF6 forma entonces un complejo con las enzimas Ubc13 y Uev1A, produciendo la activación de TAK1 (*Transforming growth factor- β -activated kinase 1*). TAK1, en combinación con los componentes reguladores TAB1, TAB2 y TAB3 (*TAK1 binding proteins*), activa dos cascadas de señalización distintas, que implican al complejo IKK (*IkappaB Kinases*) y a la familia MAPK respectivamente.

Por un lado, TAK1 forma un complejo con IKK fosforilando a IKK β . Este complejo IKK cataliza la fosforilación de las proteínas I κ B, lo que provoca su degradación y la subsiguiente translocación al núcleo del factor NF κ B, que controla la expresión de varios genes de citocinas proinflamatorias. Simultáneamente TAK1 activa a miembros de la familia MAPK (Erk1, Erk2, p38 y JnK) que fosforilan y activan a varios factores de transcripción, incluyendo al factor transcripcional AP-1 (*Activator protein 1*) que regula la expresión de genes implicados en apoptosis y en la producción de citocinas inflamatorias [43,44]. Así, la activación de la vía dependiente de MyD88 da lugar a la inducción de muchos genes, algunos de los cuales poseen un papel crítico en la modulación de la transcripción dependiente de NF κ B [23].

Otra molécula que posee un dominio TIR es la molécula TIRAP. Esta molécula adaptadora es esencial en la vía de transducción de señales dependiente de MyD88 mediada únicamente por los receptores TLR2 y TLR4.

Únicamente en las DCs plasmacitoides (pDC) existe otra vía de señalización a través de TLR7 y TLR9 que da lugar a la producción de IFN tipo I. En las pDCs, MyD88 se requiere para la producción tanto de citocinas proinflamatorias como de IFN tipo I. Actualmente se desconoce si ambas vías de señalización ocurren simultáneamente o secuencialmente [25]. En las pDCs estimuladas con ligandos específicos para el TLR7 y TLR9, IRF7, que se expresa constitutivamente, se une a MyD88, que a su vez recluta varias proteínas de señalización tales como IRAK4, TRAF6, TRAF3, IRAK1 e IKK α , formando un complejo que fosforila a IRF7 para iniciar la transcripción de IFN tipo I [4].

1.2.4.2. Vía dependiente de TRIF

Se ha descrito que los macrófagos deficientes en MyD88 no presentan activación de NF κ B en respuesta a ligandos específicos del TLR2, TLR7 y TLR9, pero que la estimulación con LPS, ligando del TLR4, produce la activación de NF κ B, aunque dicha activación se encuentra retardada al compararse con macrófagos sin estimular, lo que sugiere la existencia de una vía de activación independiente de

MyD88 [45]. Posteriormente, se ha demostrado que la molécula TRIF, una molécula con dominio TIR, es el adaptador implicado en esta vía [46].

La vía dependiente de TRIF, mediada únicamente por los receptores TLR3 y TLR4, culmina en la activación de IRF3 y NFκB (**Figura 6**). Por un lado, TRIF recluta a TRAF6, quién a su vez activa a TAK1 para la activación de NFκB, probablemente a través de mecanismos similares a los descritos en la vía dependiente de MyD88 [47].

Por otro lado, TRIF, a través de TRAF3, recluta al complejo TBK1-IKKi el cual cataliza la fosforilación de IRF3 e induce su translocación al núcleo. Así, además de la activación de NFκB, TRIF da lugar a la activación de IRF3 induciendo la transcripción de IFN tipo I, que a su vez activa a distintos genes implicados en la respuesta a virus [23,43].

Una cuarta molécula adaptadora con dominio TIR es la molécula TRAM que participa específicamente en la vía de transducción de señales independiente de MyD88 a través de TLR4 [44].

1.2.4.3. Reguladores negativos de las vías de señalización de los TLRs

La regulación de la respuesta inmune mediada por los TLRs es esencial para controlar la inflamación. Actualmente se han identificado varias moléculas que actúan como reguladores negativos, a diferentes niveles, para suprimir estas vías de señalización por TLRs. Estas incluyen variantes de *splicing* de moléculas adaptadoras o proteínas relacionadas, ubiquitin ligasas, desubiquitinases, reguladores transcripcionales y microARNs. Así, algunas de estas moléculas actúan disminuyendo la expresión de TLRs, mientras que otras regulan la señalización a través del secuestro o degradación de moléculas que participan en las vías o bien inhibiendo a factores de transcripción [23].

1.2.5. TLRs y ligandos endógenos

Cada vez existen más evidencias de que además de responder a PAMPs, los TLRs también pueden responder a moléculas endógenas y desencadenar respuestas inflamatorias. La mayoría de estas moléculas endógenas se producen como resultado de la muerte celular o daño tisular y actúan estimulando a los TLRs dando lugar al desarrollo o aceleración de enfermedades inflamatorias o autoinmunes. La identificación de estos DAMPs (patrones moleculares asociados a daño) sugiere que los TLRs responden a moléculas endógenas y median la respuesta inflamatoria en situaciones infecciosas [23].

Los TLRs también participan en la respuesta inflamatoria en ciertas condiciones patológicas, en enfermedades inflamatorias no infecciosas, tales como aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, donde lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas y amiloide β , respectivamente desencadenan una inflamación “estéril” y son reconocidas por TLR4 y TLR6 [48].

La infección también es un desencadenante de la liberación de moléculas endógenas que son reconocidas por los TLRs. El péptido antimicrobiano β 2 defensina, que directamente neutraliza a los microorganismos invasores y se produce en respuesta a la infección, activa DCs inmaduras vía TLR4 para inducir la sobrerregulación de moléculas coestimuladoras que den lugar a la inducción de una respuesta inmune adquirida efectiva. La catelicidina, otro péptido antimicrobiano producido por neutrófilos y queratinocitos, entre otros, forma agregados con ARN y ADN propios liberados por células necróticas, y estos agregados son endocitados y retenidos en endosomas tempranos de pDCs, donde activan a TLR7 y TLR9, respectivamente [23].

2. INMUNOSENESCENCIA

El envejecimiento del sistema inmune engloba una serie de cambios cualitativos y cuantitativos que se encuentran típicamente en el sistema inmune de las personas de edad avanzada y que se agrupan bajo el término de INMUNOSENESCENCIA [49]. Estos cambios abarcan alteraciones primarias, las cuales son una consecuencia directa del envejecimiento, y alteraciones secundarias, las cuales representan una reacción o respuesta a estos primeros cambios, y que por sí mismas, pueden también verse afectadas por el proceso de envejecimiento. Estas alteraciones se manifiestan a nivel molecular y celular y pueden afectar tanto a componentes de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida, dando lugar a un descenso de la función inmune que se acompaña de una pérdida en la capacidad del reconocimiento de antígenos propios y extraños [50].

Existen múltiples datos en la literatura sobre las alteraciones que ocurren en la inmunidad adquirida [51-62] (**Tabla 4**), sin embargo cada vez hay más evidencias de cómo el proceso de envejecimiento afecta a la inmunidad innata.

Tabla 4. Principales alteraciones del envejecimiento inmunológico sobre la inmunidad adquirida.

Características de la inmunosenescencia en la inmunidad adquirida
Involución del timo con alteración en las subpoblación de células T
Disminución en la producción de células T naïve (CD45RA ⁺ CD45RO ⁻)
Proliferación compensatoria de células T memoria y efectoras (CD45RA ⁻ CD45RO ⁺)
Descenso en el ratio células T naïve/memoria
Expansión oligoclonal de células T CD8 ⁺ (p.ej. causada por infecciones crónicas virales)
Cambios en la distribución de células T CD4 y T CD8
Reducción en la diversidad del receptor de célula T (TCR)
Pérdida de la señal co-estimuladora de CD28. Acumulación de células T CD8 ⁺ CD28 ⁻ y en menor medida de células T CD4 ⁺ CD28 ⁻
Aumento de la actividad telomerasa en células T CD28 ⁻
Descenso de la producción de IL-2, de la expresión del receptor de la IL-2 y de la respuesta a IL-2
Aumento en la producción de IL-5 e IL-10. Cambio en el perfil de citocinas de Th1 a Th2
Disminución de la función de las células B
Aumento en la producción de autoanticuerpos
Apoptosis alterada

Las alteraciones en la inmunidad innata se asocian con cambios en el número de las células de la inmunidad innata, así como con un descenso de las principales funciones de estas células, cambios en la expresión de una variedad de receptores y una alteración de las vías de transducción de señales da lugar a una disminución de la capacidad para responder a patógenos bacterianos y virales [63].

En los neutrófilos, aunque con datos contradictorios, la mayoría de los estudios han demostrado que el envejecimiento no afecta al número. Sin embargo, varios estudios sugieren que las funciones de los neutrófilos, tales como quimiotaxis, fagocitosis y destrucción intracelular de patógenos están disminuidas en individuos de edad avanzada [63]. Además, las funciones de los neutrófilos están mediadas por receptores que se ha visto que también pueden verse alterados por el proceso de envejecimiento dando lugar a cambios en las vías de señalización y en consecuencia a las alteraciones funcionales de los neutrófilos. Estas alteraciones de las vías no se deben a cambios en el número de receptores sino a cambios en la composición de la membrana plasmática así como en el tráfico de las moléculas señalizadoras. La activación de los TLRs de neutrófilos aumenta la fagocitosis y la liberación de péptidos antimicrobianos [64]. Se ha postulado que alteraciones en la señalización de los PRRs puedan dar lugar a alteraciones en las funciones de los neutrófilos, favoreciendo un aumento en la frecuencia frente a infecciones [65].

Los monocitos pueden diferenciarse en dos subpoblaciones según la expresión diferencial de las moléculas CD14 y CD16. En individuos de edad avanzada se ha observado que la población de monocitos CD16⁺ está aumentada mientras que la población de monocitos CD16⁻ está disminuida [66]. Estos cambios en las subpoblaciones de monocitos/macrófagos se van a acompañar de una disminución en sus funciones como son el proceso fagocítico (quimiotaxis, fagocitosis, destrucción por producción de ROIs) y la presentación antigénica [67]. Otro cambio asociado al envejecimiento observado en los monocitos/macrófagos es una expresión y función alterada de TLRs [68,69]. En este sentido, nuestro grupo recientemente ha demostrado que el envejecimiento se acompaña de cambios en la expresión y función de ciertos TLRs en individuos sanos [70].

En cuanto a los cambios asociados al envejecimiento en las DC, éstos incluyen una disminución de la endocitosis y de la quimiotaxis, de la presentación antigénica y de la transducción de señales a través de TLRs. En el caso de las pDCs se produce también una disminución de la producción de citocinas IFN tipo I [63].

Adicionalmente a los cambios en las células del sistema inmune, la producción de citocinas y la función también están alteradas en las personas de edad avanzada. El proceso de envejecimiento inmunológico genera una producción excesiva de citocinas proinflamatorias. Mientras que células jóvenes requieren una estimulación para secretar citocinas y por lo tanto están estrechamente controladas, las células viejas liberan citocinas espontáneamente. La elevación en la producción espontánea de citocinas en ausencia de una estimulación específica resulta en un microambiente proinflamatorio en el cual los tejidos están constantemente activados por citocinas. La activación crónica de citocinas puede dar lugar a la generación de neoantígenos y puede contribuir al agotamiento de las reservas del pool de células T y células B. Así el sistema inmune en el envejecimiento pierde la capacidad de generar una respuesta inmunitaria apropiada lo cual puede dar lugar a un estado de inflamación crónica latente [71]. Este estado de inflamación crónica a veces se llama “inflamm-aging”. Citocinas, como IL-6, TNF- α e IL-1 β , se sospecha que tienen un papel importante en el mantenimiento de la inflamación crónica. De acuerdo con ello, nuestro grupo ha demostrado que el proceso de envejecimiento se asocia con una desregulación en el perfil de citocinas circulantes, principalmente debida a un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias [72].

Las principales manifestaciones clínicas del envejecimiento inmunológico son un estado de inflamación crónica, un aumento en la susceptibilidad frente a infecciones, tanto frente a nuevas infecciones como a infecciones crónicas o latentes, una disminución en la respuesta frente a vacunas y un aumento en la susceptibilidad frente a neoplasias y autoinmunidad con mayor morbilidad y mortalidad [56,62,73,74].

3. VITAMINA D

La vitamina D₃ se sintetiza principalmente en la piel tras la exposición a la radiación de la luz ultravioleta B (UVB), mientras que sólo una pequeña fracción (<5%) se obtiene a través de la dieta. La vitamina D₃ es hidroxilada en el hígado a 25-hidroxivitamina D (25(OH)VD₃), principal forma circulante. La 25(OH)VD₃ es hidroxilada de nuevo en el riñón a 1,25 dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂VD₃), forma biológicamente activa que puede alcanzar el torrente sanguíneo y ejercer múltiples efectos sistémicos. Las células del sistema inmune también expresan las enzimas necesarias y por tanto pueden hidroxilar 25(OH)VD₃ a 1,25(OH)₂VD₃. Esto es importante para la activación local de 25(OH)VD₃ en los tejidos y en los sitios de inflamación [75] (**Figura 7**).

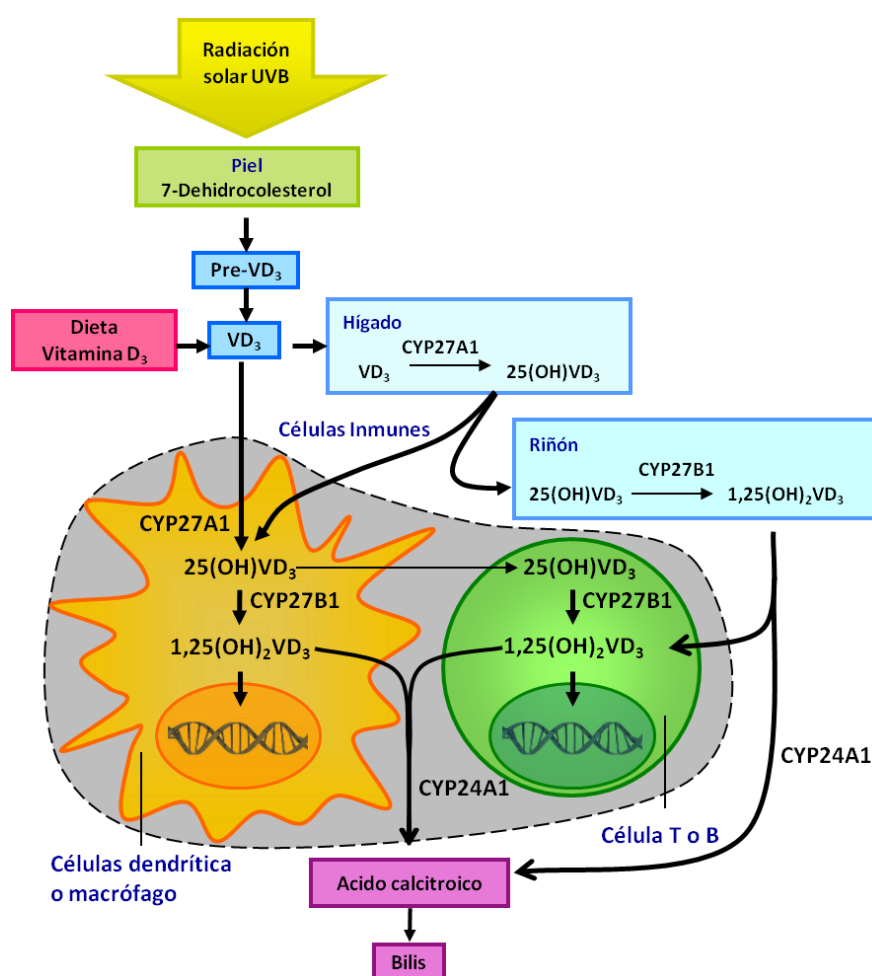


Figura 7. Metabolismo de la vitamina D. La Vitamina D₃ (VD₃) se adquiere en la dieta o es sintetizada por la piel a partir de 7 dehidrocolesterol. La vitamina D₃ se convierte en 25-hidroxivitamina D (25(OH)VD₃), por un miembro de la familia de los citocromos P, la 25-hidroxilasa (CyP27A1), la cual se expresa principalmente en el hígado. La 25(OH)VD₃, principal forma circulante, necesita otra hidroxilación por la 1- α -hidroxilasa (CyP27B1), expresada predominantemente en riñón para convertirse en 1,25 dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂VD₃), forma biológicamente activa. Las células del sistema inmune, que incluyen macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B expresan las enzimas CyP27A1 y/ o CyP27B1 y por tanto también pueden hidroxilar 25(OH)VD₃ a 1,25(OH)₂VD₃. Las cantidades excesivas de 1,25(OH)₂VD₃ son catalizadas por la 24-hidroxilasa (CyP24A1) y excretadas por la bilis. (Mora et al. Nat Rev Immunol. 2008).

El papel de la vitamina D en el metabolismo esquelético es bien conocido. La vitamina D regula la homeostásis del calcio, influyendo en el recambio óseo y en la interacción con las glándulas paratiroides, riñón, y el tracto gastrointestinal [76]. Sin embargo, la vitamina D también está implicada en una amplia variedad de otros procesos biológicos, incluyendo la modulación de la respuesta inmune y la regulación de la proliferación y la diferenciación celular [77-79].

3.1. EFECTOS INMUNODULADORES DE LA VITAMINA D SOBRE EL SISTEMA INMUNE

La 1,25(OH)₂VD₃ producida sistémica o localmente ejerce sus efectos sobre varios tipos celulares del sistema inmune, incluyendo macrófagos, DCs, células T y B, a través de la unión a su receptor (Tabla 5). Los macrófagos y las DCs expresan constitutivamente el receptor nuclear de la vitamina D (VDR), mientras que la expresión de VDR en células T y B está sobreexpresada únicamente tras activación [80,81].

Tabla 5. Efectos de 1,25 (OH)₂VD₃ sobre las células del sistema inmune.

Células	Efectos de 1,25(OH) ₂ VD ₃
Células Dendríticas	↓ proliferación. ↓ diferenciación, ↓ supervivencia, ↓maduración. ↓ moléculas CD40, CD80, CD86 y MHC-II, ↓ estimulación de célula T. ↓ IL-2.; Inhibición indirecta de la respuesta Th1. ↑ IL-10 y FoxP3; Inducción de Tregs. ↓ inducción de células Th17.
Macrófagos	↓ IL-6 e IL-23: disminución de la respuesta Th17. ↓ IL-1 y TNF. ↓ MHC-II: disminución presentación antigénica. ↑ catelicidina, quimiotaxis y fagocitosis ↑ estimulación de la respuesta frente infecciones ↓ expresión TLRs 9/4/2
Células T	↑ transcripción de IL-5 ± IL-4 en células T ¿? estimulación de la respuesta Th2 ↓ directo de la proliferación de células Th1, descenso de IL-2 e IFN-γ (ARN y proteínas), disminución de la respuesta Th1 ↑ células Tr1 productoras de IL-10 ↓ diferenciación Th17 y producción de IL-17 ↓ citotoxicidad de células T CD8
Células B	↓ proliferación ↓ diferenciación a células plasmáticas ↓ producción de inmunoglobulinas

La vitamina D, a través de su metabolito hormonal activo, regula la respuesta inmune potenciando la inmunidad innata (monocitos / macrófagos con actividad antimicrobiana), pero suprimiendo la inmunidad adquirida (funciones de los linfocitos T y B) [70,75,79,82,83]. Los efectos inmunomoduladores pueden estar relacionados con efectos anti-Th1 y anti-Th17, y la inducción de las células Treg y Tr1 [75,79,80,84]. En cuanto a los efectos Th2, existen datos contradictorios acerca de la posible estimulación de la respuesta Th2. La mayoría de los estudios *in vitro* muestran un efecto proTh2, sin embargo estudios *in vivo* apuntan a que la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ es capaz de inhibir la diferenciación de la células Th2 pero aumenta la secreción de IL-4 de la células Th2 ya diferenciadas [79]. Aunque varios estudios no muestran ningún efecto en las funciones efectoras de las células natural killer (NK), otros sugieren un papel de la vitamina D en la regulación de la función de células NK humanas [79] (Figura 8).

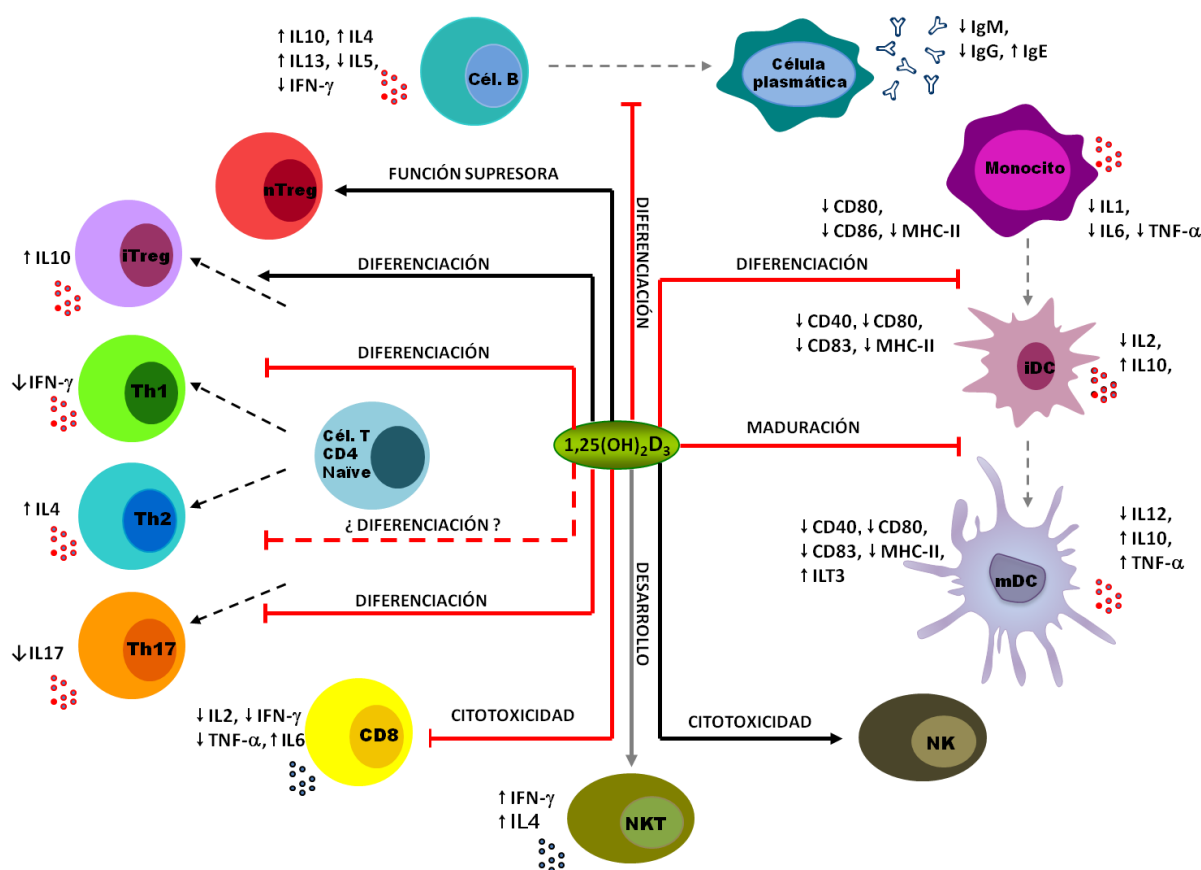


Figura 8. Esquema general de los mecanismos inmunomoduladores de la vitamina D sobre monocitos/macrófagos, células dendríticas (DC), células T, células B y células natural killer (NK).

En macrófagos y monocitos, la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ induce la proliferación y la expresión de catelicidina (péptido con actividad antimicrobiana) contribuyendo por tanto a una respuesta inmune innata frente algunas bacterias. En DCs, la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ disminuye la maduración, inhibiendo la sobrerregulación de la expresión de MHC-clase II, CD40, CD80 y CD86. Además, disminuye la producción de IL-12, IL-17, IFN-γ y atenúa la actividad citotóxica y la proliferación de células T CD4⁺ y T CD8⁺. La $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ puede también promover el desarrollo de células Tregs FoxP3⁺ y células Tr1 productoras de IL-10. Finalmente, $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ bloquea la proliferación de células B, la diferenciación a células plasmáticas y la producción de inmunoglobulinas (Modificado de Peelen et al. Autoimmun Rev. 2011).

3.2. VITAMINA D Y PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Los péptidos antimicrobianos constituyen una parte integral de la respuesta inmune innata frente a diversas infecciones, especialmente en las barreras de defensa.

Las células del sistema inmune y otras células de superficies epiteliales que están constantemente expuestas a patógenos potenciales producen péptidos anti-microbianos, principalmente catelicidina (LL-37). La catelicidina tiene una amplia actividad microbicida contra bacterias gram positivas y gram-negativas, así como ciertos virus y hongos. Su mecanismo de destrucción implica la lisis bacteriana a través de la desestabilización de la membrana [85].

Varios estudios sugieren que la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ sobreexpone la producción de péptidos antimicrobianos, principalmente catelicidina en una variedad de células diferentes [85-87]. Es probable que esta sobreexpone dependa de una presencia adecuada de niveles de vitamina D. Así, la $25(\text{OH})\text{VD}_3$, principal forma circulante de la vitamina D para determinar el status de vitamina D, es importante para la producción de la forma hormonal de la vitamina $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ y por tanto para la producción de la catelicidina.

3.3. RECEPTOR NUCLEAR DE LA VITAMINA D

Como se ha comentado anteriormente, los efectos inmunomoduladores de la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ se cree que están mediados a través de una vía que implica al VDR. La vitamina D actúa sobre sus células diana uniéndose a su receptor nuclear VDR en el citoplasma, el cual se trasloca al núcleo donde sufre heterodimerización con receptores nucleares de la familia del receptor del ácido retinoico (RXR), se une a secuencias de DNA específicas (VDRE, *vitamin-D responses elements*) localizadas en regiones promotoras y controla la transcripción de genes diana implicados en el metabolismo óseo y en la respuesta inmune [80,85] (**Figura 9**).

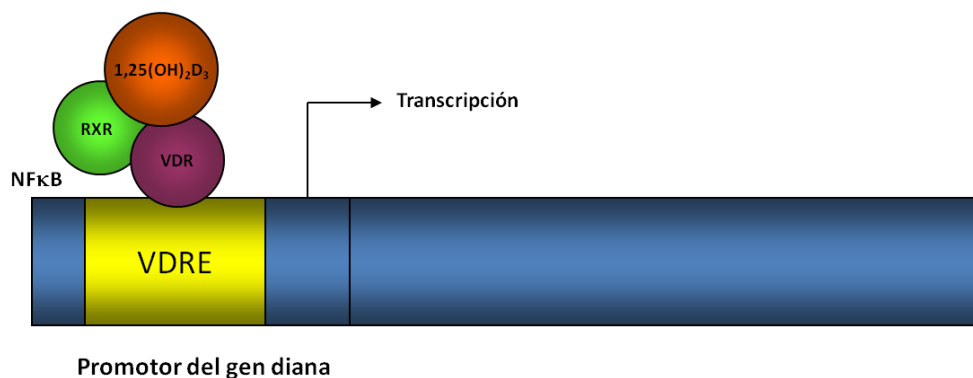


Figura 9. -Mecanismo de acción de la vitamina D dentro del núcleo de sus células diana. (Guillot et al. Joint Bone Spine 2010)

El VDR se expresa por muchos tipos de células inmunes, incluyendo los monocitos circulantes, macrófagos, DCs, y células T activadas (y probablemente células B) [81]. Los polimorfismos en el gen VDR potencialmente podrían afectar a la unión del VDR a la $1,25\text{ (OH)}_2\text{VD}_3$ y a los efectos de la vitamina D. Este es el razonamiento por el que los estudios de asociación investigan la relación entre los polimorfismos de VDR y las enfermedades [88,89].

El VDR está codificado por un gen localizado en el cromosoma 12q-13.1 [90]. Se han investigado varios polimorfismos en el gen VDR. Los polimorfismos VDR más estudiados incluyen FokI, BsmI, TaqI, y Apal (**Figura 10**).

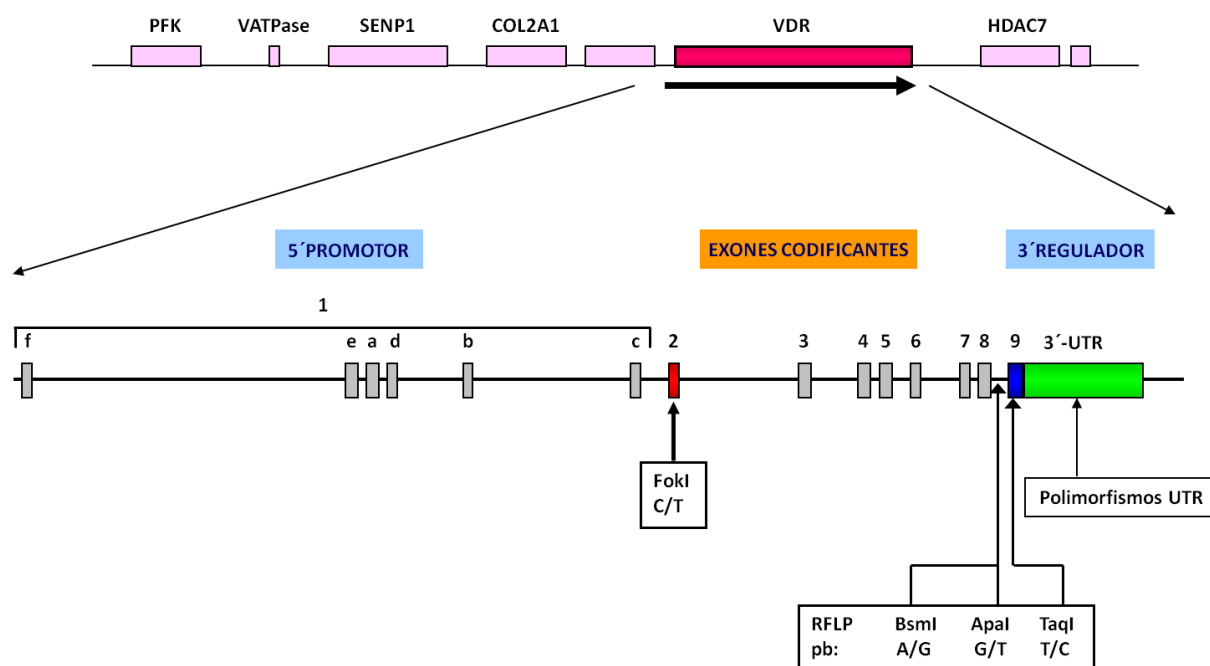


Figura 10. Estructura genómica del locus VDR en el cromosoma 12q13 y posición de algunos polimorfismos en el gen del receptor de la vitamina D. (Modificado de Uitterlinden et al. Gene. 2004 y J Steroid Biochem Mol Biol. 2004)

Los tres polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para BsmI, Apal y TaqI están adyacentes y se localizan en el extremo 3' del gen del receptor de la vitamina D [90]. Los polimorfismos Apal (rs 7975232, C> A) y BsmI (rs1544410, G> A) son RFLPs presentes en el intrón 8 y se considera que son polimorfismos de un único nucleótido (SNP) silenciosos [91,92]. El polimorfismo TaqI (rs731236 T> C) es un RFLP en el codón 352 en el exón 9 y da lugar a un cambio sinónimo en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada (ATT a ATC; ambos codones codifican para la isoleucina) [93]. Estos polimorfismos (Apal, BsmI y TaqI) no cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada.

El polimorfismo FokI (rs 10735810 T> C) se describió en los años noventa en el exón 2 en la región 5' del gen [94-96]. Consiste en un cambio de T por C situado en el primer codón de inicio potencial (ATG) que puede ser detectado por RFLP utilizando la enzima de restricción FokI [97]. A este polimorfismo se refiere como alelo f. "f" indica la presencia del sitio de restricción FokI y "F" indica su ausencia [96]. Así, dos variantes de la proteína pueden existir correspondientes a los dos sitios de inicio disponibles: una versión larga de la proteína VDR (alelo T o el alelo "f", y también se conoce como la forma M1, es decir, la metionina en la primera posición) [98] y una proteína acortada por tres aminoácidos (alelo C detectado como el alelo "F"; y también se conoce como la forma M4, es decir, la metionina en la cuarta posición) [97]. La mayoría de los experimentos realizados hasta ahora apuntan al hecho de que la forma más corta de la proteína (424 aminoácidos) es más activa que la forma larga (427 aminoácidos) en términos de su actividad de transactivación como un factor de transcripción. Sin embargo, esto parece ser un efecto específico del gen y del tipo celular. Por lo tanto, algunos genes y algunos tipos celulares serán más sensibles al efecto del polimorfismo que otros [88,90]. Se ha demostrado un impacto funcional de este polimorfismo en la respuesta inmune [99,100].

3.4. VITAMINA D Y ENFERMEDADES AUTOINMUNES E INFLAMATORIAS

Estas propiedades inmunomoduladoras de la vitamina D pueden explicar las asociaciones epidemiológicas encontradas entre los niveles de vitamina D y un gran número de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Aunque no existe un consenso sobre los niveles séricos óptimos de vitamina D, la deficiencia de vitamina D se define generalmente por niveles séricos inferiores a 20 ng/ml [76]. Los estudios epidemiológicos han demostrado que una deficiencia de vitamina D se asocia con el riesgo y / o gravedad de muchas enfermedades caracterizadas por inflamación, incluyendo el cáncer, enfermedades cardiovasculares, infecciones crónicas, rechazo de trasplantes y enfermedades autoinmunes [76,79,83,101,102]. En efecto, las principales enfermedades reumáticas mediadas por el sistema inmunes tales como la artritis reumatoide (AR), el lupus eritematoso sistémico (LES), la esclerosis sistémica (SSc) y síndromes como la enfermedad del tejido conjuntivo indiferenciada (UCTD) se caracterizan por bajos niveles séricos de vitamina D que a menudo se correlacionan con la gravedad de la enfermedad [103-108]. Posiblemente, el aumento en la ingesta de vitamina D puede disminuir la incidencia y gravedad de varias enfermedades. Asimismo, los polimorfismos en VDR se han correlacionado repetidamente con un aumento en la incidencia de enfermedades autoinmunes, sin embargo aún no se ha descrito asociaciones con fenotipos funcionales [88,90].

4. ARTERITIS DE CÉLULAS GIGANTES Y POLIMIALGIA REUMÁTICA

La arteritis de células gigantes (ACG) y la polimialgia reumática (PMR) son dos enfermedades inflamatorias íntimamente relacionadas que afectan a individuos de edad avanzada (>50 años).

La ACG o arteritis de la arteria temporal es una vasculitis sistémica de vasos de medio y gran calibre que afecta predominantemente a la aorta torácica y sus ramas proximales. La arteritis de la temporal fue inicialmente descrita por Hutchinson en 1890, pero el reconocimiento de la enfermedad con características histológicas específicas se atribuye a Horton en 1932 [109]. Posteriormente, Gilmour en 1941, describió por primera vez a esta patología como una vasculitis generalizada de vasos de mediano y gran calibre y la definió como ACG basándose en las características morfológicas del infiltrado inflamatorio que presentaban las arterias. Los pacientes con ACG pueden presentar como una de las manifestaciones de su enfermedad una polimialgia reumática.

La polimialgia fue descrita por primera vez en 1888 por Bruce con el término de *gota reumática senil*, aunque el término de PMR no se acuñó hasta 1957 por Barber [109]. La polimialgia reumática es una enfermedad inflamatoria relativamente frecuente caracterizada clínicamente por dolor incapacitante y rigidez matutina de predominio proximal: cuello, cintura escapular y cintura pélvica, y frecuentemente asociada a síntomas constitucionales tales como fiebre, anorexia, pérdida de peso, malestar. Normalmente responde rápidamente a dosis bajas de corticoides (CS) y tiene un pronóstico favorable. La PMR realmente es un síndrome que se puede presentar como entidad aislada o como una manifestación de otros procesos subyacentes, y entre ellos están fundamentalmente la ACG y la artritis reumatoide seronegativa, y más raramente un lupus eritematoso sistémico o una neoplasia [110]. Lo más frecuente es que se presente como enfermedad independiente.

4.1. EPIDEMIOLOGÍA

La ACG es el tipo más común de vasculitis que afecta a personas mayores de 50 años. Según la mayoría de los estudios epidemiológicos, la incidencia de ACG aumenta progresivamente con el envejecimiento, llegando a alcanzar su pico entre los 70-80 años. La ACG es más común en las mujeres siendo el ratio mujer:hombre aproximadamente de 2-3:1 [111]. La incidencia es mayor en caucásicos que en otros grupos étnicos como afroamericanos, árabes o asiáticos [112]. Los escandinavos y los norteamericanos descendientes de escandinavos, tales como los residentes en Minnesota (EE.UU), poseen las mayores tasas de incidencias (> 17 por 100.000 individuos >50 años), mientras que el sur de Europa tiene tasas de incidencia <12 por 100.000 individuos >50 años [111]. La PMR tiene la misma distribución que la ACG en los diferentes grupos étnicos, pero en general es tres veces más frecuente [113].

- **Relación entre la ACG y PMR**

La ACG y la PMR ocurren juntas frecuentemente. Cerca del 15% de los pacientes con PMR pura (es decir, sin clínica de ACG) tiene lesiones compatibles con biopsias de la arteria temporal (BAT) positivas para ACG según datos de PET (*positron emission tomography*) [114]. Aproximadamente la mitad de los pacientes con ACG tienen manifestaciones musculo-esqueléticas sugestivas de PMR. La PMR puede desarrollarse antes, durante o después de la ACG [113]. Esta relación ha conducido a confusión sobre la individualidad nosológica de ambos procesos [115]. Permanece por aclarar si la PMR es una forma leve de ACG, o constituye un síndrome independiente. Estos hallazgos sugieren que la PMR y ACG podrían representar dos extremos del espectro clínico de la misma enfermedad o al menos presentan mecanismos patogénicos similares: comparten múltiples síntomas, alteraciones analíticas, y una respuesta excelente a los corticosteroides, así como la asociación con determinados alelos HLA-DRB1. Aunque conceptualmente es una hipótesis atractiva, dichas similitudes no explicarían completamente las diferencias clínicas entre ambos síndromes. El porqué unos pacientes presentan un cuadro leve con predominio de una sintomatología musculoesquelética y ligera inflamación vascular subclínica que responde a dosis bajas de esteroides, y otros presentan una vasculitis grave con riesgo de complicaciones importantes que precisa dosis altas de esteroides, permanece por dilucidar.

4.2. CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN

La ACG se clasifica normalmente de acuerdo a los criterios propuestos por el *American College of Rheumatology* (ACR) en 1990 [116] (**Tabla 6**). Según la revisión de la Conferencia Consenso Chapel Hill de 2012 sobre la nomenclatura internacional de las vasculitis, el término de arteritis de la temporal no es apropiado puesto que no todos los pacientes tienen afectación de la arteria temporal, y sin embargo otras categorías de vasculitis si que pueden tenerla afectada. Por tanto, proponen únicamente la nomenclatura de arteritis de células gigantes [117].

Tabla 6. Criterios de clasificación de la ACR (1990) para la Arteritis de Células Gigantes

CRITERIOS	DEFINICION
Edad ≥ 50	Desarrollo de los síntomas en individuos con edad superior a 50 años.
Nueva Cefalea	Nuevo comienzo o nuevo tipo de dolor de cabeza localizado.
Arteria Temporal anormal	Hipersensibilidad a la palpación y pérdida de pulso, no relacionado a la aterosclerosis de arterias carótidas.
VSG elevada	VSG ≥ 50 mm /1ª hora según el método Westergren.
Biopsia de la arteria temporal anormal	La BAT muestra una vasculitis con predominancia de infiltrados de células mononucleares o inflamación granulomatosa generalmente con presencia de células gigantes multinucleadas.

Respecto a la clasificación, un paciente con diagnóstico de vasculitis se dice que tiene arteritis de células gigantes (temporal) si están presentes al menos tres de estos cinco criterios. Sensibilidad 93,5% y especificidad 91,2%.

Abreviaturas: ACR: American College of Rheumatology, VSG: Velocidad de sedimentación globular, BAT: biopsia de la arteria temporal

Estos criterios de clasificación se diseñaron para discriminar diferentes tipos de vasculitis (p.ej. poliarteritis nodosa, granulomatosis de Wegener, arteritis de Takayasu), pero no distinguen a las vasculitis de otras enfermedades. Por tanto, deberían ser usados para clasificar a los pacientes más que para diagnosticarlos [118]. El diagnóstico de la ACG exige la demostración de las lesiones vasculíticas características en la BAT [119].

El diagnóstico de PMR se basa en una combinación de características clínicas, reactantes de fase aguda (RFA) elevados, una rápida respuesta a glucocorticoides y exclusión de otras enfermedades que mimeticen con la PMR, tales como artritis reumatoide de inicio en el anciano (EORA), espondiloartritis (SpA) o sinovitis simétrica seronegativa remitente con edema con fovea

(RS3PE) entre otras. No existen criterios universalmente aceptados para el diagnóstico de la PMR, sin embargo para clasificar a la PMR se han propuesto varios grupos de criterios (Chuang, Healey y Bird) que resumen los caracteres principales del proceso aunque ninguno de ellos ha sido completamente validado [110,120,121]. Por su sencillez y utilidad práctica nosotros seguimos los criterios propuestos por Chuang y col. [110] que se resumen en la **Tabla 7**.

Debido a que un 20% de los enfermos con PMR tienen una velocidad de sedimentación globular (VSG) normal o elevada pero menor de 40 mm/1h, y con el objeto de evitar la inclusión de pacientes sin PMR, además de los criterios de (i) edad al inicio de la enfermedad igual o mayor de 50 años, (ii) dolor moderado o intenso y rigidez matinal superior a 30 minutos de más de 1 mes de duración en al menos dos de las siguientes áreas: cuello, cintura escapular y/o cintura pelviana y (iii) resolución de los síntomas en menos de 7 días con 5 mg/12 h de prednisona, hemos sido muy estrictos valorando otro criterio como es la ausencia de artritis en las pequeñas articulaciones, con el fin de descartar a los posibles pacientes con EORA. Para ser diagnosticado de PMR el enfermo debe cumplir los 4 criterios expuestos. La respuesta al tratamiento esteroideo, se utiliza en la práctica como una prueba diagnóstica para confirmar una sospecha clínica de PMR. Para que dicha respuesta diagnóstica tenga validez, el enfermo debe experimentar no sólo una mejoría, sino una completa resolución de los síntomas, en un plazo breve; generalmente la mejoría es dramática en las primeras 24-48 horas tras inicio del tratamiento y el individuo está asintomático en menos de 1 semana.

Tabla 7. Criterios diagnósticos de la Polimialgia Reumática

Criterios de Chuang

- Edad al inicio de la enfermedad igual o mayor de 50 años.
 - Dolor moderado o intenso y rigidez matinal superior a 30 minutos de más de 1 mes de duración en al menos dos de las siguientes tres áreas: cuello, cintura escapular y/o cintura pelviana.
 - Velocidad de sedimentación globular superior a 40 mm/1h.
 - Resolución rápida de los síntomas con dosis bajas de corticosteroides.
 - Exclusión de otros diagnósticos excepto arteritis de células gigantes
-

Para ser diagnosticado de PMR se tienen que cumplir todos los criterios.

Abreviaturas: PMR, polimialgia reumática.

Recientemente, la colaboración entre investigadores de la ACR y del *European League Against Rheumatism* (EULAR) ha permitido definir una nueva clasificación de criterios para la PMR [122] (**Tabla 8**).

Tabla 8. Criterios provisionales PMR (ACR/EULAR).**Criterios ACR/EULAR**

- Rigidez matutina > 45 min (2 puntos).
- Dolor en la cadera o rango limitado de movimiento (1 punto).
- Factor reumatoide y / o anticuerpos anti péptidos citrulinados cíclicos negativos (2 puntos).
- Ausencia de dolor en las articulaciones periféricas (1 punto).
- Hallazgos ecográficos al menos un hombro con bursitis subdeltoidea y/o tenosinovitis del bíceps y/o sinovitis glenohumeral (ya sea posterior o axilar) y al menos una cadera con sinovitis y / o bursitis trocantérea (1 punto); Ambos hombros con bursitis subdeltoidea, tenosinovitis del bíceps o sinovitis glenohumeral (1 punto).

Un paciente con una puntuación ≥ 4 (≥ 5 si se consideran los hallazgos ecográficos) se pueden clasificar como de PMR.
Abreviaturas: ACR, *American College of Rheumatology*; EULAR, *European League Against Rheumatism*; PMR, polimialgia reumática.

4.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

4.3.1. ACG

Las manifestaciones clínicas de la ACG son variadas y en términos generales pueden clasificarse dentro de uno de los siguientes síndromes: **1)** Síndrome constitucional, **2)** Sintomatología focal de la ACG y **3)** Polimialgia reumática. Cada uno de ellos puede ser la única manifestación del proceso, o lo que es más frecuente, el enfermo puede presentar una combinación variable de cualquiera de ellos.

4.3.1.1. Síndrome constitucional

Las manifestaciones sistémicas más frecuentes dentro de este síndrome son fatiga, pérdida de peso o anorexia, observados generalmente en más de la mitad de los enfermos. También se puede observar fiebre, generalmente moderada aunque en algunos casos puede ser alta (39-40°C). Ocasionalmente puede constituir la única manifestación de la enfermedad y por ello la ACG es un de los posibles diagnósticos a considerar ante un paciente anciano con síndrome febril de etiología desconocida [123].

4.3.1.2. Manifestaciones focales

Son consecuencia de la inflamación vascular y de los fenómenos isquémicos secundarios. Son muy características y las presentan la mayoría de los enfermos; dos de estas manifestaciones focales, la ceguera permanente y los accidentes cerebrovasculares, son las complicaciones más graves de esta enfermedad.

a.- Manifestaciones craneales: La más frecuente es la cefalea (60-80% de los enfermos) [124]. Su carácter e intensidad son muy variables y es resistente a la analgesia estándar. Clásicamente se localiza en la región témporo-parietal, pero en otras ocasiones es holocraneal, que puede acompañarse de hiperestesia en el cuero cabelludo. Lo más característico es que se trate de una cefalea de inicio reciente y, en el caso de pacientes con historia clínica de cefalea, que sus características sean diferentes de las cefaleas anteriores. El examen físico en la ACG revela que las ramas superficiales de la arteria temporal (AT) son anormales en más de la mitad de los casos, pudiendo notarse induradas, dolorosas a la palpación y a veces incluso pueden palparse nódulos en el trayecto de la AT superficial. Otras veces las anomalías exploratorias son menos prominentes y únicamente se observa ausencia o disminución del pulso en una de las arterias temporales.

La claudicación mandibular es un síntoma muy característico aunque menos frecuente, habiéndose observado del 10 al 50% de los enfermos. Su localización más frecuente son los músculos maseteros. La claudicación mandibular es un dato muy sugestivo de ACG, aunque ocasionalmente puede observarse en otros procesos con afección vascular como la amiloidosis primaria [125].

b.- Manifestaciones oculares: Las manifestaciones oculares más frecuentes de la ACG son: diplopia, pérdida de visión transitoria (o *amaurosis fugax*) y pérdida de visión permanente. La más benigna es la diplopia que puede ser resultado de la afección muscular o neuropática. Puede ser transitoria y en estos casos es sólo un síntoma referido por el paciente, o bien puede comprobarse en la exploración física la parálisis de algún par craneal. Su frecuencia media en la literatura es del 10% [126,127]. En la literatura, la pérdida transitoria de visión o amaurosis fugax se ha observado del 2 al 23% de los casos, con una frecuencia media del 12% [126,127]. En la ACG la ceguera permanente, cuya frecuencia actual es de un 10-14% de los pacientes, suele ser consecuencia de neuritis óptica anterior, aunque más raramente puede ser por oclusión de la arteria central de la retina o excepcionalmente secundaria a un infarto cortical. La pérdida de visión permanente puede ser parcial o total, unilateral o bilateral.

c.- Accidentes cerebrovasculares: Aunque la ACG afecta preferentemente a los vasos craneales, clásicamente se ha considerado que la frecuencia de accidentes cerebro-vasculares arteriales (ACVA) es muy baja y son en su mayoría debidos a la vasculitis oclusiva de las arterias carótidas o vertebrobasilar. Actualmente la prevalencia de ACVA en la ACG no está bien establecida. Posiblemente esta complicación esté infravalorada, pues al tratarse de una población anciana, con frecuencia los ACVA se atribuyen a aterosclerosis. Sin embargo, cuando su relación temporal con otras manifestaciones de ACG es muy estrecha, presentándose simultáneamente o poco después lo más razonable es atribuirlos al proceso vasculítico.

Los niveles de marcadores inflamatorios y la edad avanzada al momento del diagnóstico, hipertensión, cardiopatía isquémica previa y la ausencia de manifestaciones sistémicas son moderadamente factores de riesgo para la eventos isquémicos craneales [128].

d.- Afección aórtica: Cada vez son más abundantes los datos que sugieren que la afección de la aorta y sus ramas principales no es excepcional en la ACG, aunque probablemente sea poco reconocida. Dicha afección se localiza fundamentalmente en el cayado aórtico y la aorta torácica y, más raramente en la aorta abdominal. Las manifestaciones clínicas son muy variadas pudiendo manifestarse por insuficiencia aórtica, disnea de esfuerzo, dolor torácico resultante de disección aórtica o de cardiopatía isquémica, o muerte súbita por disección aórtica [129,130]. La afección aórtica puede observarse en pacientes previamente diagnosticados de ACG y en estos casos se trata en general de una manifestación tardía, presentándose varios años después del diagnóstico (mediana 7 años). Aunque la afección aórtica es frecuentemente una manifestación tardía de la ACG, normalmente se acompaña de una VSG elevada lo que apoya el que las lesiones se deben a un proceso inflamatorio activo. En otros enfermos la afectación aórtica o de sus ramas principales puede manifestarse únicamente por soplos vasculares o claudicación de extremidades en cuyo caso suele comprometer a las extremidades superiores preferentemente [131-133].

4.3.1.3. Polimialgia reumática

La PMR es una manifestación frecuente de la ACG habiéndose observado entre un tercio y la mitad de los casos con ACG probada por biopsia. Aunque la PMR puede ser la única manifestación de una ACG, cuando la PMR se presenta en la ACG, en la mayoría de los casos se acompaña de sintomatología craneal sugestiva de ACG y, de hecho, la presencia de cualquiera de estos síntomas o signos en un paciente con PMR aumenta mucho la posibilidad de que el individuo padezca realmente una ACG [134].

4.3.2. PMR

La PMR es un síndrome caracterizado por dolor y rigidez matinal de predominio proximal en cuello, cintura escapular y/o pélvica [110,135]. La afectación suele ser simétrica y su inicio puede ser brusco o insidioso. El dolor es bilateral, peor de noche y en reposo. Suele ser intenso y con frecuencia resulta invalidante. En la exploración física destaca una disminución de la movilización activa de los hombros, cuello y caderas debido al dolor. Los músculos de estas zonas pueden estar dolorosos a la

palpación. Las manifestaciones constitucionales se presentan en un $\sim 40\%$ de los pacientes [124,136,137].

Los estudios anatomopatológicos de biopsias sinoviales de estas articulaciones han demostrado la existencia de una sinovitis inespecífica, aunque se ha sugerido que la sinovial de estos pacientes presentaría un infiltrado mononuclear característico, pudiéndose a veces observar células gigantes [138,139]. La presencia de artritis en la PMR es rara (13% de nuestros pacientes). La existencia de síndrome constitucional (fiebre y adelgazamiento) es algo menos frecuente que en la ACG encontrándose aproximadamente en un cuarto y en la mitad de los casos respectivamente.

4.4. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

El diagnóstico de la ACG y la PMR se hace en base a sus características clínicas y marcadores inflamatorios elevados, pero la BAT permanece con la prueba “gold standard” para el diagnóstico de ACG.

4.4.1. Datos de laboratorio

Las pruebas de laboratorio utilizadas para el diagnóstico de la ACG y la PMR aunque inespecíficas son muy características e indican la naturaleza inflamatoria de estas patologías. Los datos analíticos más característicos son la elevación de los RFA o marcadores inflamatorios que incluyen a la VSG y a la proteína C reactiva (PCR) de 2 a 10 veces en los pacientes con PMR y ACG comparados con el límite superior de los valores normales [109,113]. De hecho, una VSG superior a 50 mm/1h. es uno de los Criterios de Clasificación para la ACG propuestos por el *American College of Rheumatology*. Sin embargo, en unos pocos pacientes los valores para la VSG, y menos frecuentemente para la PCR, son normales [140]. En aquellos enfermos que no presenten un aumento importante en los niveles de la VSG, la determinación de los niveles de PCR puede ser especialmente útil [141]. Varios autores han descrito un síndrome idéntico al de la PMR clásica pero con una VSG normal o al menos inferior al valor generalmente recomendado de 40 mm/1h [142]. Por ello y aunque hasta hace poco, en todos los criterios de clasificación para la PMR se incluía un valor de VSG superior a 40mm/1h, recientemente los criterios propuestos por ACR/EULAR han suprimido dicho requisito. La PMR sin elevación importante de la VSG comprende enfermos con sintomatología álgica similar a la PMR, resistentes al tratamiento previo con AINES y en los que la sintomatología se resuelve completamente en pocos días con dosis bajas de prednisona. La menor elevación de la VSG en estos pacientes podría deberse a cualquiera de estos dos factores considerados

independientemente o en combinación: descenso parcial de la VSG como consecuencia del tratamiento al que han sido sometidos en la mayoría de los casos con AINES o a una menor intensidad del proceso inflamatorio, como lo sugeriría también el hecho de que en estos pacientes sean algo menos frecuentes otras alteraciones analíticas como anemia, elevación de enzimas hepáticas o proteinograma anormal, así como una menor frecuencia de manifestaciones sistémicas como fiebre y/o adelgazamiento.

Los valores de PCR son más sensibles que los valores de la VSG para evaluar la actividad de la enfermedad en PMR y ACG [143]. Las recaídas normalmente van precedidas por un aumento en estos marcadores inflamatorios. Sin embargo, la elevación de los niveles de los marcadores inflamatorios no necesariamente conlleva a una recaída de la enfermedad [142].

En la mitad de los casos de ACG y con menor frecuencia (20-25%) de PMR, los pacientes presentan anemia con caracteres de proceso inflamatorio crónico. Además, una proporción importante de enfermos presenta alteración en los enzimas hepáticos (25-40% y 15-20% respectivamente), especialmente de la fosfatasa alcalina y con menor frecuencia de las transaminasas y, alteraciones inespecíficas del proteinograma (elevación de la alfa 2, beta, o gammaglobulinas). Los niveles de anticuerpos anticardiolipina pueden también estar aumentados en pacientes con ACG activa [144]. Varios grupos de investigadores han estudiado la presencia de anticuerpos anticardiolipina, y su relación con la presencia de fenómenos isquémicos en pacientes con ACG [144-147]. Aunque el título de estos anticuerpos parece disminuir o negativizarse con el tratamiento esteroideo, existen datos contradictorios sobre su posible papel en el desarrollo de fenómenos isquémicos en pacientes con ACG. Por otra parte, en algún estudio se ha demostrado que la presencia de anticuerpos anticardiolipina en los pacientes con PMR aumenta las posibilidades de padecer una ACG [148].

Todas estas alteraciones analíticas se normalizan rápidamente tras el comienzo del tratamiento con glucocorticoides.

4.4.2. Biopsia de la arteria temporal

La BAT continúa siendo la prueba de referencia para el diagnóstico de la ACG [149]. Dado que las lesiones inflamatorias afectan a las arterias con una distribución parcheada existiendo zonas de la arteria indemnes, el tamaño de las biopsias deberían de ser al menos de 3-5 cm de longitud para evitar resultados falsos negativos [119,150]. La realización de la biopsia se debe elegir de la arteria

temporal que más anormal sea a la exploración. La rentabilidad diagnóstica incrementa si la BAT se realiza en secciones de los vasos que presenten un signo de halo en estudios ecográficos [151]. Sin embargo, aún cuando se han llevado a cabo minuciosamente, la BAT puede ser negativa en un 10-20% de los pacientes con manifestaciones clínicas de ACG [152]. Los resultados falsos negativos pueden deberse al muestreo de un segmento del vaso ausente de inflamación o a una terapia prolongada de corticoides [153]. Además, la BAT puede realmente ser negativa cuando las arterias temporales no están inflamadas. Los hallazgos de BAT negativos son más comunes (42% de los casos) en aquellos pacientes con ACG con afectación de grandes vasos [154]. Actualmente no existe un criterio generalmente aceptado sobre cuando realizar biopsia de arteria temporal en pacientes con PMR. En el caso de presentarse una PMR en pacientes mayores de 70 años y/o con síntomas craneales sugestivos de ACG, las posibilidades de ACG son elevadas y la sospecha diagnóstica habrá que confirmarla mediante BAT.

4.4.3. Imagen

Varias técnicas de imagen, como la ecografía doppler color, la angiografía por resonancia magnética (ARM), y la angiografía por tomografía computerizada de contraste (ATC) están disponibles para investigar a los pacientes con ACG, permitiendo visualizar la pared vascular y el lumen de la aorta y de sus ramas proximales. La inflamación de la pared vascular precede al desarrollo de las complicaciones vasculares, por lo que todas estas técnicas pueden ayudar al diagnóstico temprano de la ACG.

Los estudios de imagen han contribuido en gran medida a la demostración de los componentes vasculares y articulares que intervienen en la ACG y la PMR, respectivamente, y pueden ayudar en el diagnóstico y seguimiento de ambos trastornos, especialmente en la monitorización de la ACG con implicación de grandes vasos [155].

4.5. TRATAMIENTO

El tratamiento de la ACG se basa en la administración diaria de glucocorticoides (en una única dosis o mejor en 3 dosis al día) [124] y debe ser iniciado inmediatamente y agresivamente, con el objetivo de suprimir la inflamación y prevenir la pérdida visual y los eventos isquémicos [156]. La mayoría de los pacientes con ACG pueden tratarse adecuadamente con dosis iniciales de 40-60 mg por día de prednisona o su equivalente, sin embargo aquellos pacientes con riesgo de desarrollar

complicaciones isquémicas se deben de tratar inicialmente con mayores dosis de glucocorticoides (1 mg / kg por día) [113]. Una vez que se considera que la actividad clínica está controlada, lo que será evidente por la remisión de la sintomatología y normalización de las anomalías analíticas, el objetivo será ir disminuyendo gradualmente la dosis de los glucocorticoides para lograr, ya sea una dosis de mantenimiento estable o a una retirada completa del fármaco. Inicialmente la disminución será más rápida (unos 5 mg. cada 1-2 semanas) y posteriormente, cuando se ha llegado a una dosis relativamente poco tóxica (20 mg/día de prednisona o equivalente) se reducirá más lentamente hasta alcanzar la mínima dosis necesaria para mantener al enfermo asintomático, y sí es posible sin anomalías analíticas. Debido a que los pacientes con ACG pueden recaer durante el proceso de reducción dando lugar a un aumento de la dosis de corticosteroides, el proceso de disminución debe de ser individualizado para cada paciente. La ACG es un proceso autolimitado y la mayor parte de los enfermos precisa tratamiento durante 6 a 24 meses [124] aunque en algunos casos, como aquellos con los índices inflamatorios más altos, es necesario prolongar el tratamiento durante más tiempo [157]. Una vez suspendido el tratamiento, si reaparecen las anomalías analíticas, habrá que replantearse la posibilidad de que la ACG esté de nuevo activa. La importancia de una actividad subclínica de la ACG viene resaltada por los hallazgos recientes de afección aórtica varios años después de suspendido el tratamiento. Aunque no existen recomendaciones al respecto, considerando el riesgo de aneurismas y disección aórtica probablemente sea recomendable realizar evaluaciones con pruebas de imagen anuales para eliminar esta posibilidad.

Por su trascendencia, merece especial mención el tratamiento de los pacientes con afección ocular. El mejor predictor de pérdida de visión permanente es una historia previa de *amaurosis fugax*. Por ello, ante una sospecha de ACG, si el paciente refiere *amaurosis fugax* el tratamiento con corticoides debe comenzarse inmediatamente sin esperar a los resultados de la biopsia. A este respecto, Achkar y col. [158] han demostrado que los resultados de la BAT no se modifican sensiblemente incluso después de 2 semanas de tratamiento esteroideo. Una vez establecida la pérdida de visión, ésta responde mal al tratamiento. Aunque se ha sugerido que los bolos intravenosos de metilprednisolona pueden ser más eficaces en pacientes con sintomatología ocular, sus resultados no son claramente superiores a los obtenidos con prednisona oral a dosis de 1 mg/kg/día [159].

Existe una evidencia clara de que la dosis acumulada de esteroides está directamente relacionada con la incidencia de los efectos adversos de los esteroides. Esto hace que se intente usar la mínima dosis eficaz de esteroide, ya que el tratamiento con altas dosis de glucocorticoides, especialmente en una población de ancianos con múltiples comorbilidades preexistentes, conlleva graves riesgos. Debido a la significativa morbilidad asociada a largo plazo con el uso de

corticosteroides se han realizado esfuerzos para investigar el uso de otros agentes economizadores de esteroides en el tratamiento de la ACG [118]. De los numerosos fármacos inmunosupresores utilizados como agentes economizadores de esteroides, el metotrexato es el mejor estudiado, aunque en la búsqueda de seguridad y eficacia de éste, se ha ampliado incluir una serie de otros agentes citotóxicos e inmunomoduladores como azatioprina, inhibidores de factor de necrosis tumoral (TNF), tocilizumab [160,161]. Dos estudios retrospectivos han sugerido que las dosis bajas de aspirina podrían prevenir complicaciones isquémicas relacionadas con la ACG. Sobre la base de estos resultados, EULAR ha recomendado que todos los pacientes con ACG reciban dosis bajas de aspirina. Sin embargo, los supuestos efectos beneficiosos de la aspirina encontrados en los estudios anteriores no han sido confirmados por otros estudios retrospectivos. Por tanto, se necesita un estudio prospectivo para determinar si realmente la aspirina tiene un papel en la ACG [118].

Respecto al tratamiento de la PMR, el tratamiento de elección son los glucocorticoides en dosis sustancialmente menores que en la ACG. No existe ninguna pauta generalmente aceptada, pero en términos generales se cree que se debe administrar una dosis diaria de 10 mg de prednisona o equivalente (5 mg cada 12 h). Si se utilizan dosis superiores a las recomendadas la especificidad diagnóstica de la prueba terapéutica es menor, pues cuanto mayor es la dosis de esteroides mayor es el número de procesos que pueden experimentar una mejoría con el tratamiento. Posteriormente, la dosis de corticoides se puede ir reduciendo gradualmente, aunque la mayor parte de los pacientes requieren tratamiento durante una media de 2 años. Los descensos de la dosis de esteroides deben ser muy lentos. Un descenso rápido parece asociarse a un incremento en la reactivación de la PMR. En las fases de supresión del tratamiento esteroideo puede ser de cierta utilidad la asociación de dosis bajas de AINEs.

4.6. ETIOPATOGENÉISIS

4.6.1. Etiología

La etiología de la ACG y PMR es desconocida. Dado que ambas patologías ocurren con mayor frecuencia en individuos mayores de 50 años, los cambios específicos asociados a la edad en el sistema inmune innato y adquirido, así como las alteraciones relacionadas con el envejecimiento en los vasos de medio y gran calibre se consideran factores de riesgo y parecen tener su importancia en el desarrollo de la vasculitis [49].

Además de la influencia del factor de riesgo de la edad avanzada, se ha postulado una posible etiología infecciosa en base a patrones cíclicos con picos en la tasa de incidencias y variaciones estacionales en pacientes con PMR y ACG [162]. La hipótesis infecciosa ha adquirido más importancia por la demostración de que las DCs, normalmente activadas por agentes patógenos a través de TLRs en las arterias inflamadas de pacientes con ACG tienen un fenotipo activado caracterizado por una alta expresión de CD86 aunque los eventos que dan lugar a su activación aún no se han esclarecido [163,164]. Diversos estudios caso-control han investigado el posible papel de virus y bacterias mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), inmunohistoquímica o hibridación *in situ* en BAT positivas de pacientes con ACG. Así, varios agentes infecciosos (*Herpesvirus humano*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Parvovirus B19 humano*, *Chlamydia pneumoniae*, *Parainfluenza virus humano tipo I*) se han estudiado como posibles desencadenantes del proceso vasculítico en individuos genéticamente predispuestos [165]. Sin embargo, hasta la fecha, ningún microorganismo se ha relacionado de forma consistente con la ACG o la PMR [166].

La influencia de los factores de riesgo cardiovascular, tales como el tabaquismo y la aterosclerosis, aumentan la susceptibilidad a ACG, posiblemente por promover cambios arteriales inflamatorios [167,168].

4.6.2. Predisposición Genética

El predominio en la raza blanca y, sobre todo la alta incidencia en los países escandinavos y en las poblaciones de América del Norte de descendientes escandinavos (Minnesota, Olmsted), así como la descripción de casos de agregación familiar sugieren una clara influencia genética en el desarrollo de la ACG y PMR [115] [169]. Esta susceptibilidad genética está unida al complejo principal de histocompatibilidad (MHC)[170,171]. Mientras que no se ha encontrado una asociación con el

MHC de clase I [172], varios autores han descrito la asociación de ambos síndromes con antígenos de clase II [170,173]. En muchas poblaciones estudiadas hasta la fecha, el alelo HLA-DRB1*04 se ha asociado a una mayor susceptibilidad a ACG y PMR, más frecuentemente con el alelo DRB1*0401 pero también con el alelo DRB1*0404 [165,174,175].

Todos los pacientes con ACG y PMR, independientemente del alelo HLA-DRB1, comparten una misma secuencia peptídica compuesta por 4 aminoácidos (DRYF), localizada en la segunda región hipervariable (HVR2) de la cadena HLA-DRB1 [176]. Esta secuencia de aminoácidos (posiciones 28-31) forma parte de la región β -plegada de la molécula de HLA, que es la zona de presentación del antígeno. Sin embargo, estudios similares realizados en países europeos [177,178], aunque han encontrado una asociación similar con el HLA-DRB1*04, no han confirmado la asociación con la secuencia de aminoácidos (DRYF) descrita por los investigadores de la Clínica Mayo [171,175,176].

En cuanto a otros factores de riesgo genéticos, los polimorfismos del gen del cluster TNF-IL6 se han asociado con una susceptibilidad ligeramente mayor para desarrollar ACG y PMR [179]. En pacientes españoles, pero no así en pacientes Italianos [180], el polimorfismo 174G>C en la región promotora del gen de IL-6 se asoció con una mayor susceptibilidad a ACG. Los pacientes con ACG también se asocian de forma independiente con el alelo B*15 del MHC y con el alelo A5 del gen A relacionado a la cadena de clase I del MHC (MICA)[181]. Por último, variantes genéticas comunes de NOS2, VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), ILR1N, IL6 y CCL2 (quimiocina-CC ligando 2) también se han identificado más frecuentemente en pacientes con ACG que en individuos sanos [182].

4.6.3. Anatomía Patológica

Las alteraciones histológicas clásicas de la ACG consisten en una inflamación transmural de la pared arterial, con la interrupción de la lámina elástica interna y la hiperplasia de la íntima dando lugar a una oclusión luminal e isquemia tisular [109,183]. Los infiltrados celulares comprenden principalmente linfocitos T CD4⁺ y macrófagos, normalmente agrupados en granulomas, con presencia también de algunas células T CD8⁺, células B, neutrófilos y eosinófilos. En la mitad de los pacientes con ACG las células gigantes multinucleadas se encuentran en la unión íntima-media [109]. El infiltrado inflamatorio granulomatoso tiene una distribución focal y segmentaria. La inflamación vascular casi siempre coexiste con un síndrome de inflamación sistémica. En la PMR los hallazgos patológicos son menos destacados que en la ACG y comprenden principalmente infiltración sinovial por células T y macrófagos [113].

4.6.4. Patogénesis

Las manifestaciones clínicas de la ACG son el resultado de dos procesos inmunopatogénicos diferentes: una inflamación sistémica y una inflamación vascular. La patogénesis de la ACG se basa en una respuesta inmunológica exacerbada basada en las interacciones entre el sistema inmune innato y adquirido implicando a las células dendríticas y a los linfocitos Th1 y Th17 quienes contribuyen a la enfermedad. La activación persistente del sistema inmune innato dará lugar a la inflamación sistémica mientras que una activación inapropiada del sistema inmune adquirido formará granulomas y la lesión en la pared vascular [118,183,184] (**Figura 11 y Figura 12**).

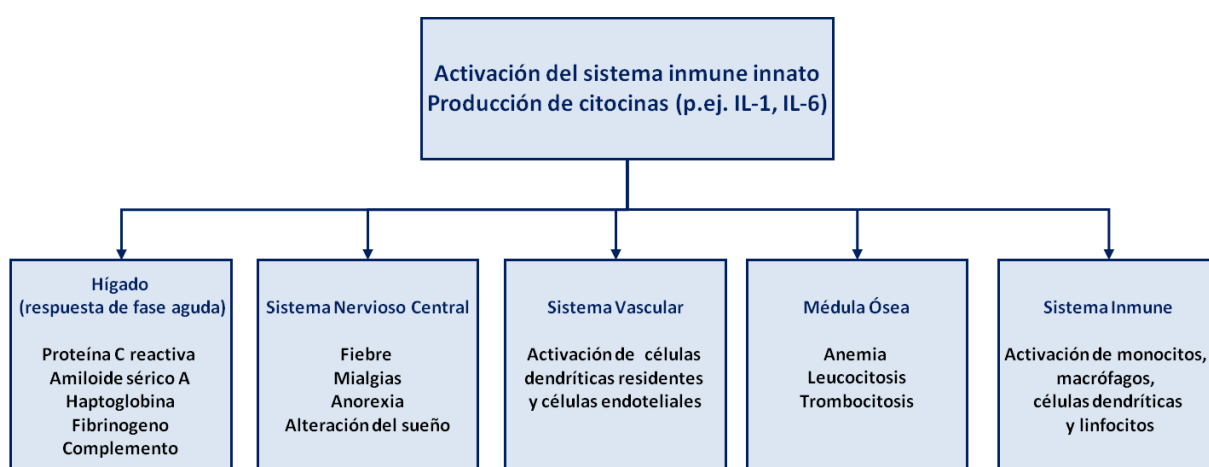


Figura 11. Respuesta inflamatoria sistémica en arteritis de células gigantes y polimialgia reumática.

La inflamación de la pared vascular está precedida y se acompaña por una intensa respuesta de fase aguda. Los macrófagos circulantes liberan IL-1 e IL-6, inductores críticos de una reacción multiorgánica, implicando al hígado, sistema nervioso central, sistema vascular, médula ósea y sistema inmune. Los reactantes de fase aguda hepáticos son útiles en el diagnóstico de laboratorio de la ACG y la PMR. (Weyand et al. Ann Inter Med 2003).

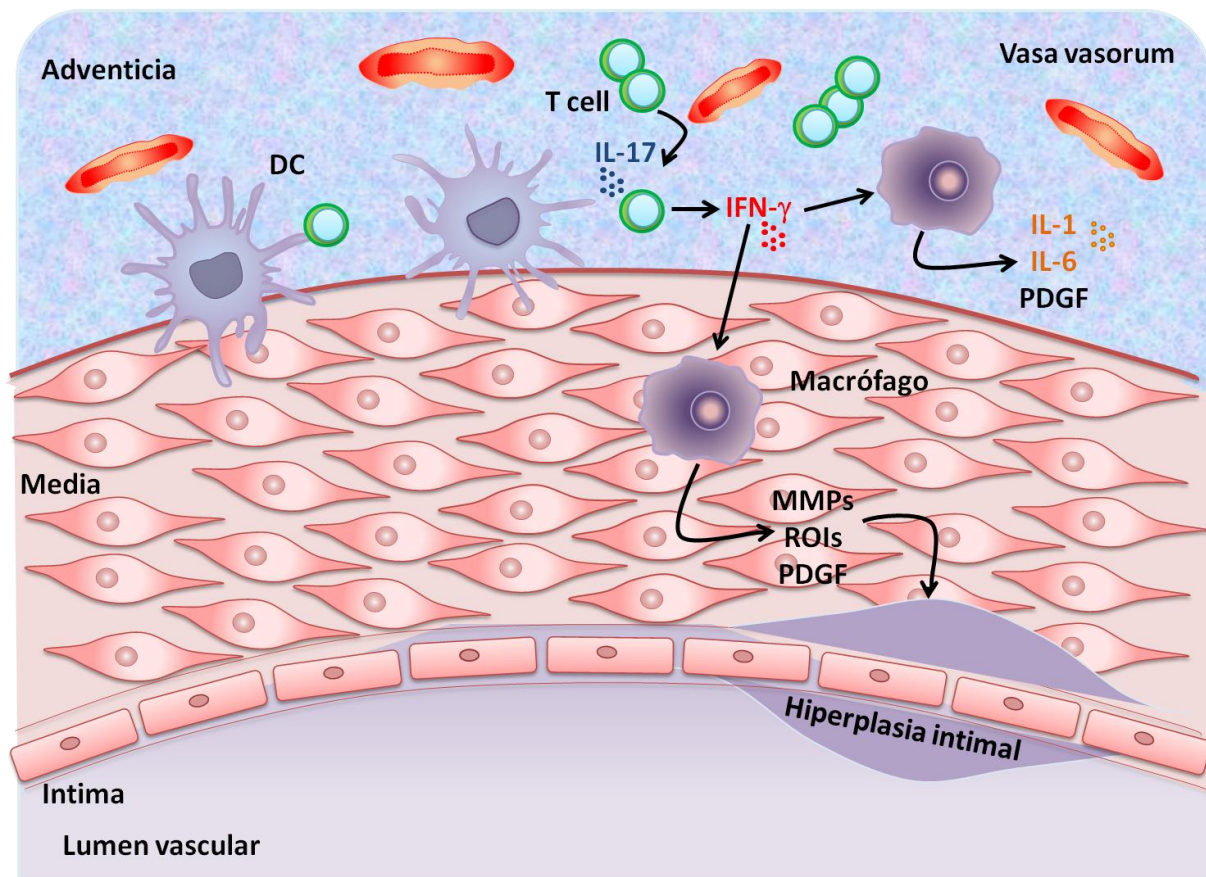


Figura 12. Mecanismos patogénicos en ACG.

Las células dendríticas activadas reclutan y estimulan a las células T, quienes tras estimulación liberan IL-17 e IFN-γ, éste último un potente activador de macrófagos. Los macrófagos activados, sintetizan PDGF, dando lugar a la hiperplasia intimal. Además, los macrófagos también producen citocinas proinflamatorias, MMPs y radicales libres de oxígeno causando el daño de la pared vascular.

Abreviaturas: DC, célula dendrítica; ACG, arteritis de células gigantes, IFN, interferón; MMP, metaloproteína de la matriz; PDGF, factor de crecimiento plaquetario. (Modificada de Salvarani et al. Nat Rev Rheumatol.2012).

Diversos estudios han demostrado la existencia de una población de DCs residentes en la adventicia de arterias de mediano y gran calibre, las cuales actúan como centinelas desempeñando importantes funciones de protección de la pared arterial. En las arterias temporales no inflamadas, estas células son inmaduras, quiescentes, expresan S100 y CCR6 pero no expresan las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, lo que indica su estado de reposo, no poseyendo aún la capacidad de estimular a las células T ni de liberar mediadores inflamatorios [163,164].

Experimentos de transferencia adoptiva de células T CD4⁺ llevados a cabo en ratones quimera SCID (severe-combined immunodeficiency) a los que se les implantó una arteria temporal inflamada de pacientes con ACG han demostrado que la activación de las DCs es suficiente para iniciar el reclutamiento de las células T y su activación in situ, iniciándose una respuesta inmune adquirida

[164,185]. Estos datos sugieren que la respuesta inflamatoria en la ACG está probablemente iniciada por las DCs localizadas en la unión media-adventicia donde reconocen a los posibles agentes etiológicos a través de sus TLRs y cuya activación es el primer paso crítico en la vasculitis que precede al reclutamiento de las células T y macrófagos en la pared arterial [186,187].

Como se ha comentado anteriormente, los TLRs proporcionan un importante nexo de unión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida a través del reconocimiento de PAMPs por parte de las células presentadoras de antígeno que expresan TLRs. Los TLRs típicamente se expresan en DCs pero también pueden expresarse en otros tipos celulares como monocitos, macrófagos, células T y células B. Además otras células no inmunes de la pared arterial, como son células endoteliales y células de músculo liso también pueden expresar TLRs. Así, los TLRs pueden mediar la pérdida de la tolerancia y dar lugar a la inducción de enfermedades autoinmunes [188].

Las vasculopatías inflamatorias (ACG, arteritis de Takayasu, poliarteritis nodosa y aterosclerosis, etc) muestran un fuerte tropismo tisular y selectivamente afectan distintos territorios vasculares. Los diferentes territorios vasculares están ocupados por DCs residentes y pueden estar expuestos a distintos perfiles de patógenos, por lo que los patrones de expresión de los TLRs en la vasculatura arterial son heterogéneos y van a ser cruciales en la detección de microorganismos. Krupa y col detectaron transcritos de TLR2 y TLR4 en arterias temporales normales [164]. Por otro lado, Pryshchep y col han demostrado que diferentes segmentos del vaso albergan distintos TLRs lo cual podría explicar el tropismo de la ACG por determinadas arterias [185]. Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia que tienen los TLRs en la activación y maduración de las DCs en la ACG.

Normalmente, las DCs activadas migran a los ganglios linfáticos donde desencadenan la respuesta inmune adquirida. Sin embargo las DCs adventiciales de las arterias inflamadas de pacientes con ACG producen IL-12 e IL-18 y expresan MHCII, CD83 y CD86, CCR7, así como las quimiocinas CCL18, CCL19 CCL20 y CCL21. El CCR7 se une a CCL19 y CCL21 en un mecanismo autocrino lo que contribuye a que las DCs permanezcan atrapadas en la pared arterial. Así las DCs actúan como APCs reclutando y activando a los linfocitos T CD4⁺ los cuales sufrirán expansión clonal [184,189].

Los infiltrados de células T en las arterias temporales de los pacientes con ACG son CD4⁺, principalmente células Th1 productoras de IL-2 e IFN- γ y células Th17 productoras de IL-17, mientras que las células Th2 están ausentes [190]. Históricamente, la ACG se ha considerado como una enfermedad mediada por una respuesta Th1, basándose en estudios en los que el IFN- γ era la citocina dominante en las arterias inflamadas de pacientes con ACG [140]. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que otra citocina proinflamatoria, IL-17, se produce simultáneamente con IFN- γ en

las arterias inflamadas, contribuyendo ambas respuestas patogénicas a las manifestaciones sistémicas y vasculares de la ACG [190-192]. Además de su presencia en los infiltrados inflamatorios, los niveles celulares de Th1 y Th17 también están incrementados en la sangre de los pacientes con ACG activa comparados con ACG inactiva y se correlacionan con la actividad de la enfermedad.

Los glucocorticoides son altamente efectivos en suprimir las manifestaciones sistémicas de la enfermedad. Por un lado, los corticosteroides actúan sobre los macrófagos inhibiendo la producción de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-23) que promueven la diferenciación hacia Th17, mientras que los macrófagos que promueven la respuesta Th1 escapan a esta supresión manteniéndose crónicamente la respuesta vasculítica. En resumen, las células Th17 productoras de IL-17 son más sensibles a la supresión mediada por glucocorticoides, mientras que la respuesta Th1 productora de IFN- γ persiste con el tratamiento esteroideo. Estos datos sugieren que muchas de las manifestaciones agudas de la ACG están mediadas por IL-17 y parecen implicar a la respuesta Th1 en el mantenimiento de la actividad de la enfermedad. Según estos datos, es posible que la monitorización de las frecuencias de células Th1 y Th17 pueda ayudar a valorar la actividad de la enfermedad en ACG [190].

Las muestras de BAT positiva de pacientes con ACG también muestran una sobreexpresión de la citocina IL-32 [193]. La IL-32 es una citocina proinflamatoria Th1, principalmente producida por células NK, células T, monocitos, células epiteliales y endoteliales, la cual tiene importantes funciones en la respuesta inmune innata y adquirida [194]. Su expresión está inducida por citocinas Th1, tales como IL-1 β , TNF α IFN- γ y parece ser un importante mediador de la inflamación arterial en ACG actuando especialmente sobre macrófagos infiltrados y células del músculo liso vascular, induciendo la liberación de citocinas y factores de crecimiento entre otros.

Otra citocina que también se ha visto que se expresa en arterias inflamadas es la IL-21 [195]. La IL-21 es una citocina pleiotrópica producida por células T CD4⁺ (incluyendo Th17 y Th foliculares) y potencialmente afecta a la diferenciación y función de células T, células B y células NK [196]. En PBMCs de pacientes con ACG activa se ha demostrado que la expansión de las células Th1 productoras de IL-21 se correlaciona con la expansión celular de Th1 y Th17 y por consiguiente con la actividad de la enfermedad [195]. Estos datos sugieren que la IL-21 podría tener un papel crucial en la patogénesis en ACG modulando la respuesta Th1 y Th17.

La citocina IFN- γ (Th1) parece tener un papel principal en la ACG dado que su expresión se limita en gran medida a los pacientes con ACG pero no a aquellos pacientes con PMR [197]. Además la expresión de IFN- γ se correlaciona con el riesgo a desarrollar eventos isquémicos relacionados con la ACG [197]. La síntesis de IFN- γ y su liberación está inducida por las citocinas IL-12 e IL-18 producidas

por las DCs. El IFN- γ promueve el reclutamiento y la activación de los macrófagos, los cuales infiltran la pared arterial via *vasa vasorum*. El IFN- γ va a regular la diferenciación y funcionalidad de los macrófagos, la cual está íntimamente relacionada con sus localizaciones en la pared arterial. Así, los macrófagos localizados en la adventicia y a lo largo de la unión media-adventicia producen citocinas proinflamatorias tales como TNF- α , IL-1 e IL-6, promoviéndose la inflamación local y sistémica que es característica tanto de la ACG como de la PMR [198]. La IL-6 induce un aumento de los niveles de PCR y VSG, los cuales se asocian con la gravedad de la enfermedad [199]. Por otra parte, la IL-6 también tiene efectos pro-angiogénicos, que podrían contrarrestar la acción estenosante del IFN- γ . En este sentido, los niveles tisulares de ARNm de IL-6 y niveles circulantes de IL-6 se ha demostrado que son menores en pacientes con complicaciones isquémicas que aquellos que no las tienen [200].

Los macrófagos localizados en la media producen ROIs, RNIs y metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que causan daño tisular [113]. Las MMPs son enzimas proteolíticas capaces de destruir a las proteínas de la matriz celular, incluyendo a la elastina, pudiendo ser las responsables de la interrupción de la lámina elástica interna, uno de los rasgos histológicos característicos de la ACG. Las MMP-2 y MMP-9 se han detectado en arterias temporales inflamadas de pacientes con ACG [201]. Se ha visto que la máxima expresión y actividad de ambas MMPs se localiza alrededor de la lamina elástica interna, aunque sólo la MMP-9 parece contribuir a la destrucción de la lámina elástica interna [202]. Los inhibidores de MMP-2 y MMP-9, inhibidor de metaloproteinasa 2 (TIMP2) e inhibidor de metaloproteinasa 1 (TIMP1) respectivamente, también se encuentran en las arterias temporales inflamadas, pero los ratios MMP-9:TIMP-1 y MMP-2:TIMP-2 son mayores en los pacientes con ACG comparado con los individuos sanos [201].

Por otro lado, la nitración de proteínas en la que se generan RNIs ocurre en las células endoteliales que revisten los neocapilares. La liberación de ROIs da lugar a la peroxidación lipídica de los fosfolípidos de la membrana de las células del músculo liso vascular y de las células mononucleares infiltrantes, lo que contribuye a la inducción de la apoptosis de éstas células, y junto con las MMPs a la destrucción de la pared arterial[203,204].

Por último, los macrófagos localizados en la unión media-intima, junto con las células gigantes multinucleadas, una vez estimulados, pueden sintetizar factores de crecimiento como PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y VEGF implicados en la hiperplasia intimal y en la neoangiogénesis, respectivamente. Tras el daño arterial, el PDGF es capaz de estimular la migración de las células del músculo liso desde la media a la íntima. Las células localizadas en la media de arterias no inflamadas expresan bajos niveles de PDGF, sin embargo en arterias temporales de pacientes con ACG con daño tisular este factor está sobreexpresado en todas las capas excepto en la

íntima para proteger a la pared arterial [205]. Esta sobreexpresión se asocia con hiperplasia intimal y complicaciones isquémicas [206]. Otras moléculas tales como VEGF podrían también estar implicadas en la estenosis vascular. En arterias normales, el vasa vasorum está restringido a la adventicia. Sin embargo, en arterias inflamadas de pacientes con ACG se han detectado neocapilares también en la media y la íntima. Esta neovascularización se asocia con hiperplasia intimal, fragmentación de la lámina elástica interna, y producción de VEGF [207].

La patogénesis de la PMR puede ser similar a la de la ACG, pero la implicación vascular es mucho menos prominente en PMR que en ACG [113]. Las arterias temporales de pacientes con PMR sin manifestaciones clínicas de la ACG contienen citocinas derivadas de macrófagos y de células T que incluyen IL-1 e IL-2, pero no IFN- γ , incluso en ausencia de células inflamatorias [140,197]. La expresión de IFN- γ en las arterias en ACG, pero no en PMR, sugiere que es clave para el desarrollo de una vasculitis más florida y relevante clínicamente [197]. En el intersticio de los músculos de pacientes con PMR se ha detectado un aumento en los niveles de TNF, IL-1, IL-6, IL-8 [208]. Sin embargo, los estudios de imagen no han mostrado alteraciones musculares en PMR. Por lo tanto, el papel de la participación muscular en PMR sigue siendo poco claro.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS

La ACG y la PMR son dos patologías inflamatorias que afectan de forma exclusiva al individuo de edad avanzada. La ACG es una vasculitis sistémica que afecta a vasos de tamaño mediano y grande. La PMR se caracteriza por afectar a las articulaciones y estructuras periarticulares, fundamentalmente en áreas proximales, y comparte una gran cantidad de características epidemiológicas y clínicas con la ACG.

Como procesos inflamatorios crónicos que son, en la base de su etiopatogenia parece estar implicada una respuesta inmunitaria alterada, donde juegan un papel esencial tanto las células de la respuesta inmunitaria innata como adquirida. Sin embargo, el peso que tienen ambos tipos de respuesta en los dos síndromes, clínicamente relacionados, y cómo contribuyen cada una de ellas a los fenómenos inflamatorios locales y sistémicos que producen las manifestaciones clínicas de la PMR y la ACG no están ni mucho menos aclarados.

Durante muchos años las investigaciones en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento se han centrado en el papel que desempeñan las células T y B en la respuesta inmune adquirida, y aunque éstas han sido tradicionalmente consideradas como enfermedades mediadas por células T, cada vez hay más evidencias de que las células del sistema inmune innato juegan un papel muy importante en la patogénesis de estas enfermedades.

En los últimos años han adquirido relevancia nuevas células y componentes celulares así como factores solubles en la regulación de la respuesta inmune innata en la inflamación. El conocimiento de la capacidad funcional y reguladora de estas células cambia prácticamente a diario y, aún más, su implicación en la patogenia de las enfermedades mediadas por el sistema inmunitario.

En la literatura existe mucha información de cómo el envejecimiento afecta a la inmunidad adquirida. Sin embargo, el impacto del proceso de envejecimiento sobre la función del sistema inmune innato es menos claro. Dado que la inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los patógenos, junto con la comprensión de cómo el envejecimiento modifica esta defensa puede ser especialmente relevante en el estudio de las enfermedades inflamatorias restringidas a la edad, como son la PMR y la ACG.

Por todo ello, los objetivos concretos planteados en este proyecto fueron los siguientes:

1. Evaluar si existe una desregulación en las funciones efectoras de las células fagocíticas circulantes (neutrófilos y monocitos) que pueda estar implicada en la patogenésis en pacientes con ACG y PMR
2. Evaluar si la activación y/o función diferencial de los TLRs en PBMCs pueda desempeñar un papel crucial en los mecanismos patogénicos de la ACG y la PMR. Analizar la presencia de determinados polimorfismos en genes de TLRs y su posible asociación con susceptibilidad y/o gravedad en pacientes con ACG y PMR.
3. Profundizar sobre los efectos inmunomoduladores de la vitamina D en la regulación de la respuesta inmune innata en pacientes con ACG y PMR. Analizar la presencia de determinados polimorfismos en el gen del receptor de la vitamina D y su posible asociación con susceptibilidad y/o gravedad en pacientes con ACG y PMR.

III. Material y Métodos

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES

El presente estudio incluyó 97 pacientes con ACG, 268 pacientes con PMR y 128 sujetos sanos de edad y sexo similar sin una historia previa de infección crónica, neoplasia o enfermedad autoinmune. Tanto los pacientes como los controles eran de origen caucásico, de ancestros españoles y residentes en la misma área geográfica del norte de España, Cantabria. La obtención de las muestras y los estudios se realizaron tras la obtención de un consentimiento informado escrito, y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética regional.

Las principales características demográficas, clínicas y de laboratorio de las poblaciones a estudio se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1.-Datos demográficos y principales características clínicas de los pacientes con polimialgia reumática (PMR) y arteritis de células gigantes (ACG).

	Sujetos sanos	ACG	PMR
Número de pacientes	128	97	268
Edad (años, media $\pm$ DE)	74,2 $\pm$ 10,8	74,0 $\pm$ 7,5	72,6 $\pm$ 7,5
Sexo (% mujeres)	67,4	63,2	62,5
Tiempo hasta diagnóstico (meses, media $\pm$ DE)	-	2,9 $\pm$ 2,5	3,2 $\pm$ 2,5
Síntomas PMR (%)	-	45,1	100
Manifestaciones isquémicas (%)	-	51,6	0
BAT (positiva /realizada)	-	76/91	0 /73
VSG Pre-tratamiento (mm/1 hr, media $\pm$ DE)	-	88,4 $\pm$ 32,1	59,2 $\pm$ 30,5
PCR Pre-tratamiento (mg/dl, media $\pm$ DE)	0,3 $\pm$ 0,2	9,1 $\pm$ 5,6	4,7 $\pm$ 5,4

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática; DE: desviación estándar; BAT: biopsia de la arteria temporal; VSG: velocidad de sedimentación globular; PCR: proteína C reactiva.

Todos los pacientes con ACG cumplían los criterios de clasificación de la ACR de 1990 para la ACG [116]. Como se muestra en la **Tabla 1**, el 83,5% de los pacientes con ACG presentaban evidencia histológica característica de arteritis en la biopsia de la arteria temporal [209]. Los pacientes con PMR se diagnosticaron de acuerdo a los criterios propuestos por Chuang y col.[110]. También se incluyeron

en este estudio pacientes con PMR con VSG< 40mm/1h pero que cumplieran los otros criterios clínicos [210].

Las características clínicas al diagnóstico y durante el seguimiento, los valores de PCR y VSG al diagnóstico, así como la dosis inicial de prednisona, se recogieron de forma protocolizada mediante la revisión de las historias clínicas de los pacientes. Los pacientes se agruparon de acuerdo a la presencia o ausencia de síndrome polimiálgico, y a la presencia o ausencia de manifestaciones isquémicas. Las manifestaciones isquémicas se definieron como la presencia de pérdida visual, claudicación mandibular, accidentes cerebrovasculares y/o síndromes del arco aórtico [149,154]. Los pacientes con PMR también se analizaron de acuerdo a la intensidad de la respuesta de fase aguda (PMR con VSG “baja”, cuando VSG<40 mm/1h y PMR clásica cuando VSG≥40 mm/1h [211]. Para evaluar la gravedad de la enfermedad, solamente en aquellos pacientes con más de 2 años de seguimiento se incluyó el análisis de algunas variables como recidivas, duración del tratamiento con corticosteroides (CS), y dosis acumulada de prednisona [110,124,212].

Según los diferentes estudios realizados se incluyeron pacientes con enfermedad activa antes del tratamiento esteroideo (**Tabla 2**), pacientes en remisión clínica con el tratamiento, y también un pequeño subgrupo de 7 pacientes (4 con PMR y 3 con GCA) en remisión clínica completa y sin ningún tipo de CS o tratamiento inmunosupresor durante al menos 2 años.

Tabla 2.-Número de sujetos sanos y pacientes con ACG y PMR con enfermedad activa antes del tratamiento esteroideo.

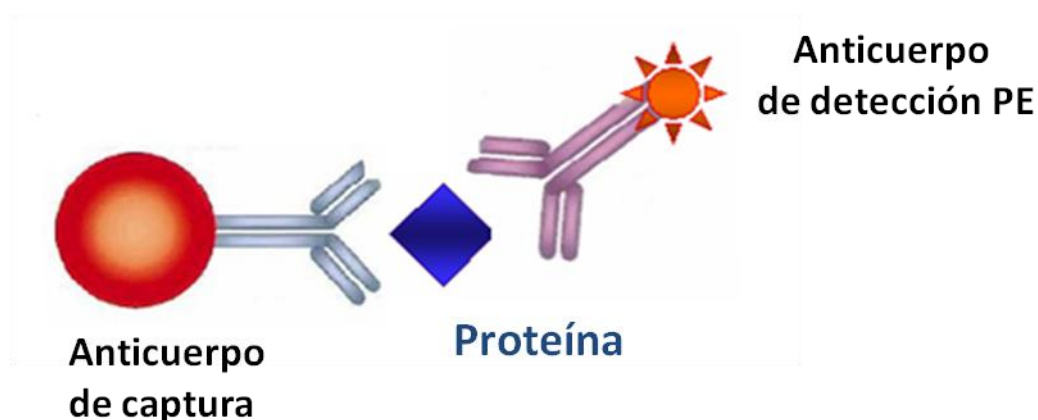
Número de pacientes	Sujetos sanos	ACG	PMR
Determinación de niveles séricos de IL-8	25	17	95
Análisis del proceso fagocítico	17	10	16
Análisis de expresión y función de TLRs	24	17	66
Genotipado de polimorfismos de TLR7	53	40	47
Estudio de estimulación de PBMCs con plasma	10	10	10
Niveles de IFN-α en sobrenadante de cultivo	9	11	15
Estudio de identificación de virus en plasma	19	17	21
Genotipado de polimorfismos de TLR4	126	72	164
Genotipado de polimorfismos de TLR9	128	97	268
Determinación de niveles séricos vitamina D	21	16	59
Genotipado de polimorfismos de VDR	126	92	264

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática; IL: interleucina; TLR: receptor tipo toll; PBMCs: células mononucleares; IFN: interferon; VDR: receptor de la vitamina D

2.- Cuantificación de la concentración de interleucina (IL-) 8 en suero mediante citometría de flujo

Para la detección de la quimiocina IL-8 se aislaron muestras de suero a partir de 2,5 ml de sangre obtenida en tubos sin aditivos de cada individuo y se almacenaron a -80°C hasta el momento del análisis. La cuantificación de IL-8 en suero se realizó usando el kit comercial *Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammation* (BD Biosciences, San Diego, CA, EE.UU).

La técnica de CBA emplea microesferas para detectar y cuantificar proteínas solubles en una determinada muestra. Cada microesfera tiene una intensidad de fluorescencia característica y está recubierta con un anticuerpo de captura específico para una determinada proteína. Para conocer la cantidad de proteína que tiene una muestra, se utiliza un anticuerpo de detección conjugado con ficoeritrina (PE) que reconocerá a la proteína en otro epítipo distinto. A mayor cantidad de proteína, mayor cantidad de anticuerpo conjugado con PE habrá y, por tanto, mayor será la intensidad en el detector que recoja la señal de PE.



Para llevar a cabo esta técnica las esferas de captura, el estándar o la muestra y el reactivo de detección conjugado con PE se incubaron juntos para formar complejos tipo sándwich. La fluorescencia producida por las microesferas fue medida en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Tras la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo, los resultados fueron analizados con el software CBA folder Excel 98 (BD Biosciences). El límite de detección para la IL-8 fue de 3,6 pg/ml.

3.- Análisis del proceso fagocítico en granulocitos neutrófilos y monocitos

El proceso fagocítico puede dividirse en varios pasos importantes: 1) un paso inicial denominado quimiotaxis que consiste en la migración de los fagocitos hacia los sitios inflamatorios, 2) adhesión de partículas a la superficie celular de los fagocitos e ingestión (fagocitosis) y 3) destrucción intracelular por mecanismos dependientes e independientes de oxígeno. Las funciones de quimiotaxis, fagocitosis y respiración oxidativa se evaluaron mediante el uso de 3 kits comerciales y se analizaron por citometría de flujo.

3.1 Cuantificación de la función quimiotáctica de granulocitos neutrófilos

La determinación cuantitativa de la quimiotaxis de neutrófilos se realizó con el kit Migratest (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Este kit permite la determinación del número de neutrófilos que migran a través de unos discos de cultivos celulares con un tamaño de poro de 3,0 μm hacia un gradiente de concentración de factores quimioatrayentes como es el N- formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Asimismo, también permite analizar el descenso de la expresión de una molécula de adhesión celular como es LECAM-1 (que se correlaciona directamente con la activación de los neutrófilos tras exposición a factores quimiotácticos), así como el cambio de forma celular que precede a la migración celular analizando los cambios producidos en la señal del forward scatter (FSC) en el citómetro de flujo.

Brevemente, los leucocitos se aislaron a partir de sangre heparinizada (heparina de sodio) mediante sedimentación espontánea sobre un medio de separación de leucocitos y se colocaron sobre insertos de cultivos celulares. La quimiotaxis se llevó cabo durante 30 min a 37°C hacia un gradiente de fMLP en comparación al control negativo de tampón de incubación. Tras el periodo de incubación, las células se colocaron en hielo para detener la migración celular. Posteriormente, las células se marcaron con un anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-LECAM-1 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) que también contiene microesferas de conteo durante 10 min en hielo. Antes de los análisis de citometría, las células se incubaron con una solución de tinción de ADN vital especial durante 5 min en hielo. Las células se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BDBiosciences) usando el láser de excitación de 488 nm y se analizaron con el software Cell Quest Pro (BD Biosciences). Los parámetros analizados para cada muestra fueron: el número de células y el valor medio de la señal FCS (**Figura 1**), así como el descenso de la expresión de la molécula de adhesión celular LECAM-1 (**Figura 2**). Los coeficientes de variación (CVs) intra-ensayo fueron 9,1% y 1,9% para el número de células y la señal FCS, respectivamente.

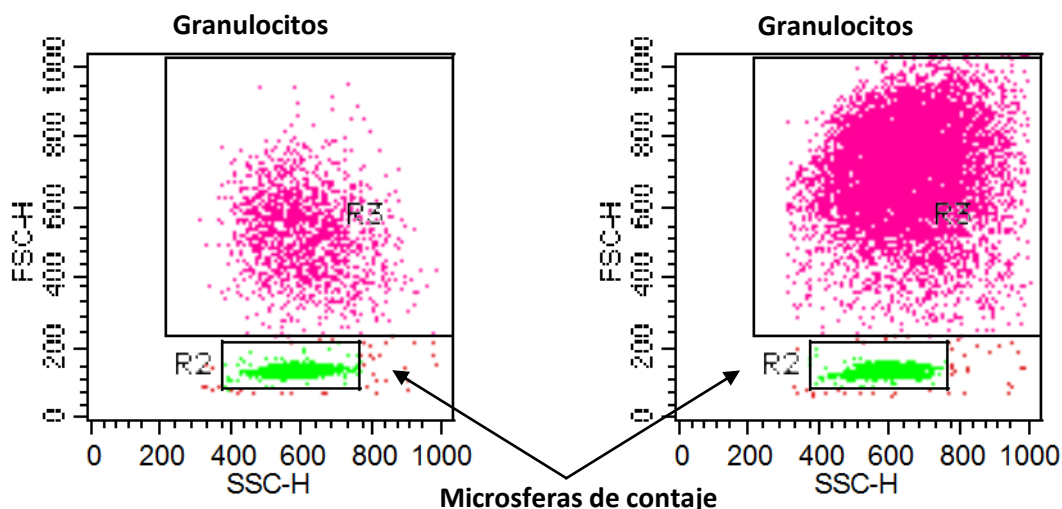


Figura 1. Análisis de la función quimiotáctica de granulocitos neutrófilos. Las figuras muestran los diagramas de puntos (SSC/FCS) seleccionados de la región de células vivas durante la adquisición y el análisis de los datos. En la región R2 se muestran las microesferas de conteaje y en la región R3 los granulocitos. La figura de la izquierda corresponde al tubo control negativo y la figura de la derecha al tubo estimulado con fMLP. Es importante apreciar el cambio de forma de los granulocitos entre ambas figuras (señal FCS).

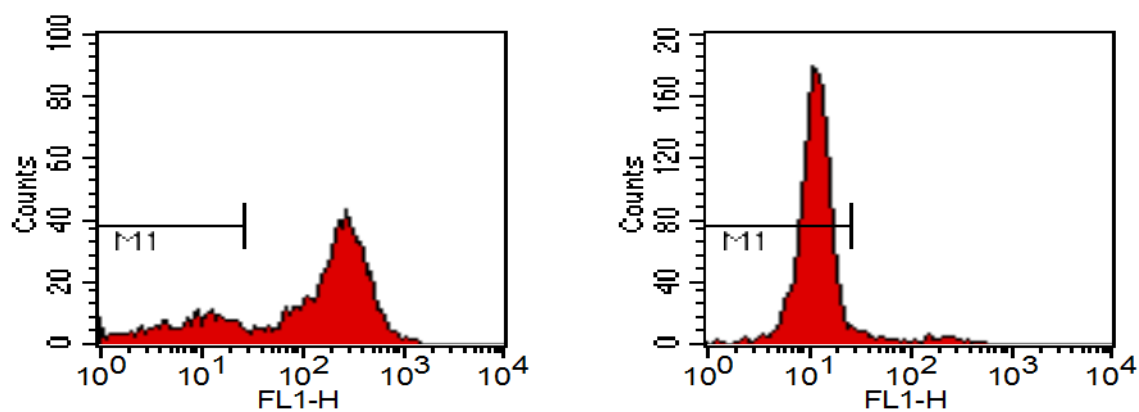


Figura 2. Análisis del descenso de la expresión de la molécula de adhesión celular LECAM-1. Las figuras muestran los histogramas en el detector FL-1 correspondientes a la expresión de LECAM-1 en granulocitos. La figura de la izquierda corresponde al tubo control negativo y la figura de la derecha al tubo estimulado con fMLP. En dichas figuras se puede observar como a medida que aumenta el porcentaje de células activadas, la expresión de LECAM-1 disminuye.

3.2 Cuantificación de la actividad fagocítica de granulocitos neutrófilos y monocitos

La determinación cuantitativa de la fagocitosis de los leucocitos (ingestión de bacterias) a partir de sangre heparinizada se llevó a cabo usando el kit Phagotest (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Este kit permite la determinación del porcentaje de monocitos y granulocitos que muestran fagocitosis en general (ingestión de una o más bacterias por célula) y su actividad fagocítica celular individual (número de bacteria por célula).

Brevemente, 100 µl de sangre heparinizada se incubaron con 2×10^7 bacterias *Escherichia coli* opsonizadas y marcadas con FITC (*E.coli*-FITC) durante 10 min a 37°C. Como control negativo, 100 µl de sangre heparinizada se incubaron con *E.coli*-FITC a 0°C para reducir el potencial fagocítico al mínimo. Tras la incubación, la reacción se detuvo colocando las muestras en hielo. La fluorescencia de las bacterias adheridas a la superficie celular fue bloqueada mediante la adición de 100 µl de solución “quenching”, permitiendo así discriminar la fluorescencia de las bacterias internalizadas. Tras dos lavados, los eritrocitos se lisaron mediante la adición de solución de lisis durante 20 min a temperatura ambiente (RT).

Antes de los análisis de citometría las células se incubaron con una solución de tinción de ADN vital especial durante 5 min en hielo que excluye la agregación de bacterias o células. Las células se adquirieron en un citometro de flujo FACSCalibur (BDBiosciences) usando el láser de excitación de 488 nm y se analizaron con el software Cell Quest Pro (BD Biosciences). Los parámetros analizados para cada muestra fueron: el porcentaje de neutrófilos y monocitos y su actividad fagocítica expresada como la intensidad de fluorescencia media (MFI; número de bacterias ingeridas por leucocito) de la señal en FL1 (**Figura 3**). Los CVs intra-ensayo fueron 0,8% y 5% para el porcentaje de neutrófilos y monocitos, respectivamente, y de 5,1% y 6,6%, para el valor de MFI en FL1.

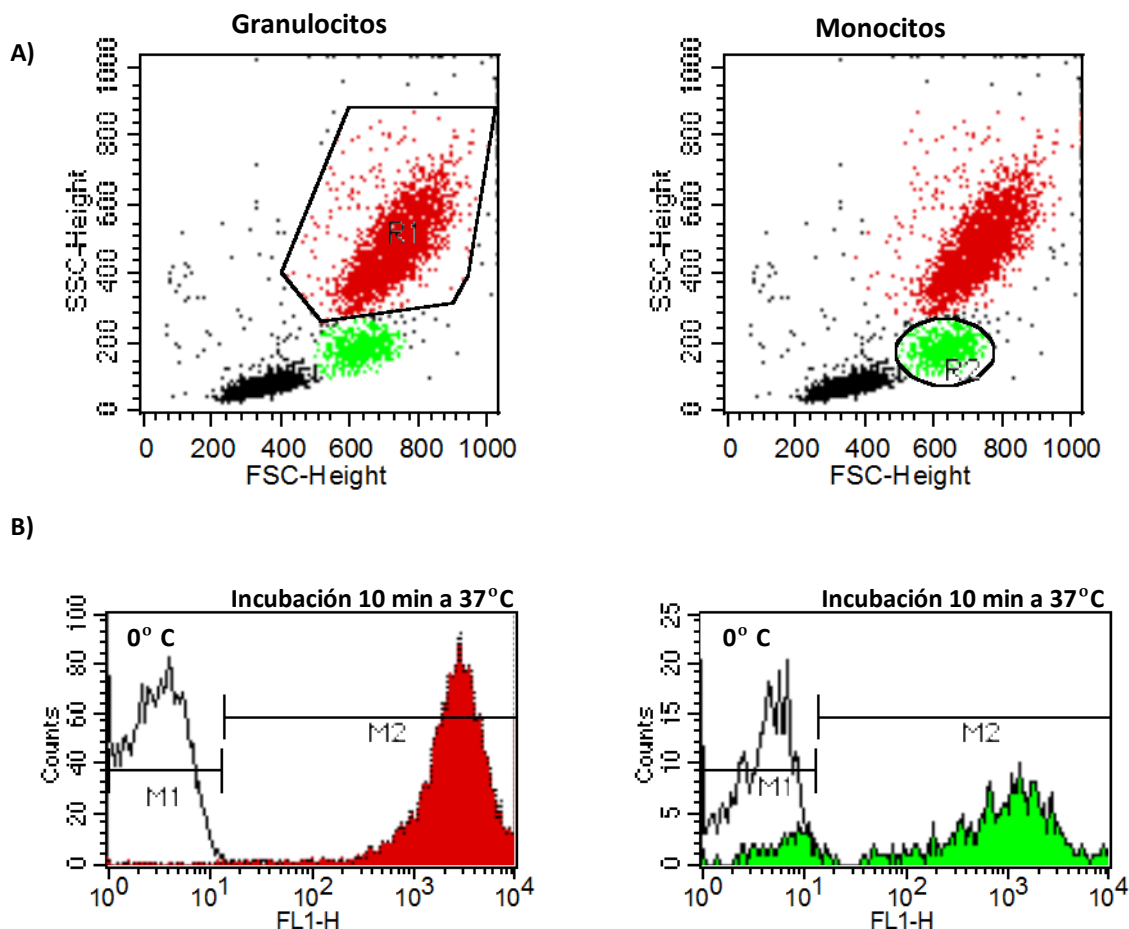


Figura 3. Análisis de la actividad fagocítica de granulocitos y monocitos. **A)** Las figuras muestran los diagramas de puntos (SSC/FCS) seleccionados para la región R1 (granulocitos) o para la región R2 (monocitos) durante la adquisición y el análisis de los datos. **B)** Las imágenes muestran los histogramas en FL-1 correspondientes a la actividad fagocítica de granulocitos (izquierda) y monocitos (derecha) evaluada como MFI tras una incubación de 10 min a 37°C con *E.coli*-FITC. A la izquierda, en cada histograma y sin colorear, se representa la intensidad de fluorescencia del control negativo que se incubó a 0°C.

3.3- Cuantificación de la actividad de respiración oxidativa de granulocitos neutrófilos y monocitos

La cuantificación de la respiración oxidativa de los leucocitos (destrucción intracelular de bacterias) a partir de sangre heparinizada se evaluó con el kit Bursttest (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Los granulocitos y los monocitos durante la respiración oxidativa producen metabolitos reactivos de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso) que destruyen las bacterias en el interior del fagosoma.

Este kit permite la determinación del porcentaje de células fagocíticas que producen reactivos oxidantes, monitorizando su formación mediante la adición y oxidación de un sustrato fluorogénico

[conversión de dihidrorrodamina (DHR)-123 a rodamina (R)-123] y su actividad enzimática (cantidad de R123 por célula).

El kit Bursttest contiene varios estímulos: bacteria *E.coli* opsonizada no conjugada como partícula de estímulo, el ligando para la proteína quinasa C, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) como estímulo fisiológico alto y el péptido quimiotáctico fMLP como estímulo fisiológico bajo.

En este protocolo, 100 µl de sangre heparinizada se incubaron con los diferentes estímulos durante 10 min en un baño a 37°C. Como control negativo, 100 µl de sangre heparinizada se incubaron sin estímulo en las mismas condiciones. Tras la activación de los leucocitos y la consiguiente formación de metabolitos reactivos de oxígeno, se añadió el sustrato fluorogénico (DHR123) y se incubó 10 min a 37°C para que se produjese el proceso de oxidación, convirtiendo a DHR123 (no fluorescente) en R123 (fluorescente). Esta reacción se detuvo por la adición de solución de lisis que se incubó 20 min a RT eliminándose así los eritrocitos. Después de una etapa de lavado con solución de lavado, se añadió una solución de tinción de ADN para excluir la agregación de bacterias y/o células.

Al igual que en los anteriores kits, las células se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCalibur (BDBiosciences) usando el laser de excitación de 488 nm y se analizaron con el software Cell Quest Pro (BD Biosciences). Los parámetros analizados para cada muestra fueron: el porcentaje de células que producen reactivos intermedios de oxígeno y su actividad enzimática expresada como el valor medio de su intensidad de fluorescencia (MFI; cantidad de sustrato fluorescente por célula) de la señal en FL1 (**Figura 4**). Los CVs intra-ensayo fueron 0,9% y 2,6% para el porcentaje de neutrófilos y monocitos oxidantes, respectivamente, y de 3,2% y 8,5% para el valor de MFI en FL1.

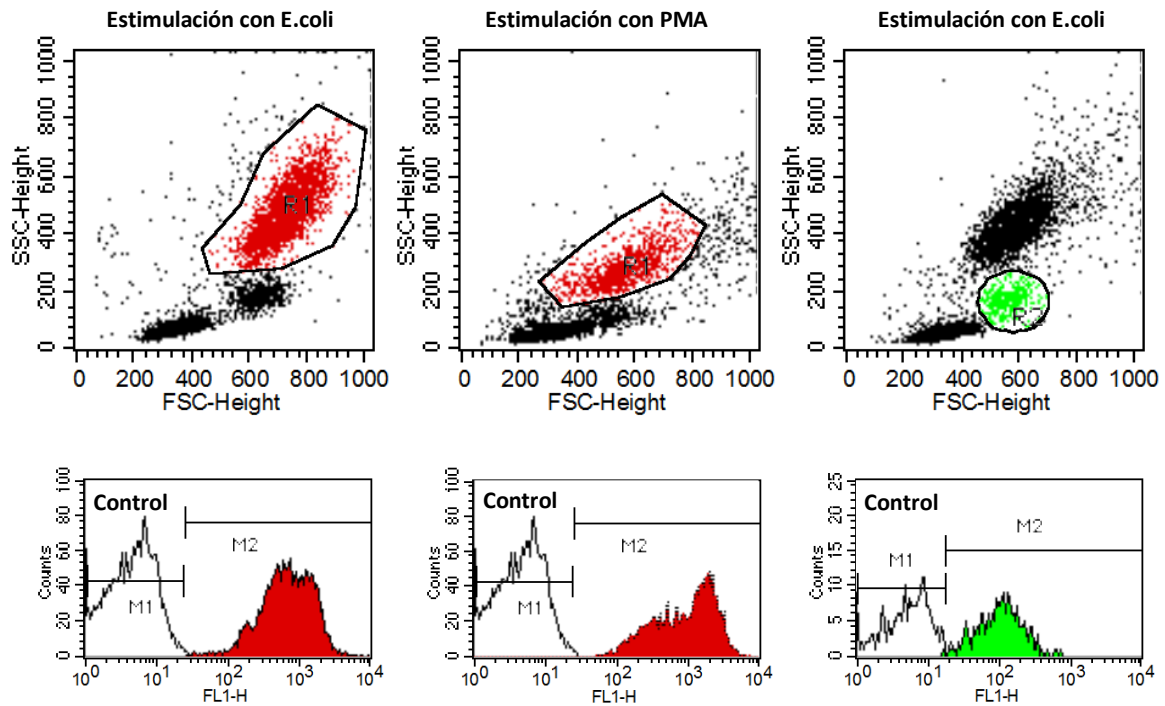


Figura 4. Análisis de la actividad enzimática de granulocitos y monocitos. A) Las figuras muestran los diagramas de puntos (SSC/FCS) seleccionados para la región R1 (granulocitos en rojo) o para la región R2 (monocitos en verde) durante la adquisición y el análisis de los datos. **B)** Se representan los histogramas en FL-1 correspondientes a la actividad enzimática de granulocitos (izquierda y centro) y monocitos (derecha), expresada como MFI tras una incubación de 10+10 min a 37°C con diferentes estímulos (E.coli y PMA). A la izquierda, en cada histograma y sin colorear, se representa la intensidad de fluorescencia del control negativo.

4.- Análisis de los Toll Like Receptors (TLRs)

El estudio de la expresión proteica y la función de TLRs incluyó 70 pacientes con PMR, 20 con ACG y 24 controles sanos de edad avanzada (HC). Ochenta y tres pacientes se estudiaron al comienzo de la enfermedad sin previo tratamiento corticosteroideo. Así mismo se estudiaron siete pacientes cuando la enfermedad estaba en completa remisión sin tratamiento durante al menos dos años.

4.1- Determinación de la expresión proteica de TLRs en PBMCs por citometría de flujo

La expresión en la superficie celular de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 Y TLR6 y la expresión intracelular de TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se evaluaron en las diferentes subpoblaciones de células mononucleares (PBMCs) (linfocitos B, linfocitos T y monocitos) a partir de sangre mediante citometría de flujo. Para ello, las células, extraídas en tubos de heparina sódica, se incubaron con AcMo: anti-CD19 humano conjugado a FITC o PE, anti-CD3 humano conjugado a Proteína-Clorofila Peridina (PerCP) y anti-CD14 humano conjugado a alofocianina (APC) (BD Biosciences) para identificar a los linfocitos B, linfocitos T y monocitos, respectivamente y con anti-TLR humano FITC o PE (TLR1, TLR2, TLR4; eBiosciences, San Diego, CA, EE:UU) o su correspondiente control de isotipo IgG2a FITC o PE de ratón, durante 20 min y en oscuridad. Posteriormente, los eritrocitos se lisaron con una solución de lisis (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU). Tras una incubación de 10 min, a RT y en oscuridad, las células se lavaron dos veces con 2ml de tampón fosfato salino (PBS) a 1500 rpm, 5' y 4°C y se resuspendieron en paraformaldehído (PFA) al 1%.

Para determinar la expresión de TLR5 Y TLR9 (Acris Antibodies, Herford, Alemania, y eBiosciences, respectivamente), los PBMCs se permeabilizaron con una solución permeabilizante (BD Biosciences) durante 10 min, a RT y en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con PBS + 10% suero fetal bovino (FBS) a 1500 rpm, 5min y 4°C y se marcaron con AcMo anti-TLRs humano conjugado a fluorocromo o su correspondiente control de isotipo IgG2a de ratón, durante 30 min a RT y en oscuridad. Tras un último lavado con PBS+10% FBS a 1500 rpm, 5min y 4°C para eliminar el exceso de Ac, las células se resuspendieron en PFA al 1%.

Para determinar la expresión de otros TLRs cuyos AcMo no están conjugados a fluorocromo, como son TLR3, TLR6, TLR7 y TLR8 (Acris Antibodies), los PBMCs se incubaron con un 2% de pool de sueros humanos para bloquear uniones inespecíficas a receptores de Fc (FcRs) durante 20 min, a 4°C y en oscuridad, y posteriormente se lavaron con PBS suplementado con 0,5% de albúmina bovina sérica (BSA). Finalmente, las células se permeabilizaron (excepto para el TLR6) y se marcaron intracelularmente con anticuerpos primarios durante 30 min, a RT y en oscuridad y seguidamente con

anticuerpos secundarios (*anti-Mouse* para el TLR3, TLR6 y TLR8 y *anti-Rabbit* para el TLR7) conjugados a FITC durante otros 30 min y en oscuridad. Por último las células se lavaron con PBS+10% FBS a 1500 rpm, 5min y 4°C, y se resuspendieron en PFA al 1% hasta su adquisición. La expresión de los TLRs se analizó mediante citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences) como MFI usando el software de análisis Cell Quest Pro (BD Biosciences). Los datos se representan como la MFI relativa (MFI de TLR / MFI de control de isotipo) (**Figura 5**).

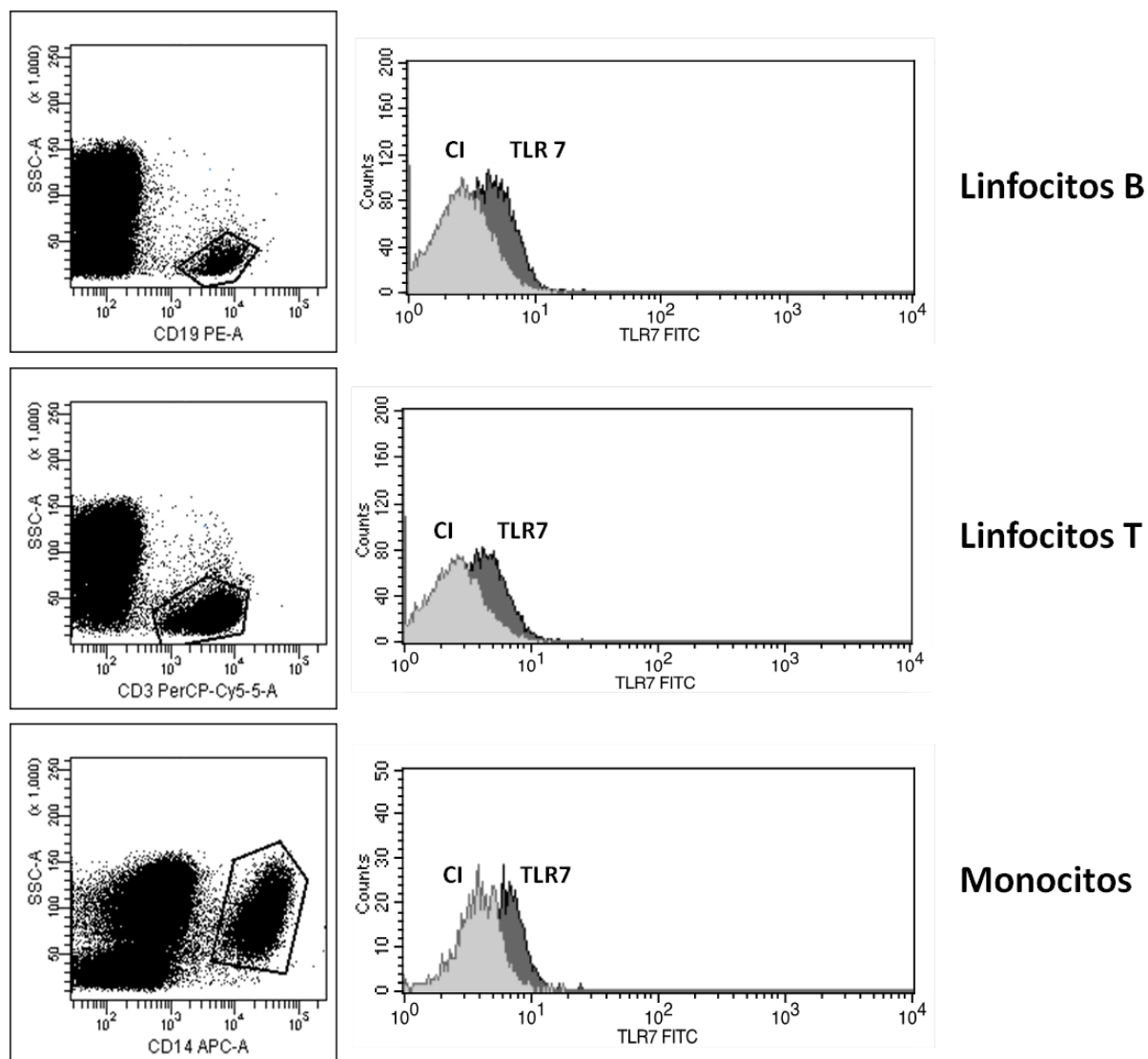


Figura 5. Análisis de la expresión de TLRs por citometría de flujo en sangre. Las imágenes de la izquierda corresponden a dot plots y muestran las diferentes subpoblaciones de PBMCs identificados a través del marcaje con AcMo conjugados a fluororocromo (anti-CD19 para los linfocitos B, anti-CD3, para los linfocitos T y anti-CD14 para los monocitos). En los histogramas de la derecha (correspondientes a cada subpoblación) se representa un ejemplo de la expresión del TLR7 y de su control de isotipo evaluada como la intensidad de fluorescencia de media.

4.2-Evaluación de la función de TLRs en monocitos circulantes mediante citometría de flujo

Para evaluar la función de los TLRs en monocitos circulantes se llevó a cabo un protocolo de marcaje de citocinas intracelulares que permite detectar la producción y acumulación de citocinas en el retículo endoplásmico tras estimulación específica de cada TLR. Para ello, las células sanguíneas extraídas en tubos de heparina sódica se estimularon policlonalmente con diferentes agonistas específicos para TLRs humanos (del TLR1 al TLR9) (Invivogen, San Diego, CA, EE.UU) (**Tabla 3**) en tubos de polipropileno durante un periodo de 18 horas, a 37°C y 5% de CO₂ (expresión de citocinas estimulada). La activación se llevó a cabo en presencia o ausencia de Brefeldina A (BFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, EE.UU) que inhibe el transporte extracelular y, así, las citocinas producidas son retenidas en el interior de las células. Como control negativo, las células se incubaron en el mismo medio de RPMI 1640 con L-Glutamina (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) sin estímulo (expresión de citocinas no estimulada o espontánea).

Tabla 3. Listado de los diferentes agonistas específicos de TLRs humanos y de las concentraciones finales empleadas en los cultivos para evaluar la función de los TLRs.

TLR	Agonista	Concentraciones finales
1/2	Pam3CSK4	0,5 µg/ml
2	HKLM	10 ⁸ células/ml
3	Poly (I:C)	10 µg/ml
4	<i>E.coli</i> K12 LPS	1 µg/ml
5	<i>S. Typhimurium</i> flagelin	1 µg/ml
6/2	FSL1	0,5 µg/ml
7	Imiquimod/Gardiquimod	1 µg/ml / 0,5 µg/ml
8	ssRNA40	1 µg/ml
9	ODN2006 (type B)	5 µM

Abreviaturas: Pam3CSK4, Pam3CysSerLys4; HKLM, heat-killed preparation of *Listeria monocytogenes*; Poly (I:C), strand of poly (I) annealed to a strand of poly (C); LPS, lipopolysaccharide; FLS1, synthetic lipoprotein (Pam2CGDPKHPKSF); ssRNA40, single-stranded RNA; ODN 2006, oligonucleotides rich in unmethylated CpG dinucleotides.

Tras el período de incubación del cultivo, las células cultivadas en presencia de BFA se marcaron con el AcMo anti-CD14 humano conjugado a FITC (BD Biosciences) para identificar a la población de monocitos durante 20 min y en oscuridad. Posteriormente, los eritrocitos se lisaron con una solución de lisis (BD Biosciences). Tras una incubación de 10 min, a RT y en oscuridad, y un lavado

con 2ml de PBS a 1500 rpm, 5 min y 4°C, los PBMCs se permeabilizaron con una solución permeabilizante (BD Biosciences) durante 10 min, a RT y en oscuridad y seguidamente se lavaron con PBS + 10% FBS a 1500 rpm, 5min y 4°C. Por último, se procedió al marcaje intracelular mediante la adición de AcMo específicos de citocinas conjugados con PE: anti-IL1 β , anti-TNF α , anti-IL6 (BD Biosciences) durante 30 min y en oscuridad, realizando un lavado final con PBS + 10% FBS a 1500 rpm, 5min y 4°C para eliminar el exceso de Ac. Una vez resuspendidas las células se adquirieron y analizaron en el citómetro de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences). El porcentaje de monocitos productores de citocinas intracelulares se analizó usando el software Cell Quest Pro (BD Biosciences). Los datos se representaron como el delta del cultivo con estímulo respecto al cultivo sin estímulo (Figura 6).

Las células cultivadas en ausencia de BFA producen citocinas que son liberadas al sobrenadante de cultivo. Estos sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -80°C para un posterior análisis y cuantificación de la concentración de citocinas mediante ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSobert Assay) y CBA.

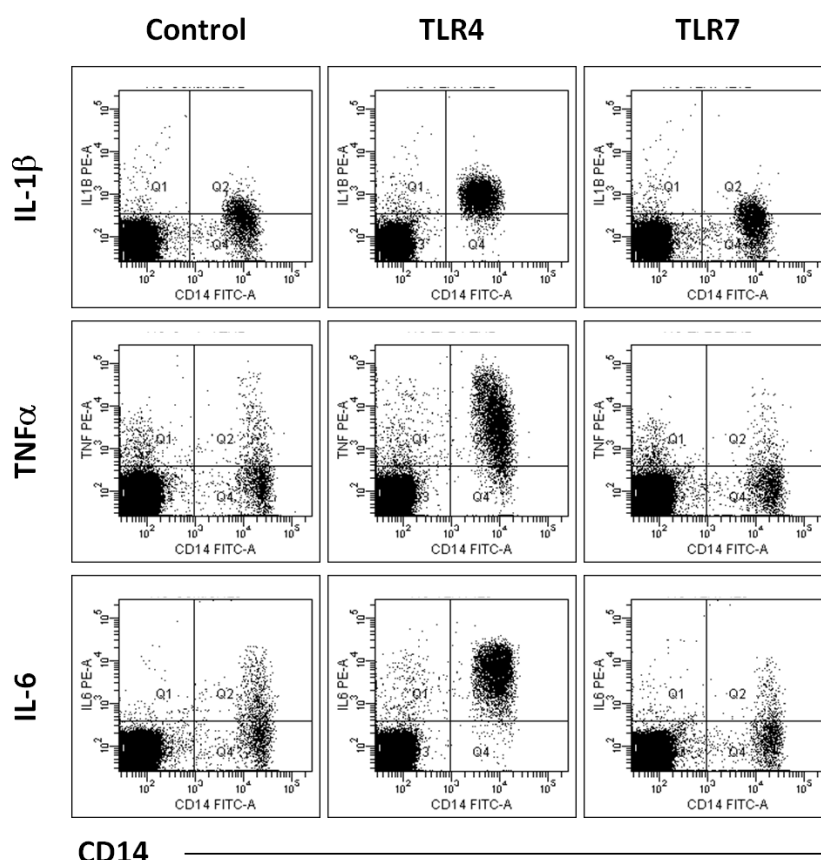


Figura 6. Evaluación de la función de los TLRs en monocitos mediante citometría de flujo. Para el análisis de la función de los TLRs se estimularon los PBMCs con ligandos específicos y se analizó el porcentaje de monocitos circulantes productores de citocinas intracelulares. Las figuras corresponden a *dot plots* y muestran la expresión de IL-1 β (superior), TNF- α (medio) e IL-6 (inferior) producidas en 3 condiciones diferentes: control sin estímulo (izquierda), estimulando al TLR4 con LPS (centro) o estimulando al TLR7 con imiquimod (derecha).

4.3- Genotipado de SNPs del TLR7 mediante Multiplex SNaPshot

La determinación de posibles sustituciones con un potencial efecto deletéreo sobre la función del TLR7 de entre los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs) hallados en la base de datos de SNPs humanos del Centro Nacional de Informacion Biotecnológica (NCBI) se realizó mediante el uso de dos métodos de predicción de sustitución de aminoácidos, tales como Polyphen y SNPs3D. Para el genotipado de los SNPs encontrados, se empleó un sistema multiplex SnaPshot (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados para el genotipo de cada SNPs se muestran en la **Tabla 4**. Las reacciones de extensión de los oligonucleótidos se analizaron mediante un analizador genético por electroforesis capilar (Applied Biosystems).

Tabla 4. Secuencia de los oligonucleótidos empleados para el genotipado de los SNPs

SNPs	Secuencia de primers (5'- 3')	Tamaño (pb)
SNP1 Gln599His (rs36076482)	5'-GAACCTAAAGGTTCTGCA-3'	18
SNP2 Ser610Cys (rs36110053)	5'-ATGAACGACAATGACATCTCTT-3'	22
SNP3 Leu634X (rs34557368)	5'-ATTCAGAGGAAATCACTTAGATGTTT-3'	26

Abreviaturas: SNP, *single nucleotide polymorphism*, Gln, glutamina; His, histamina; Ser, serina; Cys, cisteína; Leu, leucina.

4.4- Estudio de estimulación de células mononucleares (PBMCs) de un donante sano con plasma de pacientes

Los PBMCs de un donante sano (> 60 años) se obtuvieron mediante centrifugación por gradiente con Ficoll Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) a 2500 rpm, 30 min, RT y sin freno. Tras la centrifugación se recogió el anillo de PBMCs y se lavó con PBS a 1500 rpm, 10 min y 4 °C. El conteo celular se llevó a cabo con la cámara de Neubauer y solución azul tripán (Sigma Aldrich) para valorar la viabilidad de las células. Una vez resuspendidas a la concentración deseada, las células se cultivaron (2x10⁵ células/pocillo) en medio RPMI 1640 con L-Glutamina (PAA Laboratories GmbH) y 20% de plasma autólogo o heterólogo de 10 controles sanos (HC), 10 pacientes con PMR activa y 10 pacientes con ACG activa durante 24 h, en estufa a 37°C y 5% de CO₂.

En cuanto a los diferentes cultivos celulares, una parte de las células se destinó a evaluar la expresión del TLR7 (descrito anteriormente), y la otra parte de células se recogió, se lavó con PBS a

1500 rpm 10 min y 4°C y se almacenó a -80°C hasta el análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real (**Figura 7**).

PBMCs donante sano + Plasma de Controles o Pacientes.

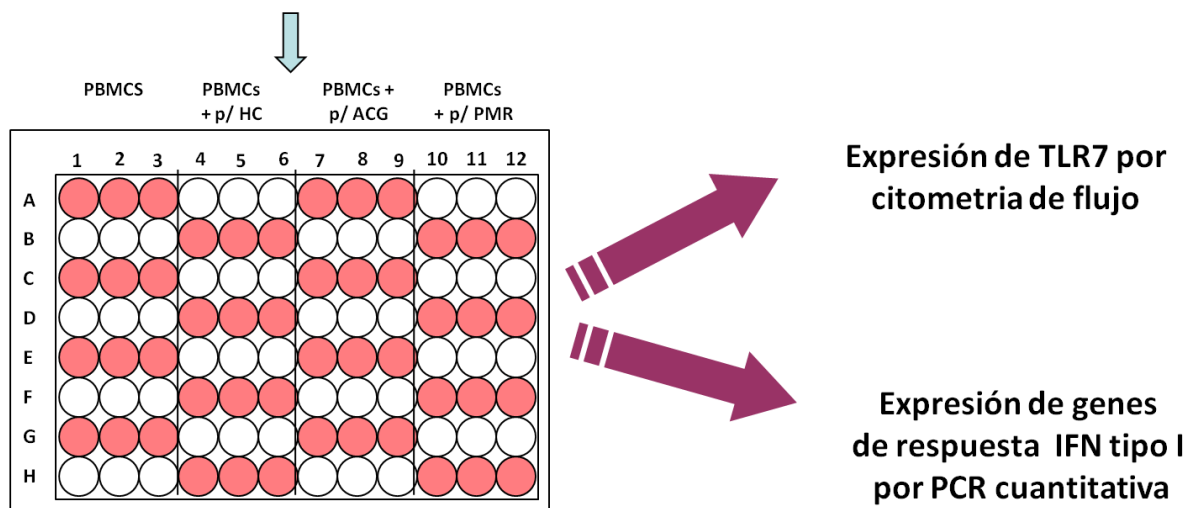


Figura 7. Estudio de estimulación de células mononucleares (PBMCs) de un donante sano con plasma de pacientes. Los PBMCs de un donante sano (> 60 años) se cultivaron (2×10^5 células/pocillo) en medio RPMI 1640 con L-Glutamina (PAA Laboratories GmbH) y 20% de plasma autólogo o heterólogo de 10 controles sanos (HC), 10 pacientes con PMR activa y 10 pacientes con ACG activa durante 24 h, en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de cultivo, una parte de las células se destinó a evaluar la expresión del TLR7, y la otra parte de células se destinó a estudios de expresión génica mediante PCR en tiempo real.

4.5- Estudio de expresión de genes implicados en las vías de señalización del interferón (IFN) por PCR cuantitativa

Los análisis de expresión génica mediante PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR) de los diferentes cultivos celulares se llevaron a cabo usando el kit *The Taqman Gene Expression Cells-to-Ct* (Applied Biosystems) y se analizaron según las instrucciones del fabricante.

Más en detalle, el primer paso consistió en la descongelación y conteo de células obtenidas de los cultivos celulares (10^5 células/ependorf). Seguidamente las células se lavaron con PBS a 4°C, y se incubaron con 50 µl de solución de lisis durante 5 min y a temperatura ambiente. Tras el periodo de incubación, se añadió 5 µl de solución de parada y se mezcló con el lisado celular para inactivar a los reactivos de la lisis y que no inhiban la retrotranscripción (RT) o PCR. Posteriormente, el ARNm liberado al lisado celular se retrotranscribió para sintetizar el ADNc usando un master mix de RT (20xRT Enzima, y 2XRT buffer) en las siguientes condiciones del termociclador: 37°C durante 60 min, y

después a 95°C durante 5 min para inactivar a la enzima retrotranscriptasa. Finalmente, el ADNc obtenido se amplificó por PCR a tiempo real usando el *Taqman Gene Expression Master Mix* y el *Taqman Gene Expression Assay* para nuestros genes de interés, en concreto, genes implicados en la vía de señalización del IFN, como son: **IFN β** , genes de respuesta a IFN (**IRF7**, *interferon regulatory factor-7*; **IFIT1**, *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1*) y genes que modulan la actividad de IFN (**USP18**, *ubiquitin specific peptidase 18*).

Brevemente, el ADNc (25ng) se mezcló por duplicado con *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) y luego se amplificó usando los primers y sondas TaqMan específicas prediseñadas para IFN β , IRF7, IFIT1 USP18 y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (**Tabla 5**). EL GAPDH se utilizó como control endógeno para la normalización. A continuación, los datos se recogieron en un sistema de PCR en tiempo de real (Applied Biosystems) y se analizaron mediante el método comparativo Ct ($\Delta\Delta C_t$) usando el programa SDS de cuantificación relativa de versión 1.3.1 (Applied Biosystems) y representando la expresión génica relativa de cada uno de los genes normalizada con respecto a la expresión génica de GAPDH.

Tabla 5. Referencias de las sondas Taqman para cada uno de nuestros genes de interés, tomadas de la librería de Applied Biosystems.

Gen de interés	Referencia Sondas TaqMan
IFN β	(Hs02621180_s1)
IRF7	(Hs00185375_m1),
IFIT1	(Hs01675197_m1),
USP18	(Hs00276441_m1)
GAPDH	(Hs99999905_m1).

Abreviaturas: IFN β , *Interferon beta*; IRF7, *Interferon regulatory factor 7*; IFIT1, *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*; USP18, *ubiquitin specific peptidase 18*; GAPDH, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa.

4.6- Detección de IFN- α soluble en sobrenadantes de cultivos celulares mediante ELISA

Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos celulares de PBMCs estimulados con agonsitas específicos de TLRs humanos (descrito anteriormente) se recogieron y se almacenaron a -80 ° C hasta su análisis. La determinación de los niveles circulantes y la liberación de IFN α en los sobrenadantes de cultivo se llevó a cabo utilizando el kit *Human IFN α 1 ELISA Ready SET GO* (eBiosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo fue de 15 pg/ml.

4.7- Estudio de identificación de virus respiratorios en plasma

Para llevar a cabo este estudio, las muestras de plasma se obtuvieron a partir de sangre obtenida en tubos de heparina de sodio de 9ml mediante centrifugación a 2500 rpm, 10 min y se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

Para identificar la presencia de posibles agentes etiológicos en pacientes con enfermedad activa, se procedió a una plataforma de RT-PCR para la detección directa de 14 virus respiratorios mediante el uso del kit *Real Accurate® Respiratory RT PCR* (Patho Finder, Maastricht, Países Bajos). Este kit consta de una combinación de 9 tests de RT-PCR que permite detectar 13 virus de ARN y 1 virus de ADN (**Tabla 6**).

Brevemente, los ácidos nucleicos se aislaron a partir de las muestras de plasmas mediante el uso de la estación de trabajo automatizada BioRobot EZ1 (Qiagen, Valencia, CA). La amplificación y detección se realizaron con un sistema de detección de secuencia Smart Cycle (Cepheid, Sunnyvale, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.

Tabla 6. Listado de virus detectados por el kit *Real Accurate® Respiratory RT PCR*.

Virus	Real Time RT-PCR , Gen de interés
Influenza A	Proteína de la matriz M1
Influenza B	Hemaglutinina
RSV A	Nucleocápsida principal
RSV B	Nucleocápsida principal
Parainfluenza 1	Glicoproteína de fusión
Parainfluenza 2	Hemaglutinina-neuroamidasa
Parainfluenza 3	Hemaglutinina-neuroamidasa
Parainfluenza 4	Hemaglutinina-neuroamidasa
Coronavirus 229e	Nucleocápsida
Coronavirus OC43	Nucleocápsida
Rinovirus-Enterovirus	5'UTR
hMPV	Nucleocápsida
Adenovirus	Hexon

Abreviaturas: RSV, virus respiratorio sincitial; hMPV, metapneumovirus humano; UTR, *Untranslated region*

4.8- Genotipado de los polimorfismos del gen del TLR4 y TLR9

4.8.1.-Extracción de ADN genómico mediante el método de DNAzol

La extracción del ADN genómico se realizó a partir de sangre obtenida en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) mediante el método de DNAzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU) y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Detalladamente, en un falcon de 50ml, unos 5ml de sangre anticoagulada con EDTA se mezclaron con solución de lisis 1X de DNA (Tris 1M+MgCl₂ 1M) para destruir a los eritrocitos dejando actuar 40 min a RT, tras los cuales las muestras se centrifugaron a 2500 rpm, 10min y 4°C. Dependiendo de si el *pellet* estaba aún hemático o no, se procedió a otro nuevo paso de lisis hasta eliminar la contaminación por hematíes. Tras la última centrifugación de la lisis, las células se lavaron con PBS a 1500 rpm, 10 min y 4°C., se descartó el sobrenadante y se añadieron sobre el pellet 500µl de DNAzol (1-5 x 10⁶ células) pipeteando cuidadosamente hasta homogenizar la muestra. Para la precipitación del ADN, a este homogenizado se le añadió 1 ml de etanol al 100% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), mezclando por inversión y dejando actuar 2-3 min a RT. Una vez formado el precipitado de ADN, para su lavado éste se transfirió a un criotubo que contenía 1 ml de etanol frío al 75%, mezclando por inversión de 3-6 veces, centrifugando de nuevo a 13000 rpm 10 min y 4°C y dejando secar al aire, eliminándose así completamente el etanol. Posteriormente, el ADN se solubilizó en 300 µl de Tris-EDTA (Tris 1M+ EDTA 0,5M) y su concentración se determinó midiendo la densidad óptica a 260 nm con un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE.UU). Finalmente, las muestras de ADN genómico se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

4.8.2.-Genotipificación de los polimorfismos del TLR4

El estudio de los polimorfismo del gen del TLR4 se llevó a cabo con las muestras de ADN genómico extraídas tal y como se ha explicado en el apartado **4.8.1**. Este estudio incluyó a 172 pacientes con PMR, 73 pacientes con ACG y 126 controles sanos de edad y sexo similar.

Los polimorfismos del gen del TLR4, [**TLR4Asp299Gly (+896 A/G; rs4986790)** y **TLR4 Thr399Ile (+1196 C/T; rs4986791)**], se genotiparon mediante análisis de PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) con los oligonucleótidos descritos por Lorenz y col. [213]. Las secuencias de los oligonucleótidos *forward* para ambos polimorfismos (TLR4Asp299Gly y TLR4Thr399Ile) fueron alteradas, de forma específica, para generar un sitio de restricción para las enzimas de restricción *NcoI* y *HinfI*, respectivamente. Brevemente, las

amplificaciones por PCR del ADN genómico se realizaron en una reacción de volumen final de 25 μ l que contenía 200 μ M de dNTP (desoxirribonucleótido tri-fosfato) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), 1 pmol/ μ l de cada oligonucleótido (Thermo Scientific, Ulm, Alemania), Buffer 10x de PCR, 2mM (2mmol/l) de $MgCl_2$ y 2 U de Taq Polimerasa (Promega, Madison, WI, EE.UU).

Las secuencias específicas de los oligonucleótidos y las diferentes condiciones de PCR para TLR4Asp299Gly y TLR4Thr399Ile se muestran en la **Tabla 7**. Las reacciones de PCR se desarrollaron en un termociclador MasterCycler Pro S (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con el siguiente protocolo general de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación (ver tabla), extensión a 72°C durante 30s e incubación final a 72°C durante 5 min. Las amplificaciones de PCR dieron lugar a un fragmento de 249 pares de bases (pb) y a un fragmento de 406 pb para el TLR4Asp299Gly y el TLR4Thr399Ile, respectivamente.

Tabla 7. Secuencias específicas de los oligonucleótidos y diferentes condiciones utilizadas en la PCR-RFLP para identificar los polimorfismos en el gen del TLR4.

Polimorfismos TLR4	Secuencia de primers (5' - 3')	Condiciones hibridación	ER	Fragmentos (pb)
<i>TLR4 Asp299Gly</i> (+896 A/G; rs4986790)	F-5'GATTAGCATACTTAGACTACTACCTCCATG3' R- 5'GATCAACTTCTGAAACATTCCCAC3'	55°C, 30s	<i>NcoI</i>	A: 249 G: 223 y 26
<i>TLR4 Thr399Ile</i> (+1196 C/T; rs4986791)	F-5'GGTTGCTGTTCTCAAAGTGATTTGGGAGAA3' R-5'ACCTGAAGACTGGAGAGTGAGTTAAATGCT3'	66°C, 30s	<i>HinfI</i>	C: 406 T: 377 y 29

Abreviaturas: ER, Enzima de restricción; pb, pares de bases; rs, secuencia de referencia.

Los productos de PCR se digirieron durante toda la noche a 37° C mediante el uso de enzimas de restricción *NcoI* y *HinfI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) y posteriormente se sometieron a una electroforesis (RunOne Embi Tec; San Diego, CA, EE.UU) en un gel de agarosa (Pronadisa-Conda, Madrid, España) al 3% teñido con bromuro de etidio y en presencia de un marcador de peso molecular (Invitrogen) para poder identificar el tamaño de los fragmentos de ADN. Finalmente, los geles se sometieron a radiación ultravioleta (UV) en un equipo documentador de imágenes (Gel Doc XR, Bio Rad Laboratories, EE.UU) observándose las bandas correspondientes a cada muestra (**Figura 8**).

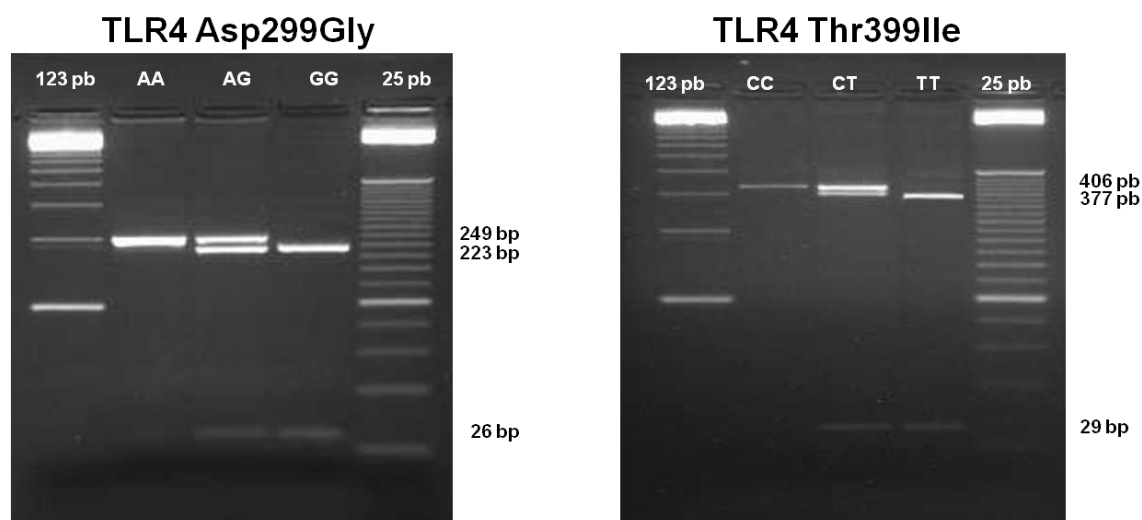


Figura 8. Fragmentos de ADN obtenidos para los polimorfismos del gen de TLR4. Los fragmentos obtenidos para los diferentes alelos del polimorfismo TLR4Asp299Gly fueron un único fragmento de 249pb para el alelo *wild type* y dos fragmentos de 223pb y 26pb para el homocigoto mutante; y para el polimorfismo TLR4Thr399Ile fueron un único fragmento de 406pb para el alelo *wild type*, y dos fragmentos de 377pb y 29pb para el homocigoto mutante.

Para mejorar la calidad de la genotipificación, todas las muestras mutantes y heterocigotas fueron re-genotipadas utilizando un método doble ciego, y los resultados se expresaron sólo para aquellas muestras que fueron reproducibles sin ninguna discrepancia.

4.8.3.-Genotipado de los polimorfismos del TLR9

Al igual que en el estudio anterior, el estudio de los polimorfismo del gen del TLR9 se llevó a cabo con muestras de ADN genómico de 268 pacientes con PMR, 97 pacientes con ACG y 126 controles sanos de edad y sexo similar.

Los polimorfismos del gen del TLR9 [TLR9 -1486 T>C (rs187084) y TLR9 -1237 T>C (rs5743836)], se genotiparon mediante análisis de PCR-RFLP con los oligonucleótidos descritos por Hamman y col. [214].

Brevemente, las amplificaciones por PCR del ADN genómico se realizaron en una reacción de volumen final de 30 µl que contenía 166µM de dNTP (GE Healthcare), 1 pmol/µl de cada oligonucleótido (Thermo Scientific), Buffer 10x de PCR, 2mM (2mmol/l) de MgCl₂ y 1 U de Taq Polimerasa (Promega) o 2 U de Taq Polimerasa (New England Biolabs), respectivamente,

Las secuencias específicas de los oligonucleótidos y las diferentes condiciones de PCR para TLR9 (-1486 T>C) y TLR9 (-1237 T>C) se muestran en la **Tabla 8**. Las reacciones de PCR se desarrollaron en un termociclador MasterCycler Pro S con el siguiente protocolo general de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 95°C

durante 30 s, hibridación (ver tabla), extensión a 72°C durante 30s e incubación final a 72°C durante 5 min. Las amplificaciones de PCR dieron lugar a un fragmento de 499 pb y un fragmento de 135 pb para el TLR9 T-1486C y TLR9 T-1237C, respectivamente.

Tabla 8. Secuencias de los diferentes oligonucleótidos y condiciones utilizadas en la PCR para identificar los polimorfismos en el gen del TLR9.

Polimorfismos TLR9	Secuencia de primers (5'- 3')	Condiciones hibridación	ER	Fragmentos (pb)
<i>TLR9 (-1237 T>C)</i> (rs5743836)	F- 5'ATGGGAGCAGAGACATAATGGA3' R- 5'CTGCTTGCACTTGACTGTGT3'	61°C, 30s	<i>BstNI</i>	T: 108 C: 60,48 y 27
<i>TLR4 (-1486 T>C)</i> (rs187084)	F- 5'TCCCAGCAGCAACAATTCATTA3' R- 5'CTGCTTGCACTTGACTGTGT3'	57°C, 20s	<i>AflII</i>	C: 499 T: 327 y 172

Abreviaturas: ER, Enzima de restricción; pb, pares de bases; rs, secuencia de referencia.

Los productos de PCR se digirieron mediante el uso de enzimas de restricción *AflII* y *BstNI* (New England Biolabs) bien durante toda la noche a 37° C o durante 3 horas a 61,6°C, respectivamente y posteriormente se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 4% teñido con bromuro de etidio y en presencia de un marcador de peso molecular (Invitrogen) para poder identificar el tamaño de los fragmentos de ADN. Finalmente, los geles se sometieron a radiación UV en un equipo documentador de imágenes (Gel Doc XR) observándose las bandas correspondientes a cada muestra (Figura 9).

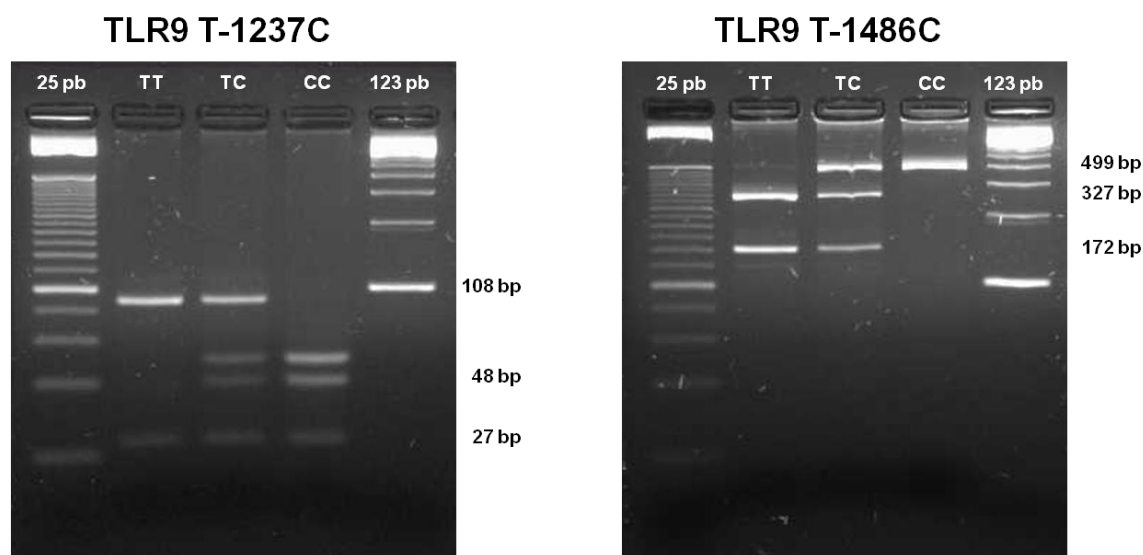


Figura 9. Fragmentos de ADN obtenidos para los polimorfismos del gen de TLR9. Los fragmentos obtenidos para los diferentes alelos del polimorfismo TLR9 T-1327C fueron dos fragmentos de 108pb y 27pb para el alelo *wild type* y tres fragmentos de 60pb, 48pb y 27pb para el homocigoto mutante; y para el polimorfismo TLR9 T-1486C fueron dos fragmentos de 327pb y 172pb para el alelo *wild type*, y un único fragmento de 499pb para el homocigoto mutante.

5.- Análisis de la vitamina D

5.1- Determinación de los niveles circulantes de 25 hidroxivitamina D y de la hormona paratiroidea

Los niveles séricos de la 25 hidroxivitamina D (25-(OH)D₃) y la hormona paratiroidea (PTH) se midieron en 96 individuos que incluyen 59 pacientes con PMR activa, 16 pacientes con ACG activa y 21 controles sanos de edad avanzada (> 60 años). La determinación se llevó a cabo en muestras de suero aisladas a partir de sangre obtenida en tubos sin aditivos y almacenadas a -80°C hasta su análisis.

Los niveles de PTH total intacta se midieron mediante ensayos de inmunoquimioluminiscencia automatizados (LIAISON, DiaSorin, Stillwater, MN, EE.UU.). La sensibilidad del ensayo para PTH fue de 1pg/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 2,6% y 5,8%, respectivamente. Los valores normales son < 65pg/ml.

Los niveles de 25-(OH)D₃ se cuantificaron mediante radioinmunoensayo (RIA) tras la extracción (DiaSorin). La concentración mínima detectable se estimó como 1,5ng/ml. Los CVs intra- e inter- ensayo fueron 9,4% y 10,8%, respectivamente. Los rangos de referencia de los valores normales para 25-OHD son 20-60 ng/ml.

5.2- Determinación de los niveles circulantes de catelicidina

Los niveles de catelicidina (LL-37) se midieron mediante ensayos de ELISA tipo sándwich con el kit *human LL-37 ELISA* (Hycult Biotech, Uden, Países Bajos) según las instrucciones del fabricante. La sensibilidad del ensayo para LL-37 fue de 0,1ng/ml. Los CVs intra- e inter-ensayo fueron 6% y 6,2%, respectivamente.

5.3- Genotipado de los polimorfismos del receptor de la vitamina D (*FokI*, *BsmI*, *Apal*, *TaqI*)

El ADN genómico se extrajo tal y como se ha explicado anteriormente en el apartado 4.8.1. El presente estudio incluyó a 264 pacientes con PMR, 92 pacientes con ACG y 126 controles sanos de edad y sexo similar.

La determinación del genotipo de los genes del VDR, como son ***FokI* T/C (db SNP ID rs10735810)**, ***BsmI* G/A (db SNP ID rs1544410)**, ***Apal* C/A (db SNP ID rs7975232)** y ***TaqI* T/C (db SNP ID rs731236)** se llevó a cabo mediante la técnica de PCR-RFLP con los oligonucleótidos descritos por Vupputuri y col.[215]. Las condiciones de genotipado y las secuencias de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los polimorfismos *FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI* se describen en la **Tabla 9**. Los protocolos de amplificación y digestión llevados a cabo fueron similares a los descritos anteriormente en el apartado de los polimorfismos de TLRs.

Tabla 9: Condiciones de genotipado y secuencias de los primers de los genes de VDR estudiados.

Polimorfismos VDR	Secuencia de primers (5'- 3')	Condiciones hibridación	ER	Alelos	Fragmentos (pb)
<i>FokI</i> T>C (rs10735810)	F- 5'ATGGAAACACCTTGCTTCTTCCCTC3' R- 5'AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCTCT3'	63,4°C, 60s	<i>FokI</i>	f=T F=C	196 y 69 265
<i>BsmI</i> G>A (rs1544410)	F- 5'AACCAGCGGAAGAGGTCAAGGG3' R-5'CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA3'	61,6°C, 60s	<i>BsmI</i>	b=G B=A	650 y 172 822
<i>Apal</i> C>A (rs7975232)	F- 5'CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG3' R- 5'GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTCA3'	67,5°C, 60s	<i>Apal</i>	a=C A=A	515 y 225 740
<i>TaqI</i> T>C (rs731236)	F- 5'CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG3' R- 5'GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTCA3'	67,5°C, 60s	<i>TaqI</i>	T=T t=C	495 y 245 290, 245 y 205

Abreviaturas: VDR, Receptor de la vitamina D; ER: Enzima de restricción; pb, pares de bases; rs, secuencia de referencia.

Los productos de PCR se digirieron mediante el uso de enzimas de restricción y posteriormente se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 4%. Los genotipos del gen VDR de cada individuo se identificaron de acuerdo con el patrón de digestión y los alelos según la presencia de los sitios polimórficos para las enzimas de restricción *FokI*, *BsmI*, *Apal* y *TaqI* respectivamente (**Figura 10**).

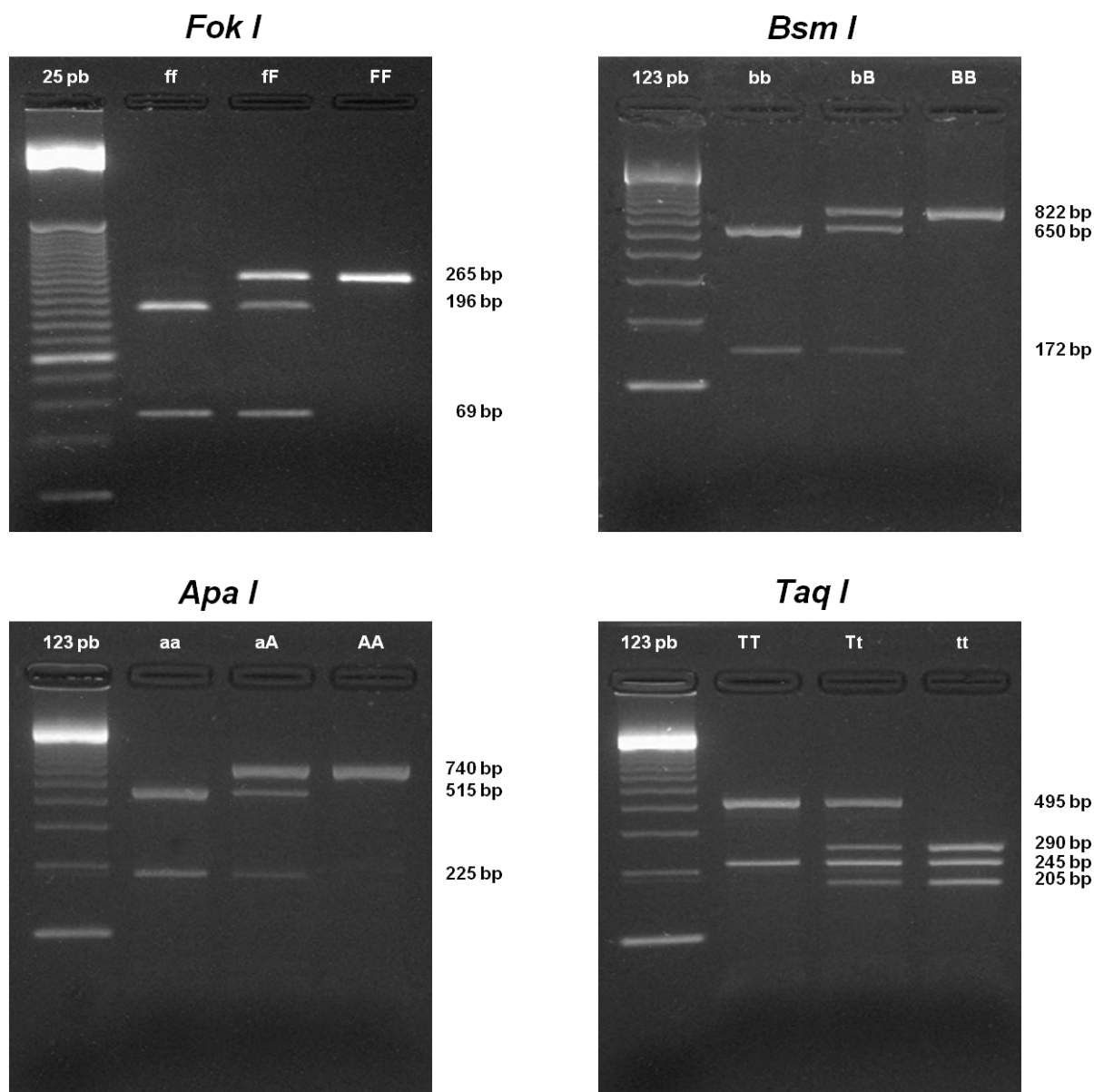


Figura 10. Fragmentos de ADN obtenidos para los polimorfismos del gen VDR.

El polimorfismo **FokI** consiste en un cambio de T por C (T=f) situado en el primer codón de inicio potencial (ATG). Los fragmentos obtenidos para los diferentes alelos fueron dos fragmentos de 196 pb y 69 pb para el alelo *wild type* y un fragmento de 265 pb para el homocigoto mutante.

El polimorfismo **BsmI** se produce por la sustitución de G por A (G = b). Los fragmentos obtenidos para los diferentes alelos fueron dos fragmentos de 650 pb y 172 pb para el alelo *wild type* y un fragmento de 822 pb para el homocigoto mutante.

El polimorfismo **ApaI** resulta de la sustitución de C por A (C = a). Los fragmentos obtenidos para los diferentes alelos fueron dos fragmentos de 515 pb y 225 pb para el alelo *wild type* y un fragmento de 740 pb para el homocigoto mutante.

El polimorfismo **TaqI** consiste en la sustitución de T por C (T = T). Los fragmentos obtenidos para los diferentes alelos fueron dos fragmentos de 495 pb y 245 pb para el alelo *wild type* y tres fragmentos de 290 pb, 245 pb y 205 pb para el homocigoto mutante.

6.- Análisis Estadístico

En general, el análisis estadístico de los datos se realizó mediante el programa de análisis estadístico SPSS 12.0 y SPSS 15.0 (Chicago, IL, EE.UU). Las comparaciones estadísticas de los datos entre las diferentes patologías y los controles se llevaron a cabo mediante los tests paramétricos t de Student y los tests no paramétricos U de Mann Whitney y Kruskal Wallis, según la distribución de la variable. Las diferencias entre los pacientes pre- y post-tratamiento se analizaron con el test de Wilcoxon. La relación entre las diferentes variables del estudio se determinó calculando el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman según fuesen variables paramétricas o no paramétricas, respectivamente. En cuanto a las frecuencias alélicas y genotípicas de los genes estudiados, los niveles de significación se compararon mediante tablas de contingencia y el test Chi-cuadrado. Para los estudios de asociación de los alelos o genotipos con la enfermedad y fenotipos de enfermedad se estimaron los odds ratios (OR) y los intervalos de confianza (IC) del 95%. La determinación del equilibrio Hardy-Weinberg y los análisis de los haplotipos se realizaron con el programa informático Arlequin v3.5. La potencia estadística se calculó usando el programa Granmo versión v7.12. Las diferencias se consideraron no significativas cuando $p \geq 0,05$, significativas cuando $p < 0,05$, muy significativas si $p < 0,01$ y altamente significativas cuando $p < 0,001$.

El meta-análisis se llevó a cabo mediante el estudio de modelos de efectos aleatorios combinados y se revisó según el examen visual para una posible asimetría en los gráficos *funnel* y el test de Egger. Los análisis de heterogeneidad se realizaron con el test estadístico Q de Cochran y la estadística I^2 . El meta-análisis acumulativo se desarrolló agrupando los estudios según orden cronológico de publicación. Los OR combinados y los IC del 95% asociados se obtuvieron usando un modelo de efectos aleatorios de DerSimonian y Laird. Las estadísticas se calcularon utilizando el programa Integral Meta-análisis, versión 2.0 (Biostat, Englewood, NJ, EE.UU.).

IV. Resultados

IV. RESULTADOS

Las enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento han sido tradicionalmente consideradas como enfermedades mediadas por células T. Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que las células del sistema inmune innato también pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis de estas enfermedades. Por otro lado, el proceso de inmunosenescencia describe una serie de alteraciones de la inmunidad innata y adquirida. Como consecuencia, los individuos de edad avanzada muestran un estado de inflamación crónica, una alteración de la respuesta frente a patógenos, una disminución en la respuesta frente a vacunas y un aumento en la susceptibilidad frente a neoplasias, infecciones y autoinmunidad.

Dado que esta tesis doctoral se centra en las enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento, nuestro equipo previamente analizó la influencia de la edad sobre diversos parámetros comparando individuos sanos jóvenes (< 30 años) con individuos sanos de edad avanzada (> 60 años).

1. Los pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento presentan un aumento en los niveles séricos de IL-8 durante la fase activa de la enfermedad

Puesto que la PMR y la ACG son enfermedades inflamatorias vasculares, donde se ha demostrado que existe una extravasación celular hacia el foco inflamatorio, lo primero que nos propusimos fue analizar diversos marcadores que tienen relación con esta migración celular como es la IL-8 (quimiocina inflamatoria que actúa como un potente factor quimiotáctico de los neutrófilos).

Los niveles circulantes de IL-8 se estudiaron en pacientes con enfermedad activa antes del tratamiento esteroideo, en pacientes en remisión clínica con el tratamiento y también en un pequeño subgrupo de pacientes con PMR y ACG en remisión clínica completa y sin ningún tipo de CS o tratamiento inmunosupresor y se compararon con individuos sanos pareados para edad y sexo.

Los resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que los niveles circulantes de IL-8 son similares entre individuos sanos jóvenes y ancianos (**Figura 1**).

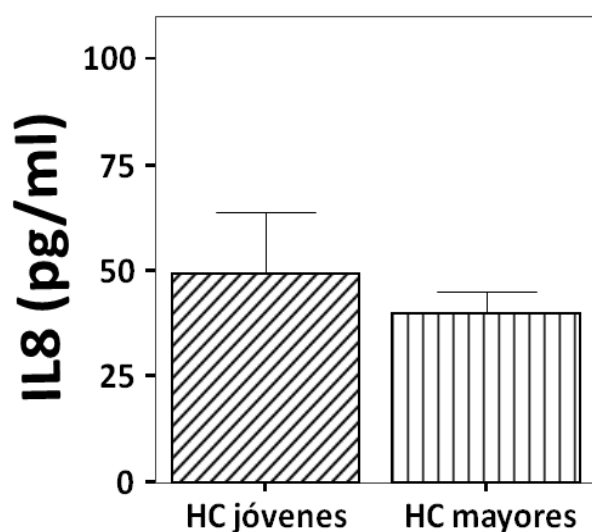


Figura 1.- Niveles séricos de IL-8 en individuos sanos (HC) jóvenes (<30 años) y mayores (>60 años).

En la gráfica se muestran los niveles de IL-8 en suero cuantificados mediante citometría de flujo con el Kit Cytometric Bead Array. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

En la **Figura 2** se muestra como los pacientes con enfermedad activa presentaron un aumento en los niveles circulantes de IL-8 en comparación con los HC, aunque los pacientes con ACG no alcanzaron la significación estadística, probablemente debido al número de pacientes estudiados. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los niveles séricos de IL-8 entre ambas patologías.

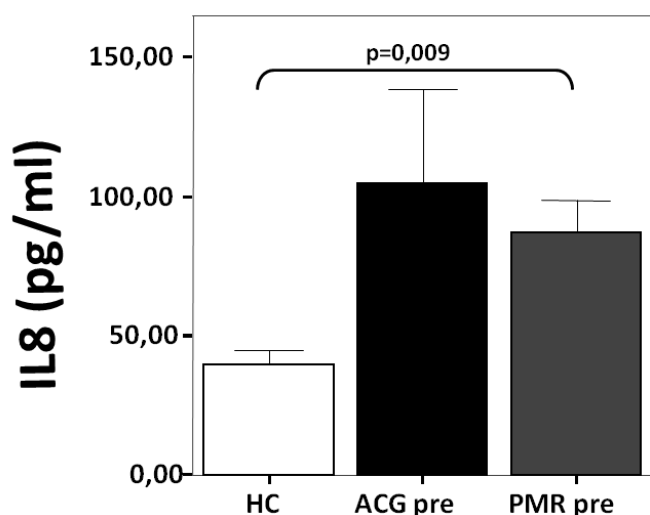


Figura 2.- Niveles séricos de IL-8 en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento.

En la gráfica se muestran los niveles de IL-8 en suero cuantificados mediante citometría de flujo con el Kit Cytometric Bead Array en controles sanos y pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

Cuando analizamos la influencia del tratamiento esteroideo en ambas enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento lo que observamos fue que los niveles circulantes de IL-8 se mantuvieron elevados en pacientes con PMR a pesar del control de la enfermedad con el tratamiento, y también en el caso de la PMR después de la remisión completa de la enfermedad. Sin embargo, en el caso de la ACG, los niveles circulantes de IL-8 disminuyeron tras el tratamiento con altas dosis de CS y permanecieron dentro del rango normal en pacientes en remisión completa sin tratamiento (**Figura 3**).

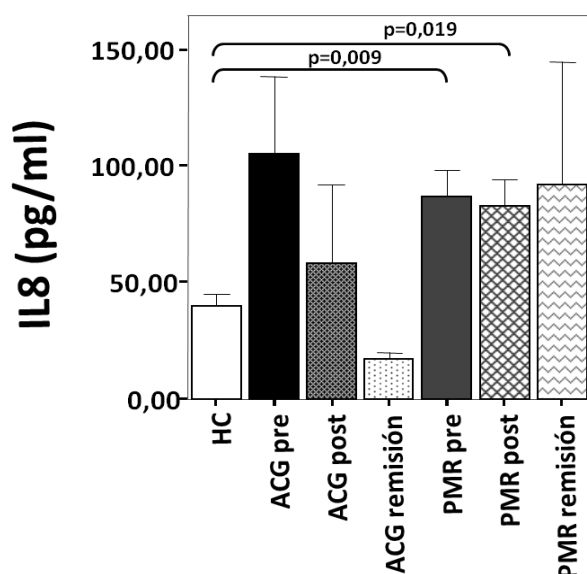


Figure 3- Niveles séricos de IL-8 en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas a la edad en fase activa (pre), en remisión clínica bajo tratamiento (post), y en remisión completa sin tratamiento (remisión).

El efecto del tratamiento con CS se analizó en pacientes con ACG y con PMR en remisión clínica tras una media de duración del tratamiento de 4 semanas. Siete pacientes (3 con ACG y 4 con PMR) se estudiaron en remisión completa sin tratamiento durante al menos dos años. Los datos se representan como la media $\pm$ DE de los niveles séricos de IL-8. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

A pesar de que la IL-8 es una de las principales quimiocinas implicadas en la migración celular, no encontramos ninguna correlación entre los niveles circulantes de IL-8 y la capacidad de migración de las células de la inmunidad innata o con la expresión de los marcadores de activación-adhesión en pacientes y en controles sanos (datos no mostrados).

En resumen, estos resultados sugieren que la IL-8 podría desempeñar un papel en el proceso inflamatorio en la PMR y la ACG, aunque los niveles de IL-8 no permiten distinguir entre ambas patologías.

2. Alteración de la función fagocítica en las enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento

Como se ha comentado en la introducción, la fagocitosis mediada por neutrófilos polimorfonucleares y monocitos constituye una de las principales defensas del organismo frente a las infecciones producidas por bacterias y/o hongos. Debido a la creciente importancia que ha adquirido la función inmune innata en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento y dado que existen muy pocos datos que muestren un impacto de la función fagocítica en estas patologías, nos planteamos profundizar en la comprensión del proceso fagocítico estudiando sus diferentes etapas en pacientes con enfermedad activa antes del tratamiento esteroideo, en pacientes en remisión clínica con el tratamiento y también en un pequeño subgrupo de pacientes con PMR y ACG en remisión clínica completa y sin ningún tipo de CS o tratamiento inmunosupresor y se compararon con individuos sanos pareados para edad y sexo.

Respecto a nuestros resultados previos sobre la influencia de la edad en el proceso fagocítico, los granulocitos de individuos de edad avanzada tienen una mayor capacidad para migrar que los granulocitos de individuos jóvenes. Sin embargo, la capacidad fagocítica y la respiración oxidativa son muy similares entre ambos grupos de edad (**Figura 4**).

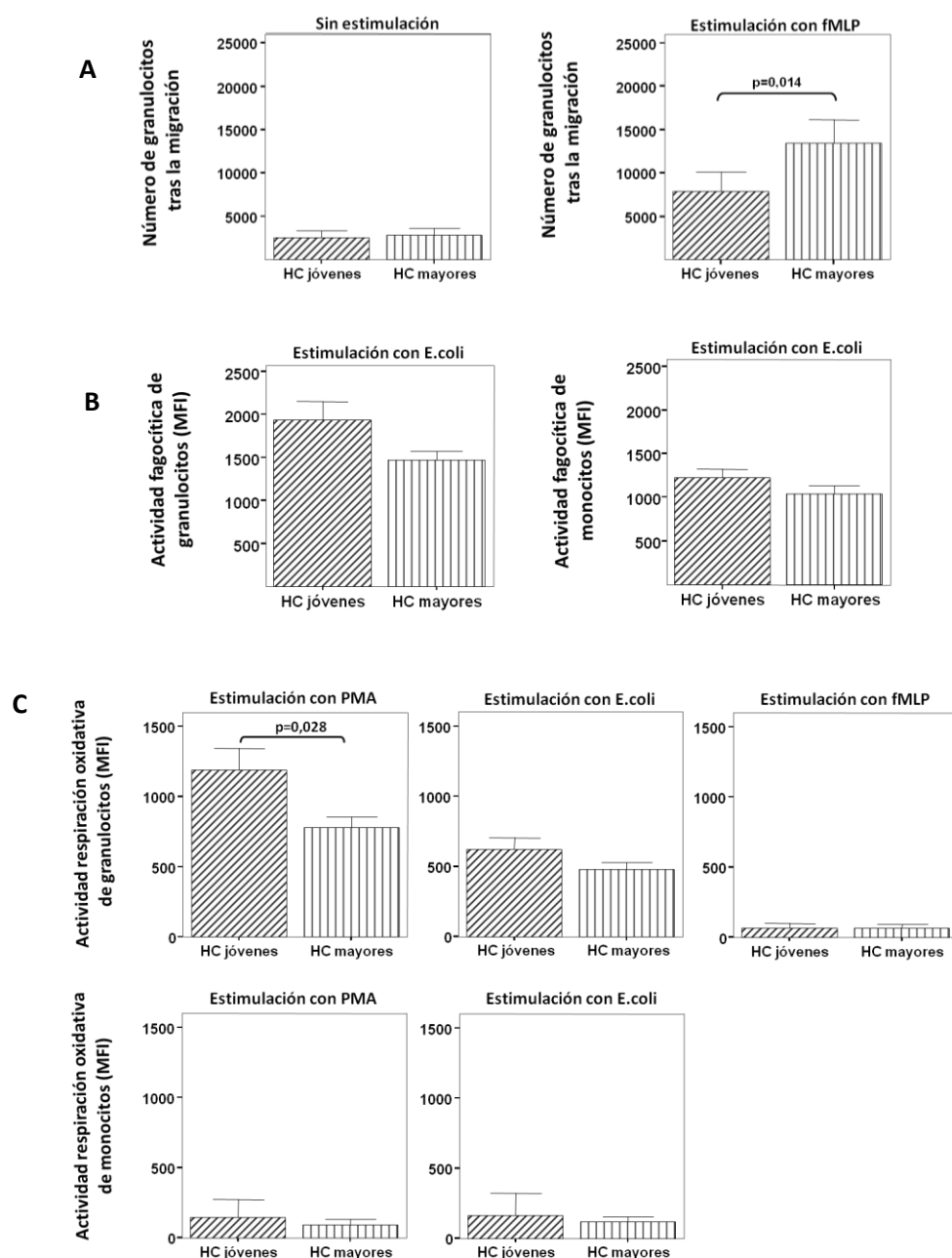


Figura 4.-Influencia del envejecimiento en la función fagocítica en leucocitos en individuos sanos (HC) jóvenes (<30 años) y mayores (>60 años) mediante citometría de flujo A. Actividad quimiotáctica. Los resultados de la quimiotaxis se expresan como el número de neutrófilos que migran a través de un filtro en un gradiente de concentración de fMLP. **B. Actividad fagocítica.** La fagocitosis se analizó incubando sangre con E.coli marcada con FITC y midiendo la proporción de leucocitos que habían ingerido la bacteria y la capacidad de cada célula para fagocitar E.coli. Los resultados de la actividad fagocítica se expresan como MFI (número de bacterias fagocitadas por célula). **C. Respiración oxidativa.** Los porcentajes de leucocitos estimulados que producen ROIs y su actividad enzimática se evaluaron como medida de la respiración oxidativa en Los resultados de la actividad enzimática se expresan como MFI (cantidad de R123 por célula). Todos los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p<0,05$.

2.1.-Los pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento presentan un aumento en la actividad quimiotáctica

El primer evento de este proceso, correspondiente a la quimiotaxis, se analizó determinando el número de granulocitos que son capaces de migrar hacia un gradiente de concentración de un quimioatrayente en el medio de cultivo y atravesando un filtro.

En la **Figura 5A**, se puede observar como los neutrófilos *ex vivo* de pacientes con enfermedades activas no tratados y no expuestos a ningún estímulo mostraron una mayor capacidad para migrar que los controles sanos de edad similar, aunque sin diferencias significativas. Tras la estimulación con fMLP, la diferencia en la actividad quimiotáctica mostró una imagen similar (**Figura 5B**). Dado que el cambio de forma de las células precede a la migración celular, esto se puede medir mediante el análisis de los cambios de FSC en el citómetro de flujo. La media de FCS también fue superior en los pacientes con enfermedad activa comparada con los HC (datos no mostrados), lo que indica un aumento significativo en la capacidad para migrar de los neutrófilos circulantes de pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas a la edad.

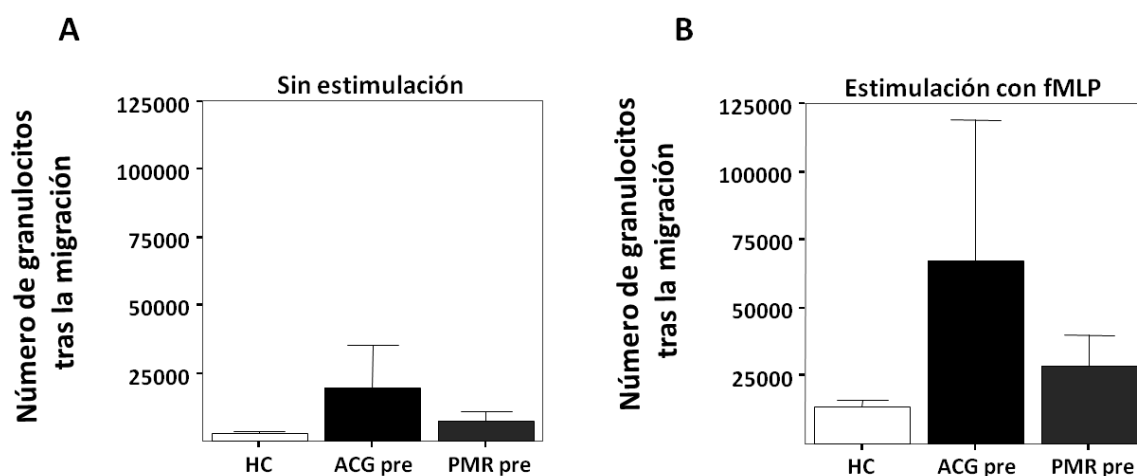


Figura 5.- Determinación de la actividad quimiotáctica en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento. La quimiotaxis de los neutrófilos se determinó mediante citometría de flujo en controles sanos y pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo. Los resultados se expresan como el número de células que migran a través de un filtro semipermeable en un gradiente de concentración de fMLP. Los datos se representan como la media $\pm$ DE.

En cuanto a la influencia del tratamiento esteroideo, no se detectaron cambios significativos en la capacidad quimiotáctica tras el control clínico de la actividad de la enfermedad en estos pacientes. Sin embargo, sí que se observó que pacientes con PMR y ACG en remisión completa y sin tratamiento con CS presentaban valores similares a los controles sanos pareados en edad (**Figura 6**).

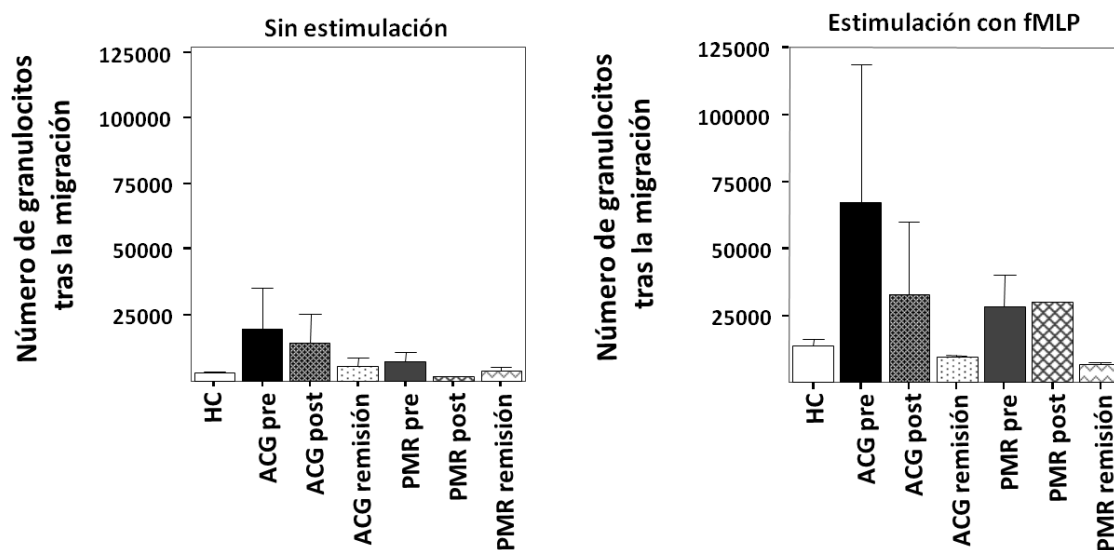


Figura 6.- Influencia del tratamiento y del estado de la enfermedad en la actividad quimiotáctica en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento. El efecto del tratamiento con CS se analizó en pacientes con ACG y PMR en remisión clínica tras una media de duración del tratamiento de 4 semanas. Siete pacientes (3 con ACG y 4 con PMR) se estudiaron en remisión completa sin tratamiento durante al menos dos años. Los resultados se expresan como el número de células que migran en un gradiente de concentración de fMLP. Los datos se representan como la media $\pm$ DE.

2.2.-Los pacientes con ACG poseen un aumento en la capacidad fagocítica

El segundo evento relacionado con la fagocitosis, la ingestión de bacterias, se determinó midiendo el porcentaje de células fagocíticas que habían ingerido bacterias y su capacidad fagocítica (expresada como número de bacterias fagocitadas por células).

El porcentaje de neutrófilos y monocitos capaces de fagocitar fue muy similar entre los pacientes y el grupo de controles sanos de edad avanzada (datos no mostrados). En cambio, como se puede apreciar en la **Figura 7**, la intensidad de fluorescencia media de los granulocitos, pero no de los monocitos, en aquellos pacientes con ACG fue significativamente mayor que en los controles sanos y en los pacientes con PMR ($p < 0,05$).

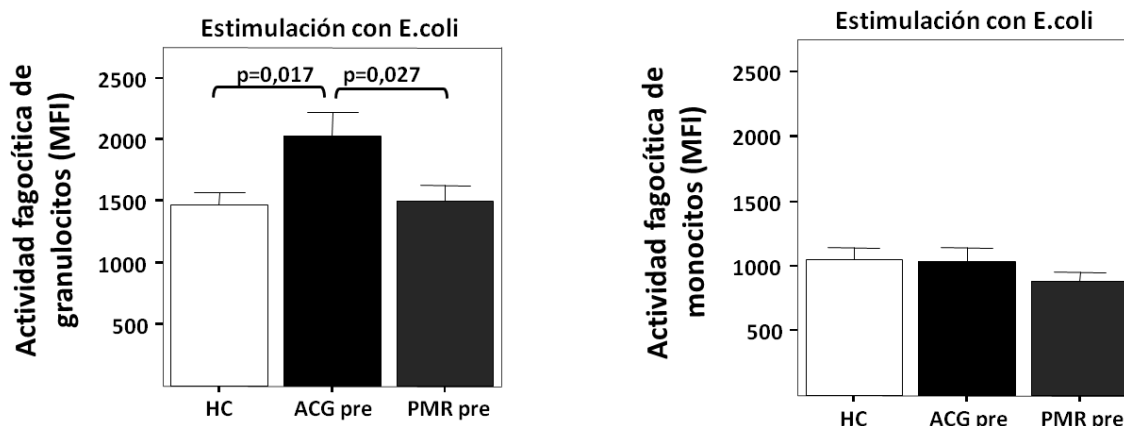


Figura 7.- Determinación de la actividad fagocítica en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento. La fagocitosis se analizó incubando sangre con *E.coli* marcada con FITC y midiendo la proporción de leucocitos que habían ingerido la bacteria y la capacidad de cada célula para fagocitar *E.coli* en controles sanos y pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo. Los resultados de la actividad fagocítica se expresan como la intensidad de fluorescencia media (número de bacterias fagocitadas por célula). Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

El tratamiento con CS indujo un aumento marginalmente significativo tanto en porcentaje (datos no mostrados) como en MFI de los monocitos que habían fagocitado *E.coli*, pero sólo en los pacientes con PMR (**Figura 8**). Una vez más, los pacientes con PMR y ACG en remisión completa sin tratamiento con CS tuvieron valores similares a los controles sanos de edad avanzada.

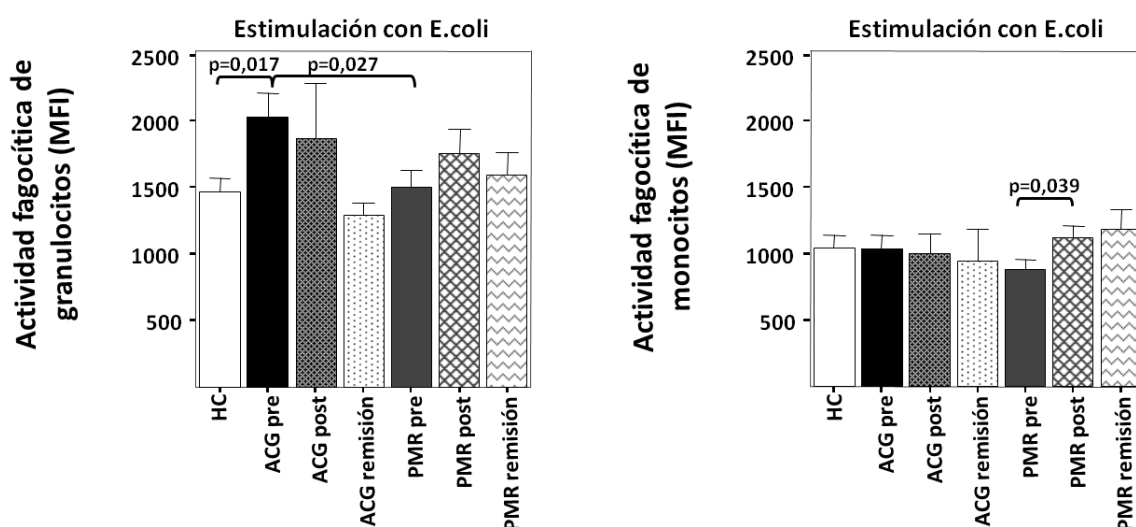


Figura 8.- Influencia del tratamiento y del estado de la enfermedad en la actividad fagocítica en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento. El efecto del tratamiento con CS se analizó en pacientes con ACG y PMR en remisión clínica tras una media de duración del tratamiento de 4 semanas. Siete pacientes (3 con ACG y 4 con PMR) se estudiaron en remisión completa sin tratamiento durante al menos dos años. Los resultados de la actividad fagocítica se expresan como la intensidad de fluorescencia media (número de bacterias fagocitadas por célula). Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

2.3.-La respiración oxidativa está reducida en los pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento

El tercer y último evento analizado, tras el proceso de fagocitosis, fue la digestión de las bacterias mediante la respiración oxidativa de los leucocitos. Su análisis permitió la cuantificación del porcentaje de células fagocíticas que producían reactivos oxidantes así como su actividad enzimática (expresada como MFI).

El porcentaje de fagocitos capaces de producir ROIs en respuesta a *E.coli* como estímulo, estaba reducido significativamente en los neutrófilos pero no en los monocitos de pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento (datos no mostrados). Además, estos resultados fueron confirmados también con la expresión (MFI) de los ROIs en neutrófilos y monocitos de pacientes enfermedad activa (**Figura 9**). Esta reducción también se observó en el caso de los pacientes con PMR activa tras estimulación con fMLP.

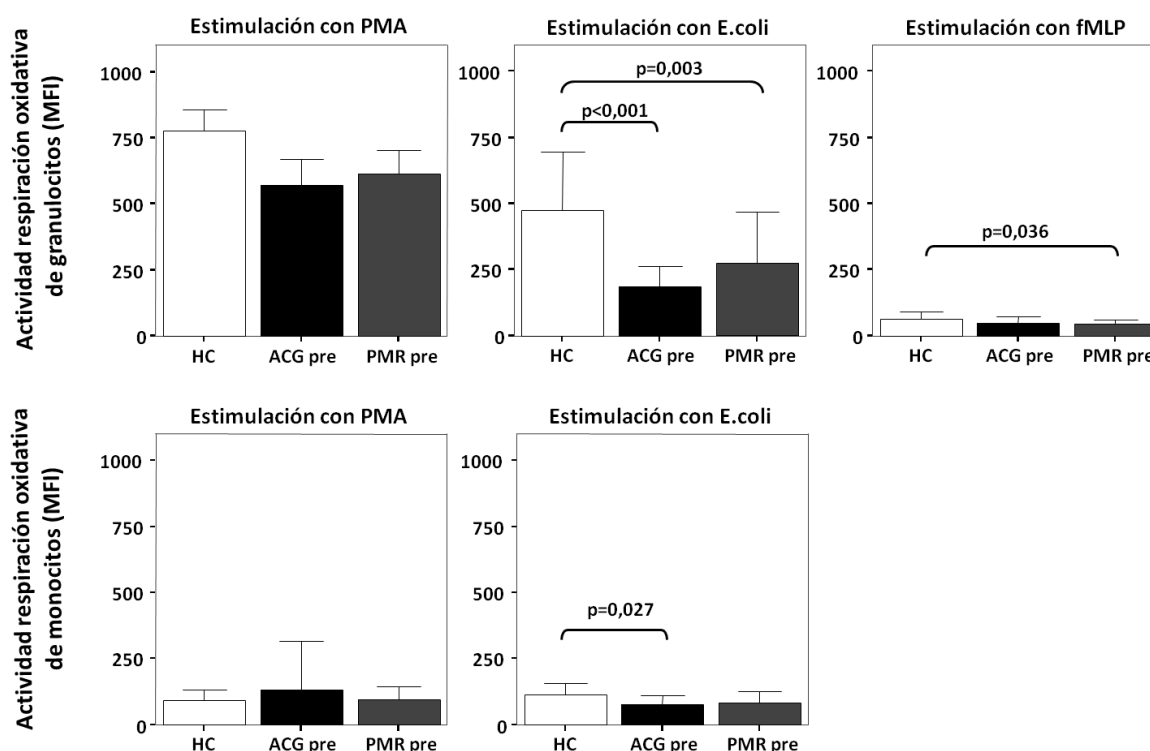


Figura 9.- Determinación de la respiración oxidativa en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento. Los porcentajes de granulocitos y monocitos estimulados que convierten dihidrorodamina 123 (no fluorescente) a rodamina 123 (fluorescente) con la consiguiente producción de ROIs y su actividad enzimática se evaluaron como medida de la respiración oxidativa en controles sanos y pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como la intensidad de fluorescencia media (cantidad de R123 por célula) de cada una de las poblaciones analizadas. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

El efecto del tratamiento con CS fue variable dentro de las distintas enfermedades, aunque de nuevo, los pacientes con ACG tratados con altas dosis de CS recuperaban la función de la respiración oxidativa (**Figura 10**). Aquellos pacientes con PMR en remisión completa y sin tratamiento con CS también recuperaban la actividad oxidativa.

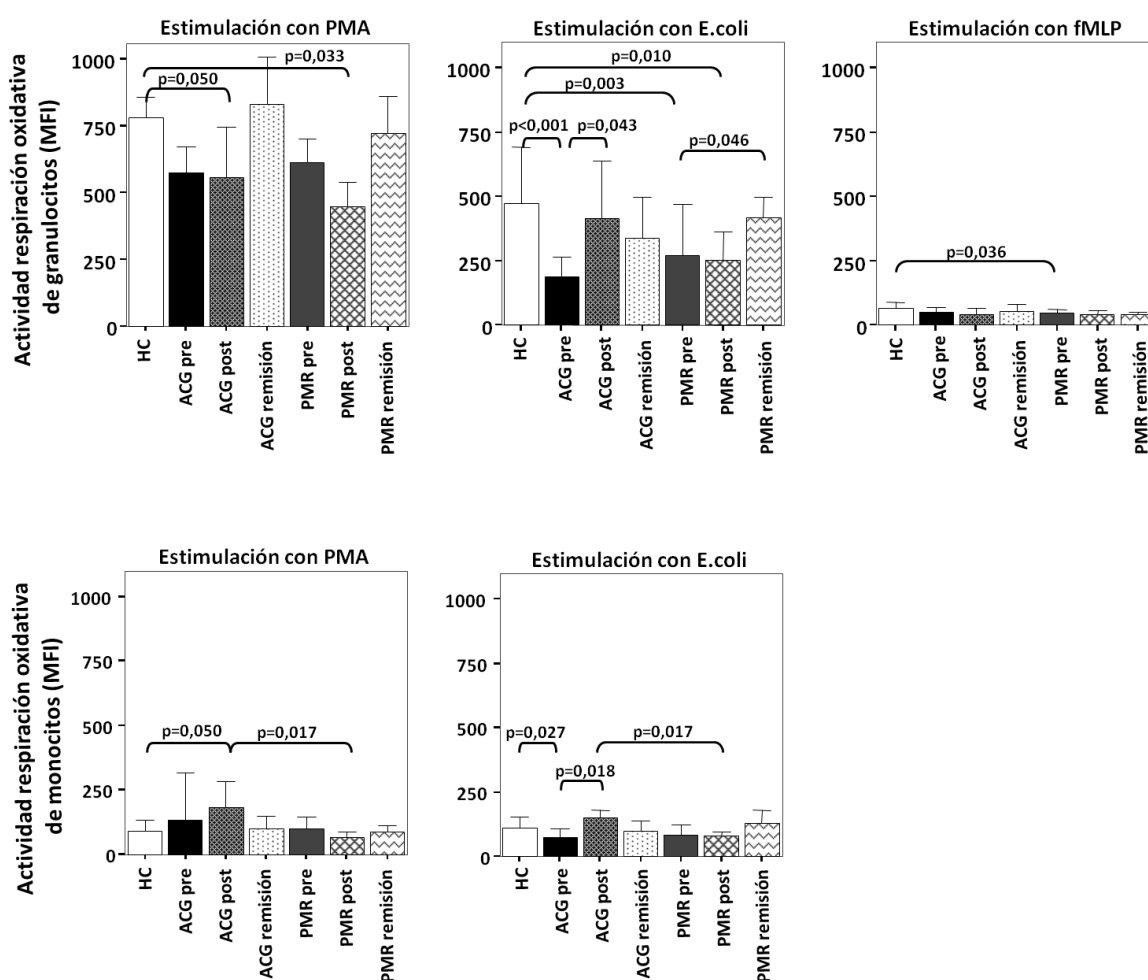


Figura 10.- Influencia del tratamiento y del estado de la enfermedad en la actividad de la respiración oxidativa en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento. El efecto del tratamiento con CS se analizó en pacientes con ACG y PMR y en remisión clínica tras una media de duración del tratamiento de 4 semanas. Siete pacientes (3 con ACG y 4 con PMR) se estudiaron en remisión completa sin tratamiento durante al menos dos años. Los resultados de la actividad enzimática se expresan como la intensidad de fluorescencia media (cantidad de R123 por célula) de cada una de las poblaciones analizadas. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

2.4.-Relación entre las funciones de los leucocitos circulantes y la concentración sérica de proteína C reactiva

Con el fin de evaluar si las anomalías halladas en la función de los fagocitos se relacionan con el proceso inflamatorio en sí, se estudió la posible correlación entre la quimiotaxis, la fagocitosis y la respiración oxidativa con los niveles séricos de PCR. Como se muestra en la **Figura 11**, existe una correlación inversa significativa entre la PCR y la respiración oxidativa (E.coli) tanto en los granulocitos como en los monocitos de los pacientes con PMR activa. Aunque los resultados en la ACG mostraron la misma tendencia, no fueron estadísticamente significativos, probablemente debido al pequeño tamaño muestral.

Por otra parte, también se encontró una correlación negativa con la actividad fagocítica de los granulocitos en los pacientes con ACG ($p=0,021$; $r=-0,786$) así como una tendencia en los monocitos de los pacientes con PMR ($p=0,051$; $r=-0,530$).

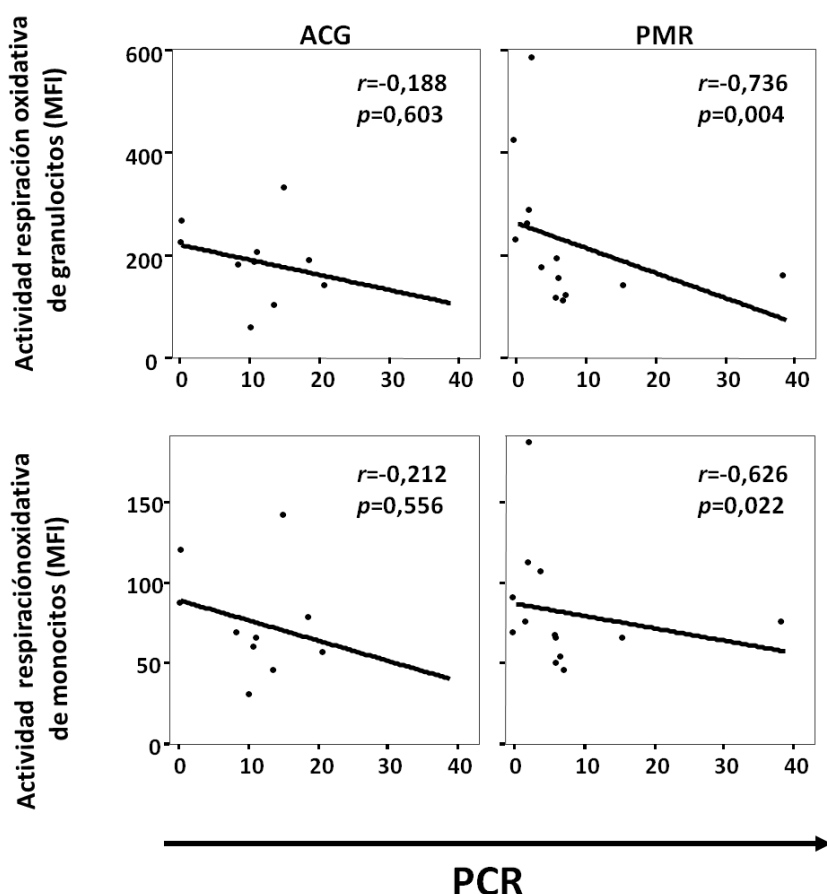


Figura 11.- Correlación entre la respiración oxidativa y la proteína C reactiva en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento. El grado de asociación entre las variables se representa mediante diagramas de dispersión y su correspondiente línea de tendencia. Los resultados de la correlación se expresan según los valores de r: coeficiente de Spearman y p: significación estadística. Las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

En resumen, los pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento presentan una desregulación de las funciones fagocíticas de los neutrófilos y de los monocitos. Además, la alteración de la respiración oxidativa se correlaciona con la actividad de la enfermedad en los pacientes con PMR. En cuanto al efecto del tratamiento con CS, parece no influir en las funciones efectoras de neutrófilos y monocitos en ambas patologías, exceptuando en el burst oxidativo de los pacientes con ACG, quienes se tratan con altas dosis de CS. Los pacientes con PMR y ACG en remisión completa y sin tratamiento con CS recuperan sus funciones efectoras, con valores similares a los que presentan los individuos sanos de edad avanzada.

3. Expresión y función diferencial de los TLRs en PBMCs de pacientes con Arteritis de Células Gigantes y Polimialgia Reumática

Además de la influencia del envejecimiento sobre estas patologías, existen numerosas evidencias de una posible etiología infecciosa basadas en observaciones clínicas y epidemiológicas. El inicio de los síntomas es similar a un cuadro infeccioso, siendo dicho cuadro limitado en el tiempo. Además existe coincidencia en familiares no cosanguíneos. También se observa un aumento cíclico en la incidencia que suele coincidir con brotes de infecciones virales y bacterianas.

La gran importancia de la posible etiología infecciosa proviene también de la demostración de que el primer evento crítico en el proceso vasculítico es la activación de las DCs que reconocen a los patógenos a través sus TLRs. Los TLRs, por tanto, van a establecer una importante conexión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida mediante el reconocimiento de PAMPs. Además múltiples estudios han demostrado que la activación de los TLRs se ha implicado en la pérdida de la tolerancia, lo que conlleva a la autoinmunidad y a la inflamación crónica. En la base de la etiopatogenia de la ACG y la PMR como procesos inflamatorios crónicos que son parece estar implicada una respuesta inmunitaria exacerbada, donde juegan un papel esencial tanto las células de la respuesta inmunitaria innata como adquirida. Diversos estudios han investigado el posible papel de virus y bacterias en la etiopatogénesis de la ACG y PMR, sin resultados concluyentes [165,166].

Además, resultados previos de nuestro grupo en los que estudiamos la influencia de la edad sobre la función inmune innata en individuos sanos, han demostrado que el envejecimiento se asocia con una función defectuosa de varios TLRs [70].

En base a todos estos datos y puesto que la respuesta inmune innata juega un papel muy importante en el inicio de los procesos inflamatorios crónicos, nos planteamos la cuestión de si es posible que la activación y/o función diferencial de TLRs pueda desempeñar un papel crucial en los mecanismos patogénicos de la ACG y la PMR.

3.1.-Expresión diferencial de TLRs en pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento en fase activa de la enfermedad

El primer abordaje para estudiar en más profundidad la implicación de los TLRs en la patogénesis de ambas patologías fue analizar la expresión de los diferentes TLRs en superficie e intracelulares mediante citometría de flujo.

Como se puede apreciar en la **Figura 12**, el hallazgo más consistente en los 3 diferentes subgrupos de células circulantes fue un aumento significativo en la expresión del TLR7 intracelular en ambas patologías inflamatorias.

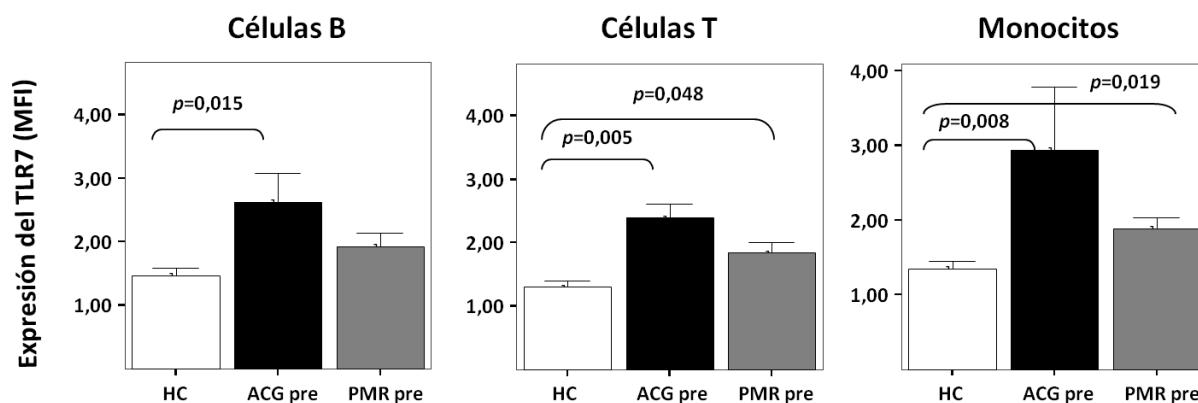


Figura 12.- Determinación de la expresión del TLR7 en PBMCs (linfocitos B, linfocitos T y monocitos) mediante citometría de flujo en controles sanos y pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo. Los resultados se expresan como intensidad de fluorescencia media y se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

Como se puede comprobar en la **Figura 13**, además de las diferencias significativas halladas en la expresión del TLR7, también se observaron diferencias significativas en la expresión de diferentes TLRs en las subpoblaciones de células mononucleares. La expresión del TLR1 en células T fue ligeramente menor en pacientes con PMR comparado con los controles. La expresión del TLR3 fue significativamente mayor en pacientes con ACG activa tanto en células T como en células B cuando se

compararon con los controles y con los pacientes con PMR activa respectivamente. Finalmente, se observó un aumento en la expresión del TLR9 en células B de los pacientes con ACG en la fase activa de la enfermedad. No se encontraron diferencias significativas para el TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR8 (Figura 13).

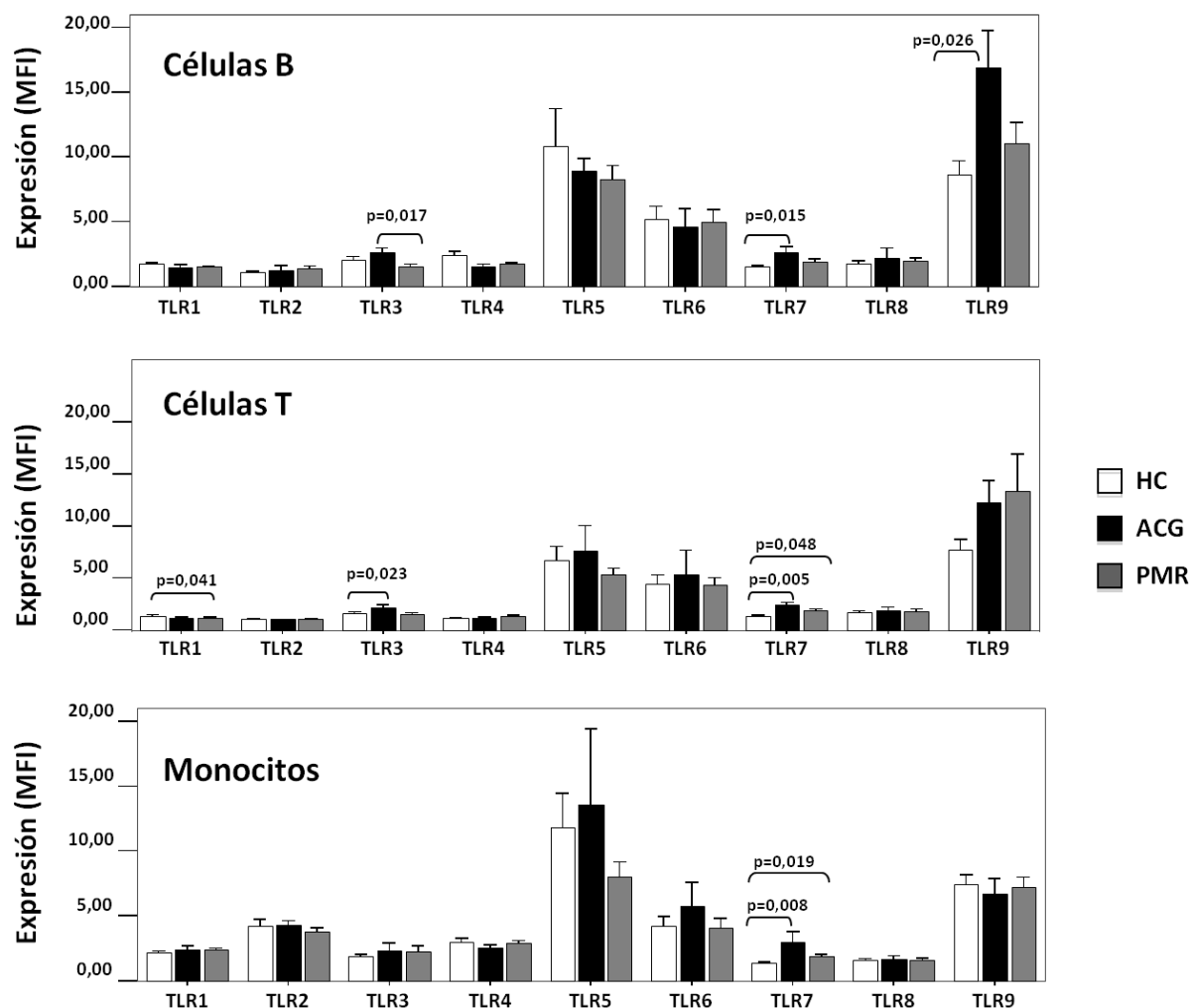


Figura 13.- Determinación de la expresión de TLRs humanos (TLR1-TLR9) mediante citometría de flujo en células B (panel superior), células T (panel intermedio) y monocitos (panel inferior) en HC (barras blancas) y pacientes con ACG (barras negras) y PMR (barras grises) al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo. Los resultados se expresan como la intensidad de fluorescencia media y se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0.05$.

3.2.-Los pacientes con PMR y ACG tienen un descenso en la respuesta de TLR7 durante la fase aguda de la enfermedad

Dado que el hallazgo más llamativo fue el aumento significativo en la expresión del TLR7 en ambas patologías inflamatorias, quisimos evaluar la funcionalidad de dicho receptor *in vitro* mediante la respuesta de producción de citocinas intracelulares proinflamatorias a estímulos específicos en monocitos. En la **Figura 14** (panel superior), se puede observar un descenso en la respuesta de citocinas proinflamatorias frente a un agonista específico del TLR7, Imiquimod, en los pacientes comparado con los controles, especialmente en pacientes con ACG.

Para evitar un posible efecto específico de imiquimod, realizamos el mismo estudio en un subgrupo de pacientes utilizando un agonista diferente de TLR7 como es Gardiquimod. En la **Figura 14** (panel inferior) observamos que aunque los resultados no alcanzaron las diferencias estadísticamente significativas, probablemente debido a un menor tamaño muestral, se obtuvo una imagen similar con gardiquimod.

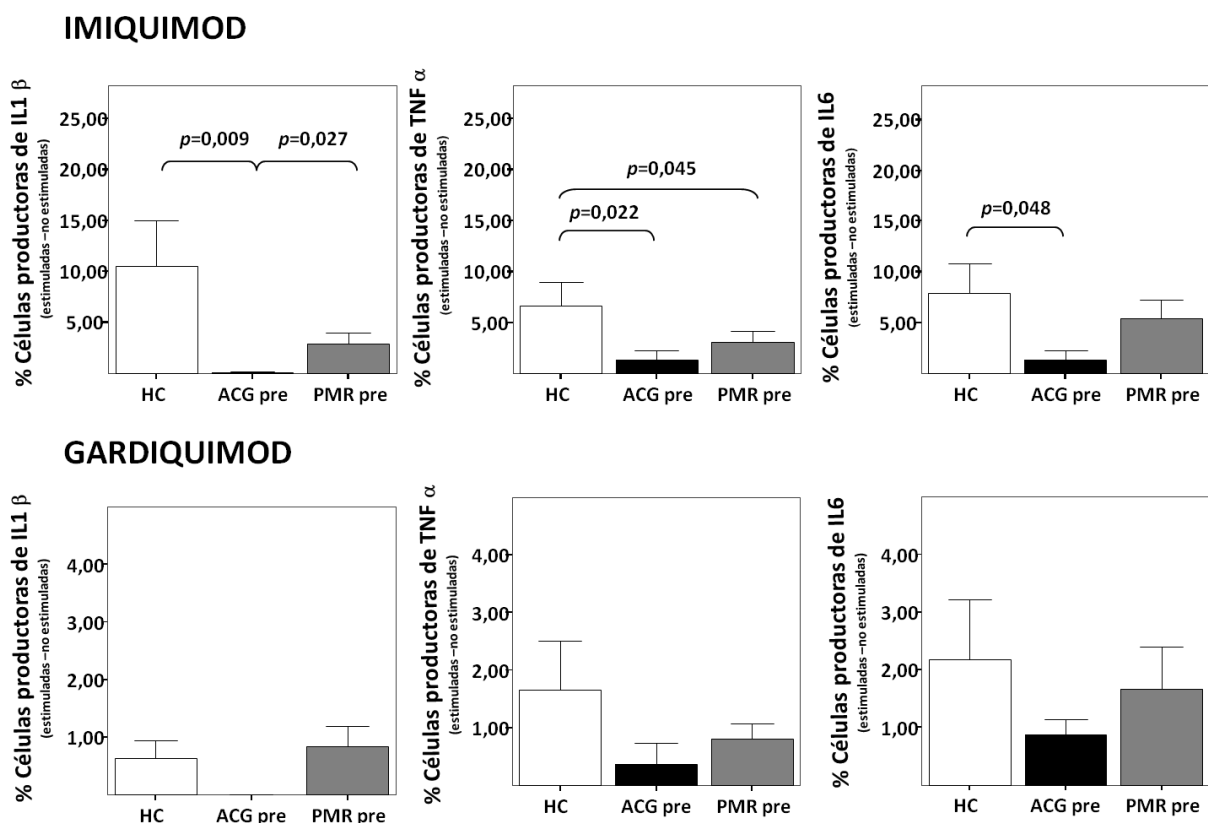


Figura 14. Determinación de la función del TLR7 mediante citometría de flujo en controles sanos y pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo. La función del TLR7 se evaluó como el porcentaje de monocitos productores de citocinas proinflamatorias intracelulares tras estimulación del TLR7 con agonistas específicos: Imiquimod (panel superior) y Gardiquimod (panel inferior). Los resultados se expresan como el delta del cultivo con estímulo respecto al cultivo sin estímulo. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

Al igual que con la expresión, analizamos la función de los otros TLRs diferentes mediante la producción de citocinas intracelulares proinflamatorias y tras la estimulación *in vitro* con agonistas específicos de TLRs. En general, la respuesta de TLRs frente a agonistas específicos fue muy parecida entre los pacientes y los controles de edades similares.

3.3.-Los cambios en la expresión y función de los TLRs también pueden ocurrir en otras enfermedades caracterizadas por una fuerte respuesta de fase aguda

Para analizar o examinar si los hallazgos encontrados en los pacientes con PMR y ACG eran específicos de la enfermedad, nos planteamos estudiar esta cuestión en dos grupos adicionales de pacientes caracterizados por una respuesta inflamatoria. Uno de los grupos estudiados también se encontraba asociado al envejecimiento, artritis reumatoide de inicio en el anciano (EORA), mientras que el otro grupo control no estaba restringido por la edad e incluía a pacientes con sepsis ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos de nuestro hospital. Como se puede observar en la **Figura 15A y 15B**, la expresión y función de TLR7 y otros TLRs, como TLR4, también se vieron afectadas en otras enfermedades caracterizadas por una fuerte respuesta de fase aguda.

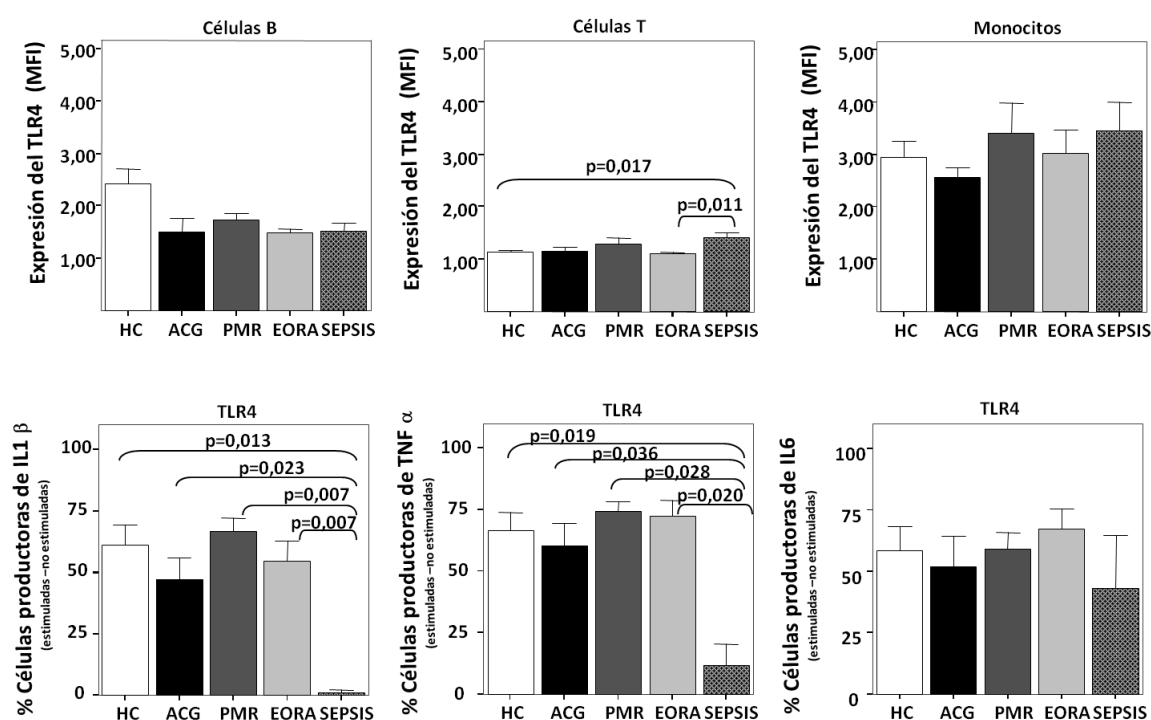


Figura 15 A.- Determinación de la expresión y función del TLR4 mediante citometría de flujo en controles sanos y pacientes con ACG, PMR, EORA al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo, y en pacientes con sepsis. Los resultados de expresión se expresan como la intensidad de fluorescencia media y los resultados de la función como el porcentaje de células productoras de citocinas intracelulares tras estimulación con agonistas específicos de TLRs (delta del cultivo con estímulo respecto al cultivo sin estímulo). En ambos casos los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0.05$.

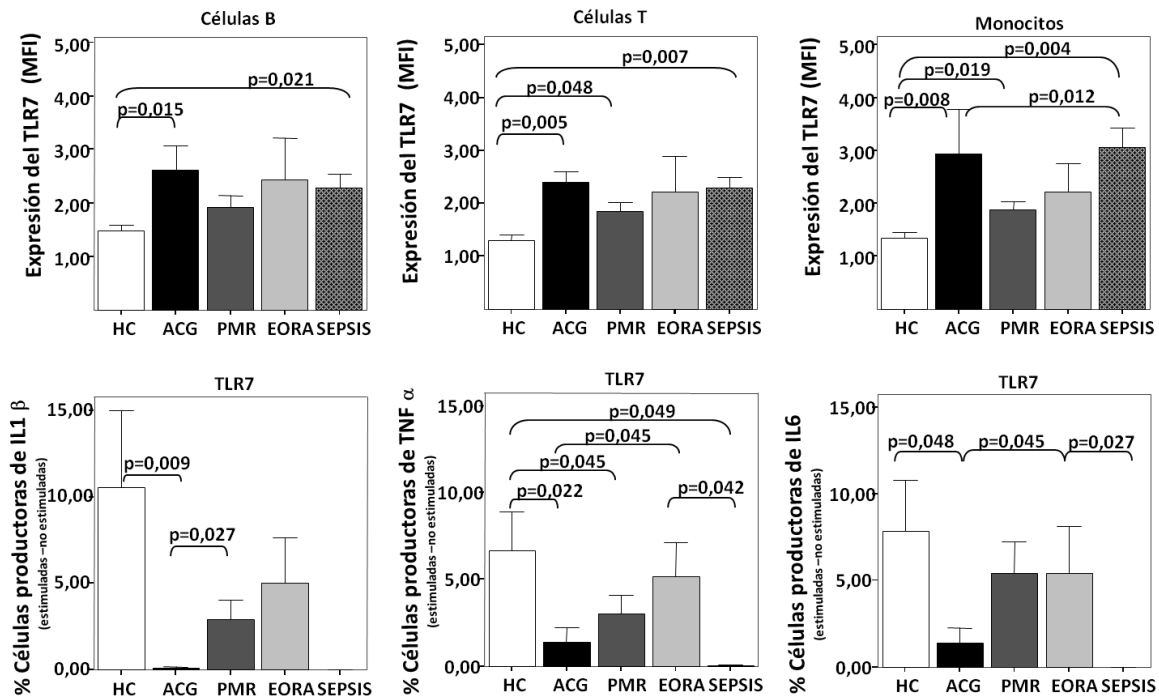


Figura 15 B.- Determinación de la expresión y función del y TLR7 mediante citometría de flujo en controles sanos y pacientes con ACG, PMR, EORA al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo, y en pacientes con sepsis. Los resultados de expresión se expresan como la intensidad de fluorescencia media y los resultados de la función como el porcentaje de células productoras de citocinas intracelulares tras estimulación con agonistas específicos de TLRs (delta del cultivo con estímulo respecto al cultivo sin estímulo). En ambos casos los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

Los pacientes con EORA mostraron un patrón similar a los pacientes con PMR y ACG en la expresión del TLR4 y TLR7. Sin embargo, la función del TLR7 en pacientes con EORA fue significativamente diferente comparado con los pacientes con ACG y próxima a los controles sanos. La expresión del TLR7 también se vio incrementada en los pacientes con sepsis. Sin embargo, el hallazgo más destacado fue el impacto de las sepsis en la función del TLR7 y TLR4, de modo que hubo una ausencia de respuesta de citocinas intracelulares al estímulo con imiquimod y LPS, respectivamente (Figura 15A y 15B).

En resumen, los pacientes con ACG y PMR en fase activa presentan un aumento significativo en la expresión del TLR7 en células B, células T y monocitos. Sin embargo, y a pesar de una mayor expresión de este receptor, los monocitos de estos pacientes presentan un defecto en la producción de citocinas proinflamatorias como respuesta del TLR7 tras estimulación *in vitro* con agonistas específicos. Dicho defecto podría no ser específico de la enfermedad sino ser una consecuencia de la reacción de fase aguda que acontece en estas patologías.

3.4.-El descenso en la respuesta del TLR7 se recupera tras la remisión completa de la enfermedad

En vista de los resultados obtenidos, nos planteamos la posibilidad de que esta disminución en la funcionalidad del TLR7 pudiera deberse a la actividad de la enfermedad. Por tanto, el siguiente paso fue clarificar si el descenso en la producción de citocinas proinflamatorias como respuesta del TLR7 se corregía tras el control de la enfermedad con el tratamiento con CS. Para ello, dos subgrupos de 6 pacientes con ACG y 39 pacientes con PMR se evaluaron tras un período de 6 a 10 semanas de remisión con CS.

En la **Figura 16**, se puede observar cómo a pesar de que la enfermedad se encontraba inactiva clínica y analíticamente, el tratamiento a corto plazo con los CS no indujo una recuperación en la respuesta del TLR7 frente a imiquimod y gardiquimod.

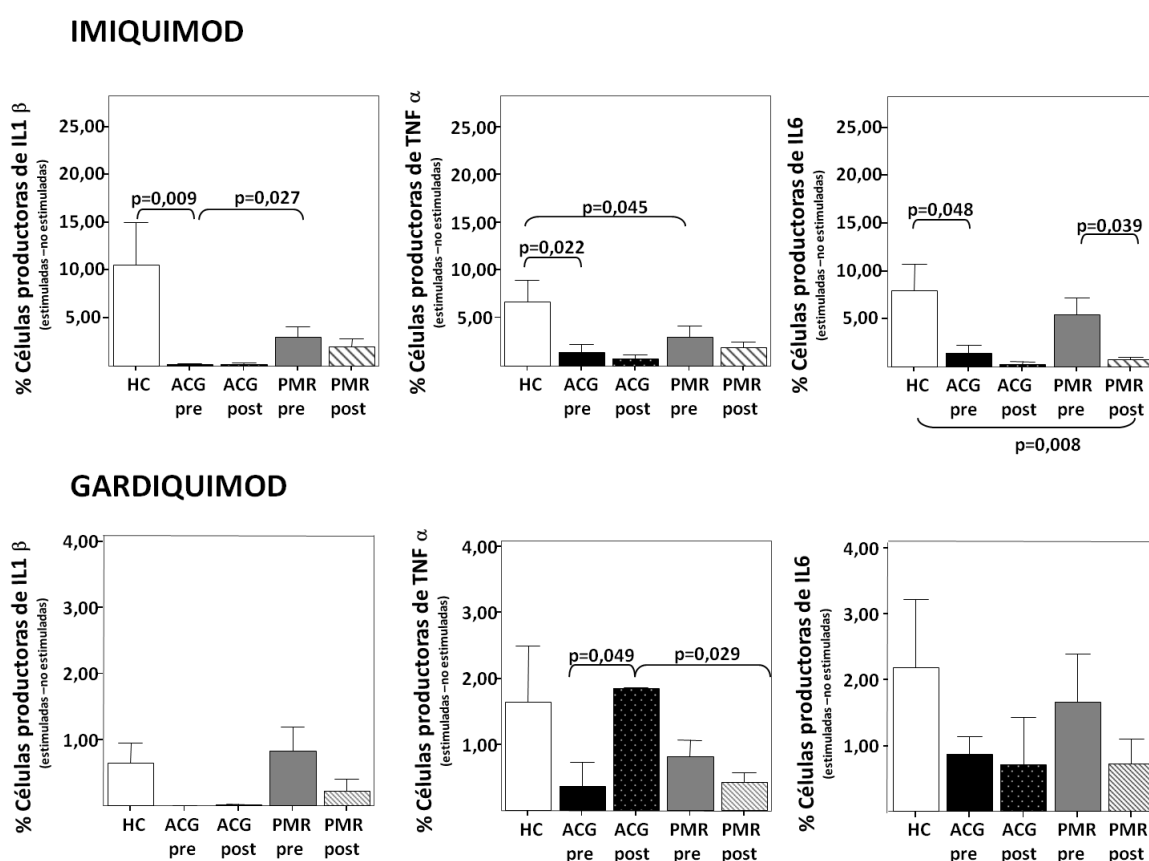


Figura 16. Influencia del tratamiento con CS en la función del TLR7. El análisis de la función del TLR7 se llevó a cabo mediante citometría de flujo en controles sanos y pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo (pre) y tras el control de la enfermedad con el tratamiento de CS (post). La función del TLR7 se evaluó como el porcentaje de monocitos productores de citocinas proinflamatorias intracelulares tras estimulación del TLR7 con agonistas específicos: Imiquimod (panel superior) y Gardiquimod (panel inferior). Los resultados se expresan como el delta del cultivo con estímulo respecto al cultivo sin estímulo. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

Una posible explicación que pudiera dar lugar a un profundo defecto en la respuesta proinflamatoria del TLR7, a pesar de una inapropiada expresión proteica, sería que la proteína expresada no fuese funcional en términos de transducción de señales, bien por un defecto genético del receptor o una alteración en la vía de señalización.

Para evaluar la existencia de un posible defecto genético en el receptor, mediante métodos de predicción de sustitución de aminoácidos, tales como PolyPhen y SNPs3D, se identificaron 3 SNPs dentro de la secuencia codificante del TLR7 que introducían cambios de aminoácidos con potencial efecto deletéreo sobre la función de la proteína del TLR7. Dos de estos cambios afectaban a una región rica en leucinas (LRR), un dominio funcional crítico en el reconocimiento de los componentes patogénicos e inducción de la respuesta específica del patógeno. El tercer SNP introdujo un codón *stop* dando lugar a una proteína truncada perdiendo así el extremo C terminal, incluyendo el dominio transmembrana y dominio TIR (**Figura 17**). Una vez seleccionados los SNPs, se genotiparon 53 controles sanos y 87 pacientes con PMR y ACG y no se hallaron alelos raros en ningún caso. Por tanto, estos SNPs son altamente infrecuentes en las poblaciones estudiadas y no se asociaron con estas enfermedades inflamatorias.

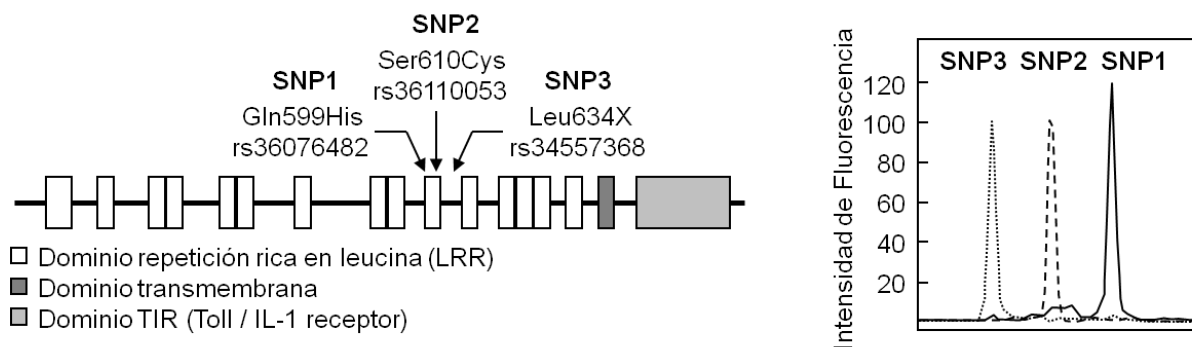


Figura 17.- Genotipado de los SNPs del TLR7 mediante el sistema Multiplex SnapShot. En la figura de la izquierda se identifican tres SNPs dentro de la región codificante del TLR7 con posible efecto deletéreo sobre la proteína del TLR7. En la figura de la derecha se observan los diferentes tamaños de los SNPs durante la separación por electroforesis tras la reacción SNaPshot.

Una vía diferente para evaluar la respuesta defectuosa del TLR7 fue estudiar a los pacientes en remisión completa a largo plazo sin tratamiento con CS para ver si la función del TLR7 aún estaba disminuida. Como se puede apreciar en la **Figura 18**, sorprendentemente los pacientes en remisión completa presentaron una respuesta similar a los controles, y mayor que los pacientes al reciente comienzo de la enfermedad. En vista de estos resultados descartamos la hipótesis de la existencia de un posible defecto genético.

IMIQUIMOD

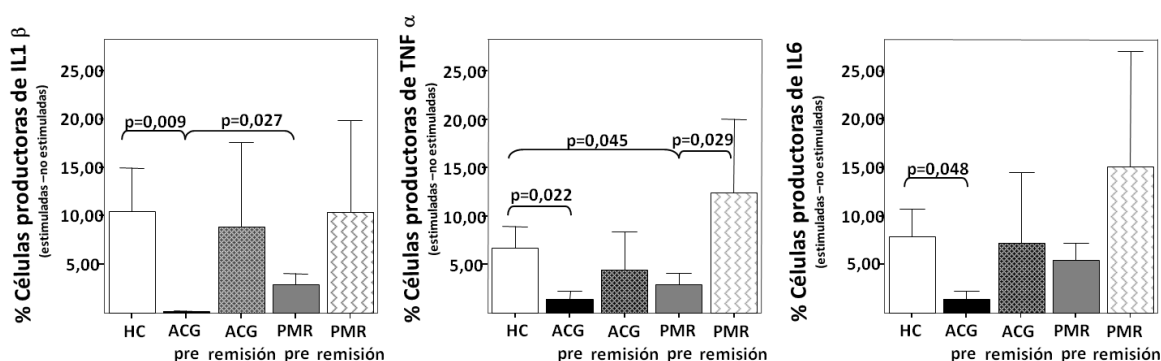


Figura 18. Función del TLR7 en pacientes en remisión clínica completa y sin tratamiento. El análisis de la función del TLR7 se realizó mediante citometría de flujo en controles sanos y pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo (pre) y en remisión clínica completa y sin ningún tipo de tratamiento de CS (remisión). La función del TLR7 se evaluó como el porcentaje de monocitos productores de citocinas proinflamatorias intracelulares tras estimulación del TLR7 con el agonista específico imiquimod. Los resultados se expresan como el delta del cultivo con estímulo respecto al cultivo sin estímulo. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Solo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

3.5.-El descenso en la respuesta del TLR7 principalmente afecta a la producción de citocinas proinflamatorias

Las vías de señalización de los TLRs se originan en los dominios Toll/IL-1 receptor (TIR). En el caso del TLR7, los adaptadores que contienen el dominio TIR, tales como MyD88, regulan las vías de señalización mediada por TLRs. MyD88, el cual es común a todas las vías mediadas por TLRs con la excepción del TLR3, da lugar a la producción de citocinas proinflamatorias así como de IFN- α . Por tanto, abordamos esta cuestión midiendo la producción de IFN- α por PBMCs en sobrenadantes de cultivo tras estimulación *in vitro* con agonistas específicos de TLRs.

Tal y como se observa en la **Figura 19**, la estimulación *in vitro* con el agonista específico del TLR7 indujo una mayor producción de IFN- α por PBMCs que otro TLR extracelular (TLR4) o TLR intracelular (TLR8) (datos no mostrados). Aunque hubo una tendencia a liberar más IFN- α tras el estímulo *in vitro*, especialmente en pacientes con ACG, las diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los pacientes y los controles sanos.

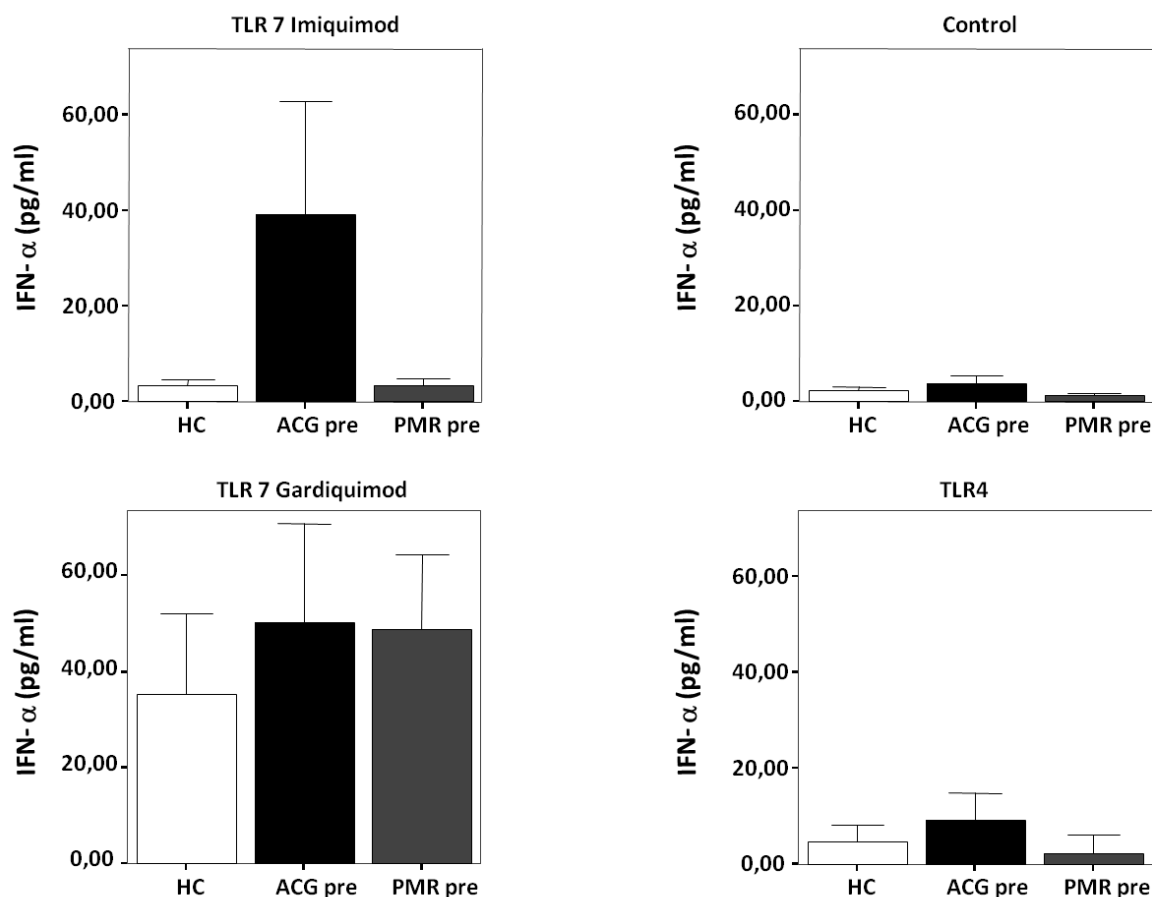


Figura 19.- Determinación de los niveles de IFN α en sobrenadantes de cultivo de pacientes al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento de CS La producción de IFN- α por PBMCs en sobrenadantes de cultivo tras estimulación de TLRs con agonistas específicos se analizó mediante ELISA. Como control, se muestra la producción de IFN- α de los sobrenadantes de cultivo no estimulados. Los datos se representan como la media $\pm$ DE.

En resumen, estos resultados sugieren que la respuesta *in vitro* del TLR7 principalmente afecta a la producción de citocinas proinflamatorias pero no a la producción de IFN α . Además, el defecto en la respuesta proinflamatoria del TLR7 no es secundario a las posibles variaciones aminoacídicas que puedan estar alterando a la proteína, y se recupera tras la completa remisión de la enfermedad.

3.6.-El plasma de pacientes con PMR y ACG aumenta la expresión de genes implicados en la vía de señalización de IFN en PBMCs de individuos sanos

Otra posible hipótesis que explique el aumento en la expresión proteica del TLR7, junto con una pérdida de la respuesta proinflamatoria, tras la unión específica al TLR7, que se recupera tras la resolución de la enfermedad, podría ser una saturación del TLR7 por ligandos específicos al comienzo de la enfermedad. Los ligandos naturales del TLR7 son principalmente virus de ARNss, [216], algunos de los cuales se han implicado en la patogénesis de la ACG y PMR [165].

Por lo tanto, si uno o varios virus estuviesen presentes en la sangre de pacientes durante la fase aguda de la enfermedad, la estimulación de PBMCs de individuos sanos con el plasma de pacientes activos debería inducir un aumento en la expresión del receptor así como la sobreexpresión de genes relacionados con una respuesta viral. Como se puede apreciar en la **Figura 20**, estos estudios evidenciaron que el cultivo *in vitro* de PBMCs de individuos sanos con plasma de pacientes con PMR y ACG aumentó la expresión de TLR7 en células B y células T, siendo este aumento significativo en el caso de los pacientes con ACG.

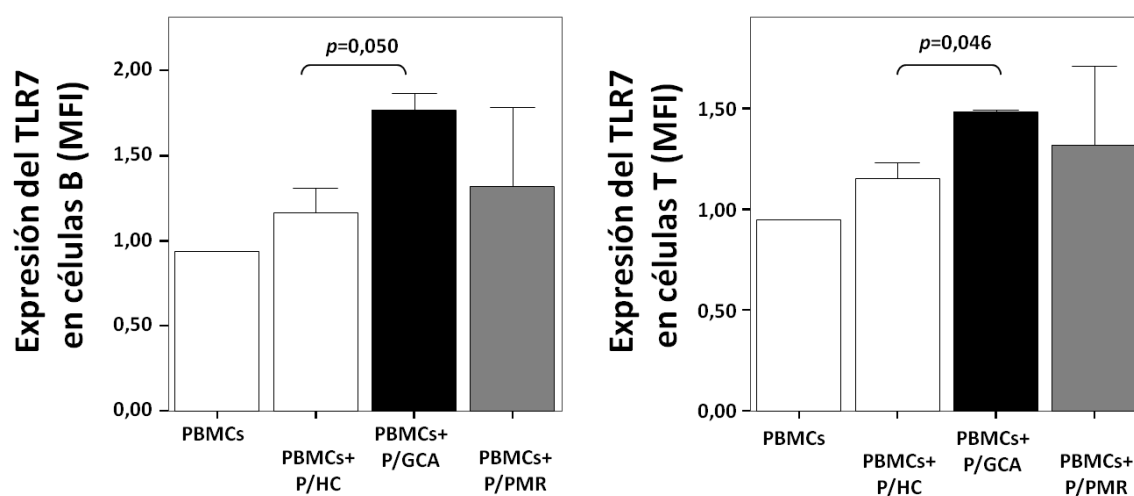


Figura 20.- Expresión del TLR7 en PBMCs de un individuo sano tras estimulación con plasma heterólogo de pacientes con ACG y PMR en fase activa de la enfermedad y de controles sanos durante 24 horas. La expresión del TLR7 en PBMCs de un individuo sano se evaluó mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como MFI y se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

Además, en cuanto a la expresión de genes de respuesta viral, los perfiles de expresión inducidos por el plasma de pacientes con PMR y ACG estuvieron marcados por una sobreexpresión de transcritos de respuesta a IFN tipo I. Como se puede observar en la **Figura 21**, los niveles de los transcritos IFN- β , IRF7, IFIT-1 y USP18 estaban elevados significativamente en relación a aquellos PBMCs estimulados con el suero de controles sanos de edades similares.

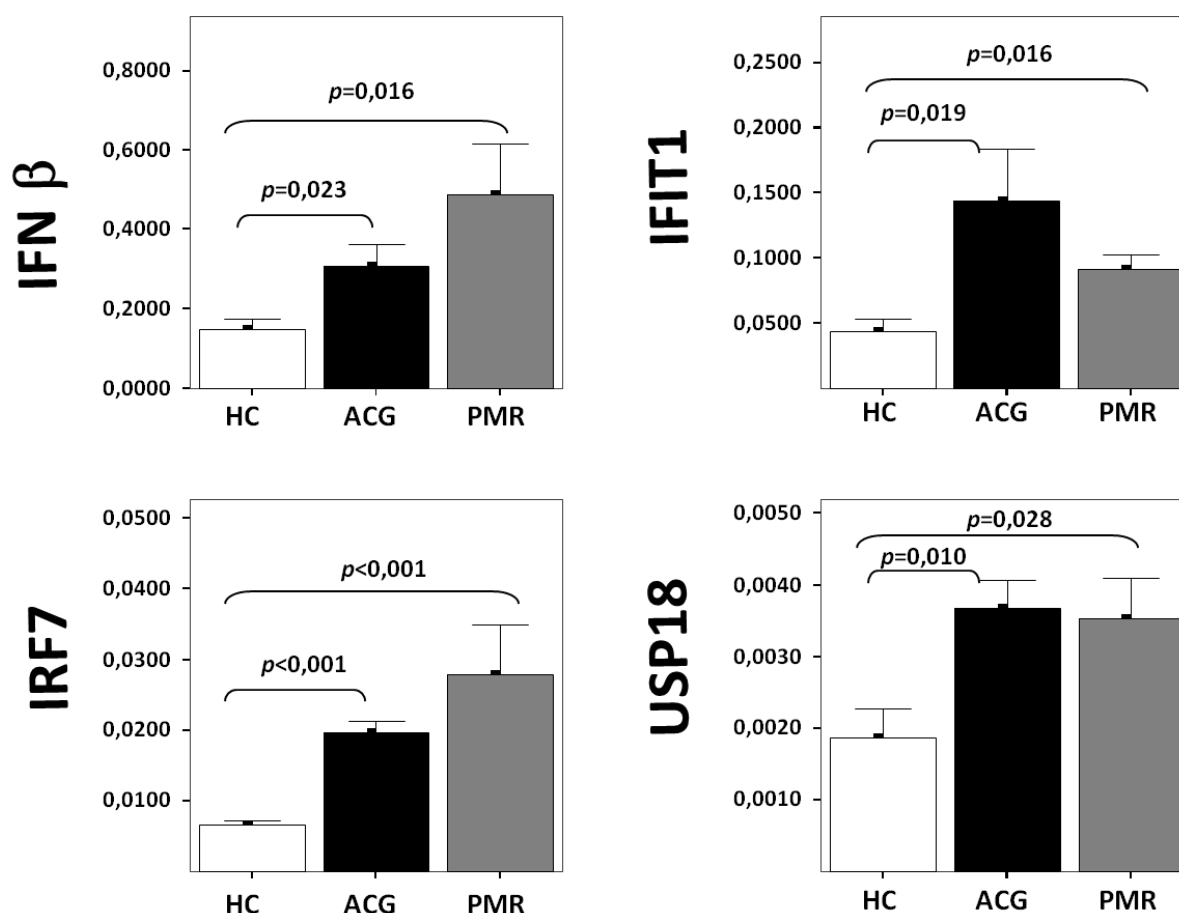


Figura 21. Expresión génica de genes de respuesta viral tras estimulación de PBMCs de un individuo sano con plasma heterólogo de pacientes con PMR y ACG en fase activa de la enfermedad y de controles sanos durante 24 horas. La expresión de genes de respuesta a IFN tipo I se determinó mediante RT-PCR. En las graficas se muestran los resultados y se expresan como los niveles de expresión normalizados con respecto al gen de la β -actina. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Solo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

3.7.-Identificación de virus respiratorios en plasma de pacientes con PMR y ACG activas

En base a los resultados obtenidos y ante una posible etiología viral, nos propusimos intentar identificar la presencia de posibles agentes etiológicos en muestras de plasmas de pacientes con enfermedad activa y controles sanos. Para ello, las muestras de plasma fueron analizadas mediante RT-PCR específica para un panel de virus respiratorios comunes, concretamente 13 virus de RNA y 1 virus de DNA. De este modo se identificó la presencia de unos de esos virus en 4 pacientes y en 2 controles (**Tabla 1**).

En cada paciente (2PMR y 2 ACG) se detectó un virus de ARNss diferente, no obteniendo resultados concluyentes. No hubo diferencias en el intervalo diagnóstico entre aquellos pacientes analizados como positivos o negativos para un virus en las muestras de plasma.

Tabla 1.- Identificación de proteínas virales en plasma de pacientes con PMR y ACG activas y controles sanos.

	Control (n=19)	PMR (n=21)	ACG (n=17)
Virus Influenza A/B	-	-	-
Virus respiratorio sincitial A/B	1	-	-
Virus parainfluenza 1	-	-	-
Virus parainfluenza -3	-	1	-
Virus parainfluenza-2,4	-	-	-
Coronavirus	1	1	-
Adenovirus	-	-	-
Rinovirus	-	-	1
Metapneumovirus humano	-	-	1

En resumen, nuestros datos sugieren que la activación del TLR7 por un ligando natural en pacientes con PMR y ACG durante la fase activa podría dar lugar a una desensibilización selectiva del receptor. Sin embargo, aún no se ha identificado al agente etiológico implicado en la patogénesis de estas enfermedades inflamatorias.

4. Estudios de asociación entre polimorfismos en el gen del TLR4 y TLR9 y susceptibilidad a padecer Arteritis de Células Gigantes y Polimialgia Reumática

Múltiples evidencias han demostrado que la activación de la inmunidad innata es un requisito imprescindible para inducir la inmunidad adquirida. En este sentido, los TLRs desempeñan un papel muy importante en la activación y regulación de la respuesta inmune innata y adquirida. Como se ha comentado en la introducción diversos estudios llevados a cabo en pacientes con ACG han demostrado la existencia de diferentes patrones de expresión de los TLRs en la arteria temporal, siendo claves en la activación y maduración de las DCs. Además, otros estudios han revelado que los polimorfismos en el gen del TLR4 se asocian con el desarrollo de otras enfermedades granulomatosas crónicas tales con la enfermedad de Crohn y Sarcoidosis [217,218], así como con infecciones [219] y enfermedades cardiovasculares [220,221]. Dos de los polimorfismos del gen del TLR4 (+896 A/G y +1196 T/C), junto con algunos polimorfismos del gen del TLR9 son funcionalmente relevantes y también se han relacionado con el desarrollo de enfermedades inflamatorias [222-225].

Tomando todos estos datos como referente y en vista de los resultados obtenidos en los estudios de expresión y función de TLRs en los que observamos un aumento de la expresión del TLR9 en células B de pacientes con ACG en fase activa, nos planteamos ahondar en el estudio de los polimorfismos del gen del TLR4 y TLR9, para ver si posibles polimorfismos en estos dos TLRs se asocian con susceptibilidad así como ver si sus consecuencias funcionales pudieran estar implicadas en la patogénesis de estas enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento.

4.1.-Análisis de las distribuciones alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen de TLR4 y TLR9 en PMR y ACG

Con el fin de evaluar la posible asociación entre los polimorfismos del gen del TLR4 (+896 A/G y +1196 C/T) y los polimorfismos del gen del TLR9 (T-1486C y T-1237C) con la susceptibilidad a la enfermedad, se realizó un estudio caso-control en muestras de población española.

Las poblaciones estudiadas se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg para ambos polimorfismos del gen del TLR4 (**Tabla 2**) y para ambos polimorfismos del gen del TLR9 (**Tabla 3**).

Tabla 2.- Distribución del p-valor del equilibrio Hardy-Weinberg de los polimorfismos del gen del *TLR4* en pacientes y controles sanos.

SNP	Heterocigosidad Observada	Heterocigosidad Esperada	p-valor
Controles			
<i>TLR4 +896A/G</i>	0,15873	0,15999	1,00000
<i>TLR4 +1196C/T</i>	0,10317	0,09824	0,31840
ACG			
<i>TLR4 +896A/G</i>	0,15278	0,14209	1,00000
<i>TLR4 +1196C/T</i>	0,12500	0,11801	1,00000
PMR			
<i>TLR4 +896A/G</i>	0,19512	0,17662	0,37317
<i>TLR4 +1196C/T</i>	0,11585	0,10948	1,00000

Abreviatura: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática; SNP: polimorfismo de nucleótido único.

Tabla 3.- Distribución del p-valor del equilibrio Hardy-Weinberg de los polimorfismos del gen del *TLR9* en pacientes y controles sanos.

SNP	Heterocigosidad Observada	Heterocigosidad Esperada	p-valor
Controles			
<i>TLR9 T-1486C</i>	0,44531	0,47963	0,46206
<i>TLR9 T-1237C</i>	0,26772	0,26641	1,00000
ACG			
<i>TLR9 T-1486C</i>	0,53608	0,47903	0,28706
<i>TLR9 T-1237C</i>	0,21649	0,22568	0,65232
PMR			
<i>TLR9 T-1486C</i>	0,45896	0,48279	0,44777
<i>TLR9 T-1237C</i>	0,21212	0,21917	0,57507

Abreviatura: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática; SNP: polimorfismo de nucleótido único.

La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes con ACG y PMR y controles para los polimorfismos del gen del *TLR4* se muestran en las **Tablas 4 y 5**. No encontramos diferencias significativas en la distribución de los polimorfismos entre los pacientes y los controles.

Tabla 4.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del *TLR4* (+896 A/G y +1196 T/C) en pacientes con ACG frente a controles sanos.

Genotipo	Controles (n=126)	ACG (n=72)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR4 +896 A/G [db SNP ID rs4986790]</i>				
Frecuencia genotípica				
AA	103/126 (81,7%)	61/72 (84,7%)		Referencia
AG	22/126 (17,5%)	11/72 (15,3%)	0,843	0,844 (0,383-1,878)
GG	01/126 (0,8%)	00/72 (0,0%)	-	--
Frecuencia alélica				
A	228/252 (90,5%)	133/144(92,4%)		Referencia
G	24/252 (9,5%)	11/144 (7,6%)	0,524	0,786 (0,373-1,731)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo A	125/126 (99,2%)	72/72 (100,0%)	-	--
Portador alelo G	23/126 (18,3%)	11/72 (15,3%)	0,697	0,808 (0,368-1,771)

Genotipo	Controles (n=126)	ACG (n=72)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR4 +1196 C/T [db SNP ID rs4986791]</i>				
Frecuencia genotípica				
CC	113/126 (89,7%)	63/72 (87,5%)		Referencia
CT	12/126 (9,5%)	09/72 (12,5%)	0,633	1,345 (0,537-3,367)
TT	01/126 (0,8%)	00/72 (0,0%)	--	--
Frecuencia alélica				
C	238/252 (94,4%)	135/144(93,7%)		Referencia
T	14/252 (5,6%)	09/144 (6,3%)	0,825	1,133 (0,478-2,688)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo C	125/126 (99,2%)	72/72 (100,0%)	--	--
Portador alelo T	13/126 (10,3%)	09/72 (12,5%)	0,645	1,242 (0,503-3,067)

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

Tabla 5.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del *TLR4* (+896 A/G y +1196 T/C) en pacientes con PMR frente a controles sanos.

Genotipo	Controles (n=126)	PMR (n=164)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR4 +896 A/G [db SNP ID rs4986790]</i>				
Frecuencia genotípica				
AA	103/126 (81,7%)	132/164 (80,5%)		Referencia
AG	22/126 (17,5%)	32/164 (19,5%)	0,761	1,135 (0,622-2,090)
GG	01/126 (0,8%)	00/164 (0,0%)	--	--
Frecuencia alélica				
A	228/252 (90,5%)	296/328 (90,2%)		Referencia
G	24/252 (9,5%)	32/328 (9,8%)	0,925	1,027 (0,589-1,792)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo A	125/126 (99,2%)	164/164 (100%)	--	--
Portador alelo G	23/126 (18,3%)	32/164 (19,5%)	0,880	1,086 (0,599-1,967)

Genotipo	Controles (n=126)	PMR (n=164)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR4 +1196 C/T [db SNP ID rs4986791]</i>				
Frecuencia genotípica				
CC	113/126 (89,7%)	145/164 (88,4%)		Referencia
CT	12/126 (9,5%)	19/164 (11,6%)	0,702	1,234 (0,575-2,647)
TT	01/126 (0,8%)	00/164 (0,0%)	--	--
Frecuencia alélica				
C	238/252 (94,4%)	309/328 (94,2%)	0,903	Referencia
T	14/252 (5,6%)	19/328 (5,8%)		1,045(0,514-2,128)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo C	125/126 (99,2%)	164/164 (100%)	--	--
Portador alelo T	13/126 (10,3%)	19/164 (11,6%)	0,851	1,139 (0,540-2,404)

Abreviaturas: PMR: polimialgia reumática; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

Además, no se observó ninguna diferencia significativa entre los pacientes con ACG y PMR (Tabla 6).

Tabla 6.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del *TLR4* (+896 A/G y +1196 T/C) en pacientes con PMR y ACG.

Genotipo	PMR (n=164)	ACG (n=72)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR4 +896 A/G [db SNP ID rs4986790]</i>				
Frecuencia genotípica				
AA	132/164 (80,5%)	61/72 (84,7%)		Referencia
AG	32/164 (19,5%)	11/72 (15,3%)	0,438	0,744 (0,352 - 1,574)
GG	00/164 (0,0%)	00/72 (0,0%)	-	--
Frecuencia alélica				
A	296/328 (90,2%)	133/144(92,4%)		Referencia
G	32/328 (9,8%)	11/144 (7,6%)	0,462	0,765 (0,374 - 1,564)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo A	164/164 (100%)	72/72 (100,0%)	-	--
Portador alelo G	32/164 (19,5%)	11/72 (15,3%)	0,438	0,744 (0,352 - 1,574)

Genotipo	PMR (n=164)	ACG (n=72)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR4 +1196 C/T [db SNP ID rs4986791]</i>				
Frecuencia genotípica				
CC	145/164 (88,4%)	63/72 (87,5%)		Referencia
CT	19/164 (11,6%)	09/72 (12,5%)	0,841	1,090 (0,468 – 2,542)
TT	00/164 (0,0%)	00/72 (0,0%)	-	--
Frecuencia alélica				
C	309/328 (94,2%)	135/144(93,7%)		Referencia
T	19/328 (5,8%)	09/144 (6,3%)	0,846	1,084 (0,478 – 2,458)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo C	164/164 (100%)	72/72 (100,0%)	-	--
Portador alelo T	19/164 (11,6%)	09/72 (12,5%)	0,841	1,090 (0,468 – 2,542)

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en los pacientes con ACG y PMR y controles para los polimorfismos del gen del TLR9 se muestran en las **Tablas 7 y 8**. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los polimorfismos entre los pacientes y los controles. Además, no se observó ninguna diferencia significativa entre pacientes con ACG y PMR (**Tabla 9**).

Tabla 7.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del TLR9 (T-1486C y T-1237C) en pacientes con ACG frente a controles sanos.

Genotipo	Controles (n=128)	ACG (n=97)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR9 T-1486C [db SNP ID rs187084]</i>				
Frecuencia genotípica				
TT	49/128 (38,3%)	33/97 (34,0%)		Referencia
TC	57/128 (44,5%)	52/97 (53,6%)	0,304	1,355 (0,759 - 2,419)
CC	22/128 (17,2%)	12/97 (12,4%)	0,618	0,810 (0,353 - 1,858)
Frecuencia alélica				
T	155/256 (60,5%)	118/194 (60,8%)		Referencia
C	101/256 (39,5%)	76/194 (39,2%)	0,952	0,988 (0,675 - 1,448)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo T	106/128 (82,8%)	85/97 (87,6%)	0,318	1,470 (0,688 - 3,141)
Portador alelo C	79/128 (61,7%)	64/97 (66,0%)	0,511	1,203 (0,693 - 2,087)
Genotipo	Controles (n=127)	ACG (n=97)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR9 T-1237C [db SNP ID rs5743836]</i>				
Frecuencia genotípica				
TT	90/127 (70,9%)	74/97 (76,3%)		Referencia
TC	34/127 (26,8%)	21/97 (21,6%)	0,369	0,751 (0,402 - 1,403)
CC	03/127 (2,4%)	02/97 (2,1%)	1,000	0,811 (0,132 - 4,981)
Frecuencia alélica				
T	214/254 (84,3%)	169/194 (87,1%)		Referencia
C	40/254 (15,7%)	25/194 (12,9%)	0,394	0,791 (0,462 - 1,357)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo T	124/127 (97,6%)	95/97 (97,9%)	1,000	1,149 (0,188 - 7,015)
Portador alelo C	37/127 (29,1%)	23/97 (23,7%)	0,364	0,756 (0,413 - 1,384)

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza

Tabla 8.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del *TLR9* (*T-1486C* y *T-1237C*) en pacientes con PMR frente a controles sanos.

Genotipo	Controles (n=128)	PMR (n=268)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR9 T-1486C [db SNP ID rs187084]</i>				
Frecuencia genotípica				
TT	49/128 (38,3%)	98/268 (36,6%)		Referencia
TC	57/128 (44,5%)	123/268 (45,9%)	0,749	1,079 (0,678 - 1,718)
CC	22/128 (17,2%)	47/268 (17,5%)	0,833	1,068 (0,580 - 1,969)
Frecuencia alélica				
T	155/256 (60,5%)	319/536 (59,5%)		Referencia
C	101/256 (39,5%)	217/536 (40,5%)	0,782	1,044 (0,770 - 1,415)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo T	106/128 (82,8%)	221/268 (82,5%)	0,932	0,976 (0,559 - 1,703)
Portador alelo C	79/128 (61,7%)	170/268 (63,4%)	0,741	1,076 (0,697 - 1,662)

Genotipo	Controles (n=127)	PMR (n=264)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR9 T-1237C [db SNP ID rs5743836]</i>				
Frecuencia genotípica				
TT	90/127 (70,9%)	203/264 (76,9%)		Referencia
TC	34/127 (26,8%)	56/264 (21,2%)	0,211	0,730 (0,446 - 1,196)
CC	03/127 (2,4%)	05/264 (1,9%)	0,682	0,739 (0,173 - 3,159)
Frecuencia alélica				
T	214/254 (84,3%)	462/528 (87,5%)		Referencia
C	40/254 (15,7%)	66/528 (12,5%)	0,214	0,764 (0,500 - 1,169)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo T	124/127 (97,6%)	259/264 (98,1%)	0,759	1,253 (0,295 - 5,328)
Portador alelo C	37/127 (29,1%)	61/264 (23,1%)	0,198	0,731 (0,453 - 1,179)

Abreviaturas: PMR: polimialgia reumática; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

Tabla 9.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del *TLR9* (*T-1486C* y *T-1237C*) en pacientes con PMR y ACG.

Genotipo	PMR (n=268)	ACG (n=97)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR9 T-1486C [db SNP ID rs187084]</i>				
Frecuencia genotípica				
TT	98/268 (36,6%)	33/97 (34,0%)		Referencia
TC	123/268 (45,9%)	52/97 (53,6%)	0,382	1,255 (0,753 - 2,092)
CC	47/268 (17,5%)	12/97 (12,4%)	0,467	0,758 (0,359 - 1,600)
Frecuencia alélica				
T	319/536 (59,5%)	118/194 (60,8%)		Referencia
C	217/536 (40,5%)	76/194 (39,2%)	0,750	0,947 (0,677 - 1,325)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo T	221/268 (82,5%)	85/97 (87,6%)	0,236	1,506 (0,762 - 2,978)
Portador alelo C	170/268 (63,4%)	64/97 (66,0%)	0,654	1,118 (0,686 - 1,821)

Genotipo	PMR (n=264)	ACG (n=97)	p-valor	OR (95% IC)
<i>Polimorfismo TLR9 T-1237C [db SNP ID rs5743836]</i>				
Frecuencia genotípica				
TT	203/264 (76,9%)	74/97 (76,3%)		Referencia
TC	56/264 (21,2%)	21/97 (21,6%)	0,922	1,029 (0,583 - 1,815)
CC	05/264 (1,9%)	02/97 (2,1%)	0,913	1,097 (0,208 - 5,778)
Frecuencia alélica				
T	462/528 (87,5%)	169/194 (87,1%)		Referencia
C	66/528 (12,5%)	25/194 (12,9%)	0,890	1,036 (0,633 - 1,695)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo T	259/264 (98,1%)	95/97 (97,9%)	0,918	0,917 (0,175 - 4,806)
Portador alelo C	61/264 (23,1%)	23/97 (23,7%)	0,904	1,034 (0,598 - 1,790)

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

El análisis de los haplotipos del TLR4 (+1196C/T y +896A/G) reveló que ninguno de los haplotipos se asoció significativamente con riesgo a la enfermedad entre pacientes y controles (**Tabla 10**). Sin embargo, dado el tamaño muestral (el tamaño muestral actual tiene una potencia estadística de 80% para detectar un OR $\geq 2,7$) y las frecuencias alélicas de los polimorfismos estudiados, no descartamos un riesgo genético en portadores del polimorfismo.

Tabla 10. Distribución haplotípica del gen del TLR4 (+1196 T/C y +896 A/G) en pacientes y controles.

Haplotipo	Controles (n=126)	ACG (n=72)	p-valor	OR (95 % IC)
TLR4 +1196C/T y +896A/G				
C/A	228/252 (90,5%)	132/144 (91,7%)	0,8560	1,16 (0,52-2,39)
C/G	10/252 (3,9%)	03/144 (2,1%)	0,3903	0,51 (0,13-1,90)
T/A	00/252 (0,0%)	01/144 (0,7%)	--	--
T/G	14/252 (5,6%)	08/144 (5,5%)	1,0000	1,00 (0,41-2,44)

Haplotipo	Controles (n=126)	PMR (n=164)	p-valor	OR (95 % IC)
TLR4 +1196C/T y +896A/G				
C/A	228/252 (90,5%)	294/328 (89,6%)	0,7813	0,91 (0,52-1,58)
C/G	10/252 (3,9%)	15/328 (4,6%)	0,8376	1,16 (0,51-2,62)
T/A	00/252 (0,0%)	02/328 (0,6%)	--	--
T/G	14/252 (5,6%)	17/328 (5,2%)	0,8543	0,92 (0,44-1,92)

Haplotipo	PMR (n=164)	ACG (n=72)	p-valor	OR (95 % IC)
TLR4 +1196C/T y +896A/G				
C/A	294/328 (89,6%)	132/144 (91,7%)	0,493	1,272 (0,638-2,535)
C/G	15/328 (4,6%)	03/144 (2,1%)	0,193	0,444 (0,127-1,559)
T/A	02/328 (0,6%)	01/144 (0,7%)	1,000	1,140 (0,103-12,680)
T/G	17/328 (5,2%)	08/144 (5,5%)	0,868	1,076 (0,453-2,554)

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

Igualmente, el análisis de los haplotipos del TLR9 (T-1486C y T-1237C) reveló que ninguno de los haplotipos se asoció significativamente con riesgo a la enfermedad entre pacientes y controles (Tabla 11).

Tabla 11. Distribución haplotípica del gen del *TLR9* (T-1486C y T-1237C) en pacientes y controles.

Haplotipo	Controles (n=127)	ACG (n=97)	p-valor	OR (95 % IC)
TLR9 T-1486C y TLR9 T-1237C				
TT	115/254 (45,3%)	93/194 (47,9%)	0,576	1,113 (0,765-1,619)
TC	38/254 (15,0%)	25/194 (12,9%)	0,532	0,841 (0,488-1,448)
CT	99/254 (39,0%)	76/194 (39,2%)	0,966	1,008 (0,687-1,479)
CC	02/254 (0,7%)	00/194 (0,0%)	-	-

Haplotipo	Controles (n=127)	PMR (n=264)	p-valor	OR (95 % IC)
TLR9 T-1486C y TLR9 T-1237C				
TT	115/254 (45,3%)	249/528 (47,2%)	0,621	1,079 (0,799-1,457)
TC	38/254 (15,0%)	64/528 (12,1%)	0,269	0,784 (0,509-1,209)
CT	99/254 (39,0%)	213/528 (40,3%)	0,715	1,059 (0,779-1,438)
CC	02/254 (0,7%)	02/528 (0,4%)	0,599	0,479 (0,067-3,422)

Haplotipo	PMR (n=264)	ACG (n=97)	p-valor	OR (95 % IC)
TLR9 T-1486C y TLR9 T-1237C				
TT	249/528 (47,2%)	93/194 (47,9%)	0,853	1,032 (0,742-1,434)
TC	64/528 (12,1%)	25/194 (12,9%)	0,781	1,072 (0,654-1,759)
CT	213/528 (40,3%)	76/194 (39,2%)	0,777	0,952 (0,680-1,334)
CC	02/528 (0,4%)	00/194 (0,0%)	-	-

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

Además de nuestro grupo, otros dos grupos totalmente independientes han evaluado la influencia de los polimorfismos en el gen del TLR4 con la susceptibilidad a padecer ACG, encontrando el grupo de Palomino-Morales y col. [222] una asociación con la susceptibilidad a padecer ACG, mientras que el grupo de Boiardi y col. [223] no encuentran dicha asociación significativa pero sí que ven una posible tendencia posiblemente debido a que su estudio se realizó en un número menor de pacientes.

Dado que los resultados de estudios previos han sido más bien inconsistentes, llevamos a cabo un meta-análisis del polimorfismo del gen del TLR4 (+896 A/G) con susceptibilidad a padecer ACG. Este meta-análisis incluyó los 3 estudios caso-control obteniéndose un total de 437 pacientes y 1023 controles. En la **Figura 22** se puede observar como el meta-análisis acumulado no mostró modificación en el efecto estimado sobre dos de los estudios iniciales, pero disminuyó el punto estimado mediante la adición de los datos de esta tesis.

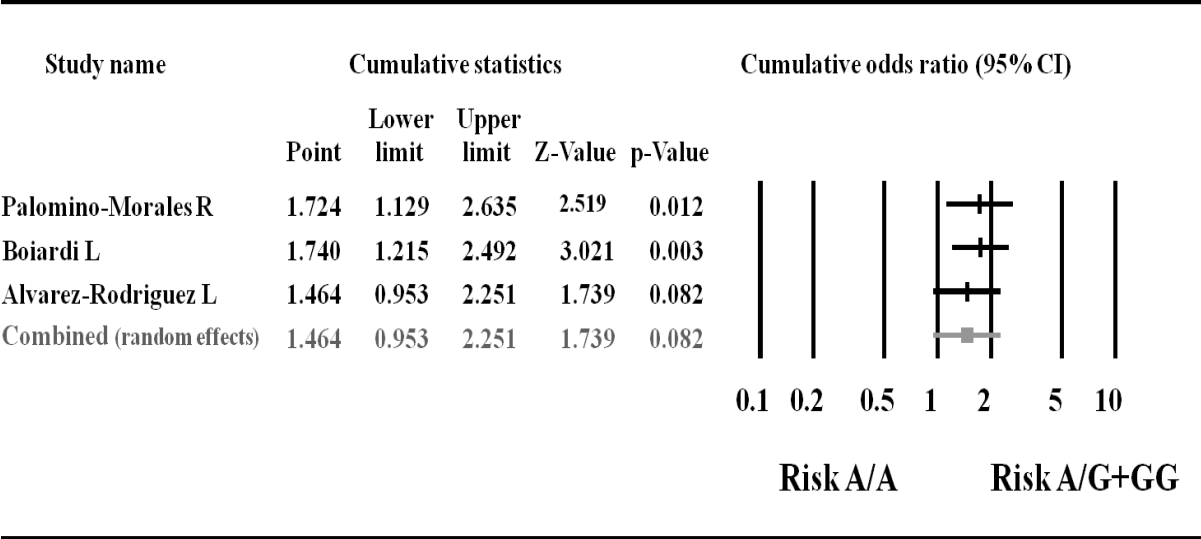


Figura 22. Resultados del meta-análisis acumulativo para el polimorfismo del gen del TLR4 (+896A/G).

El OR de los efectos aleatorios combinados no fue significativo (OR 1,46, 95% IC: 0,95–2,25; $p=0,082$). El estudio visual de los gráficos *funnel* es compatible con la asimetría, principalmente con el posible espacio en el margen superior izquierdo del gráfico **Figura 23**. Sin embargo, el análisis de regresión ponderada de Egger sugirió una baja probabilidad ($p=0,509$). Existen algunas evidencias sugestivas de heterogeneidad moderada-alta entre los tres estudios, $I^2=34,2\%$ (95% IC: 0–55,2%).

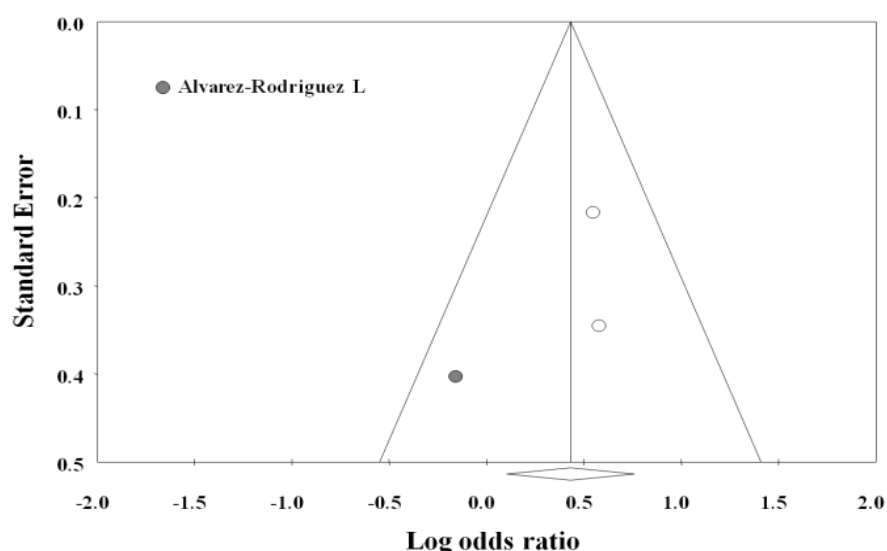


Figura 23. Gráficos Funnel de error estandar vs log odds ratio.

En resumen, aunque los resultados pueden estar limitados por el pequeño número de estudios incluidos, este meta-análisis acumulativo no demostró una asociación del polimorfismo del gen del TLR4 (+896 A/G) con susceptibilidad a ACG.

4.2.-Estudios de asociación de los polimorfismos del gen del TLR4 y TLR9 con la gravedad en pacientes con PMR y ACG

La gravedad de la ACG y la PMR se estudió analizando la presencia de al menos una recaída/recidiva, el número de recaídas/recidivas, la duración del tratamiento con CS y la dosis acumulada de prednisona. Dado que los pacientes presentaban diferentes tiempos de seguimiento y la media de la duración del tratamiento con CS era de alrededor de dos años, sólo aquellos pacientes con más de dos años de seguimiento se incluyeron en este estudio.

En la **Figura 24** observamos como el genotipo CC del polimorfismo TLR4 (+1196 C/T) se asoció con una mayor dosis de prednisona acumulada en los pacientes con PMR ($5,6 \pm 4,8$ vs. $2,1 \pm 0,5$ gr; $p=0,031$). Esto se debió principalmente a una tendencia de mayor duración del tratamiento con prednisona ($41,8 \pm 39,3$ versus $16,0 \pm 10,4$ meses) y a un mayor número de recaídas ($0,9 \pm 1,3$ versus $0,0 \pm 0$) para este genotipo.

Asimismo, en los pacientes con ACG, independientemente del tiempo de seguimiento, también se analizó la presencia de manifestaciones isquémicas y de síntomas polimiálgicos. No se observó asociación significativa entre los polimorfismos del gen TLR4 estudiados y cualquiera de las variables. Por tanto, los polimorfismos en el gen del TLR4 no se asocian con gravedad en pacientes con ACG.

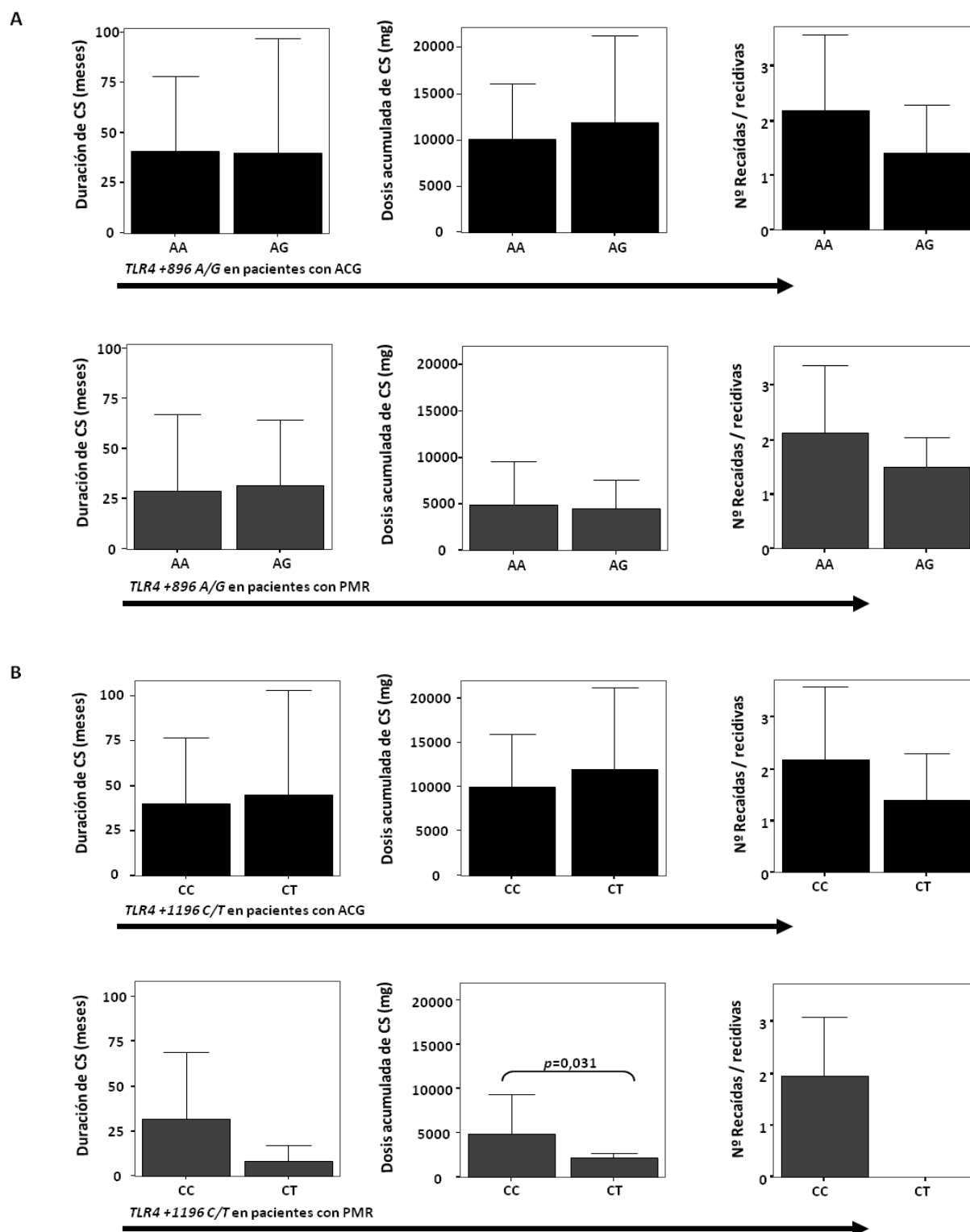


Figura 24. Pronóstico de la enfermedad en pacientes con ACG y PMR según el genotipo del TLR4. A) Polimorfismos del gen del TLR4 (+896 T/C). B) Polimorfismos del gen del TLR4 (+1196 T/C). La gravedad de la enfermedad se evaluó acorde a las variables: duración del tratamiento con CS en meses (Izquierda), dosis acumulada de CS en mg (centro) y número de recaídas/recidivas (derecha) según los genotipos del TLR4. Los datos se representan como la media $\pm$ DE para aquellos pacientes con más de dos años de seguimientos (ACG: barras negras, PMR, barras grises). Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

En el caso de los estudios de asociación de los polimorfismos del gen del TLR9, no se observó asociación entre los polimorfismos del gen de TLR9 (T-1486 C y T-1237C) y la intensidad de la respuesta de fase aguda (VSG) en los pacientes con PMR. En los pacientes con ACG también se analizó la presencia de manifestaciones isquémicas y síntomas polimiálgicos no encontrándose asociación entre los polimorfismos del gen del TLR9 y ninguna de las variables.

En cuanto a la gravedad, de nuevo, no se halló asociación significativa entre los polimorfismos en el gen del TLR9 y ninguna de las variables estudiadas, tales como presencia de al menos una recaída/recidiva, el número de recaídas/recidivas, la duración del tratamiento con CS y la dosis acumulada de prednisona en los pacientes con PMR (**Figura 25A y 25B**). Sin embargo, los pacientes con ACG portadores del genotipo TC para el polimorfismo TLR9 T-1486C tuvieron una duración menor del tratamiento con CS ($42,7 \pm 27,6$ versus $68,8 \pm 46,4$ meses) y aquellos portadores del genotipo CC para el polimorfismo TLR9 T-1237C tuvieron un mayor número de recaídas/recidivas ($3,5 \pm 2,1$ versus $0,98 \pm 1,3$). Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, encontramos una tendencia similar en la dosis acumulada de prednisona (**Figura 25A y 25B**). Por tanto, los polimorfismos en el gen del TLR9 no se asocian con el fenotipo de la enfermedad pero pueden asociarse con gravedad en pacientes con ACG.

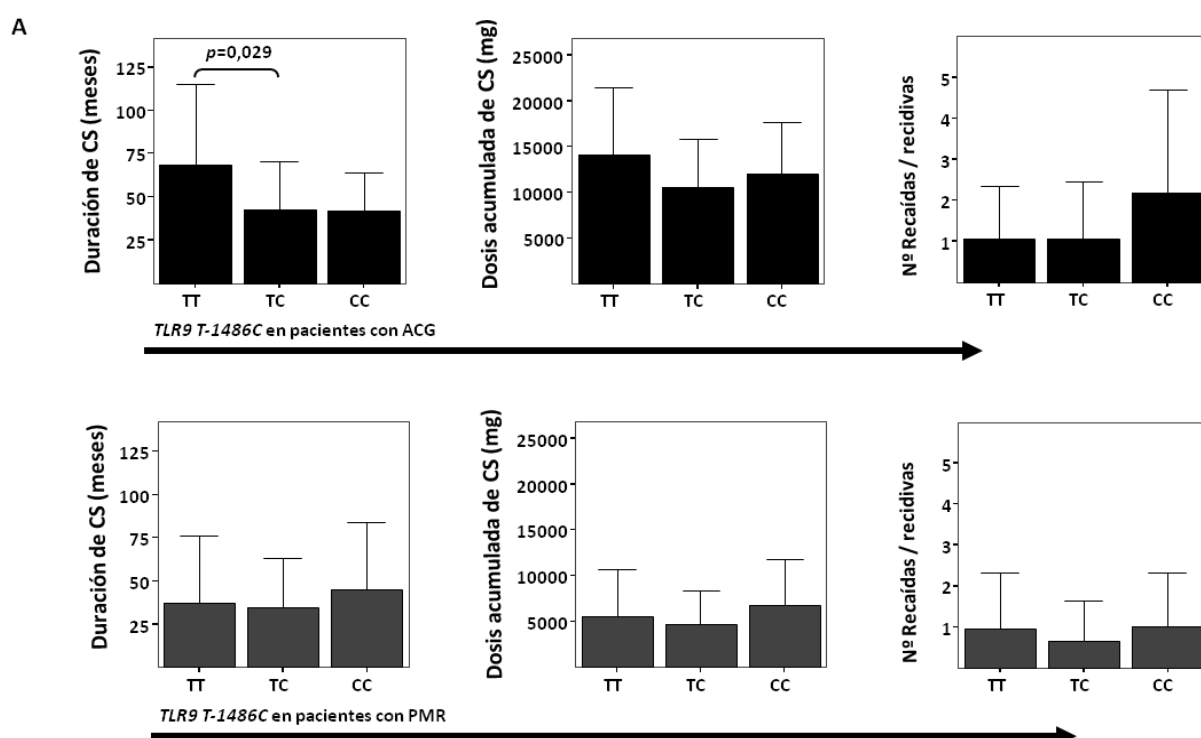


Figura 25A. Pronóstico de la enfermedad en pacientes con ACG y PMR según el genotipo del TLR9. A) Polimorfismos del gen del TLR9 (T-1486C). La gravedad de la enfermedad se evaluó acorde a las variables: duración del tratamiento con CS en meses (Izquierda), dosis acumulada de CS en mg (centro) y número de recaídas/recidivas (derecha) según los genotipos del TLR9. Los datos se representan como la media $\pm$ DE para aquellos pacientes con más de dos años de seguimiento (ACG, barras negras; PMR, barras grises). Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

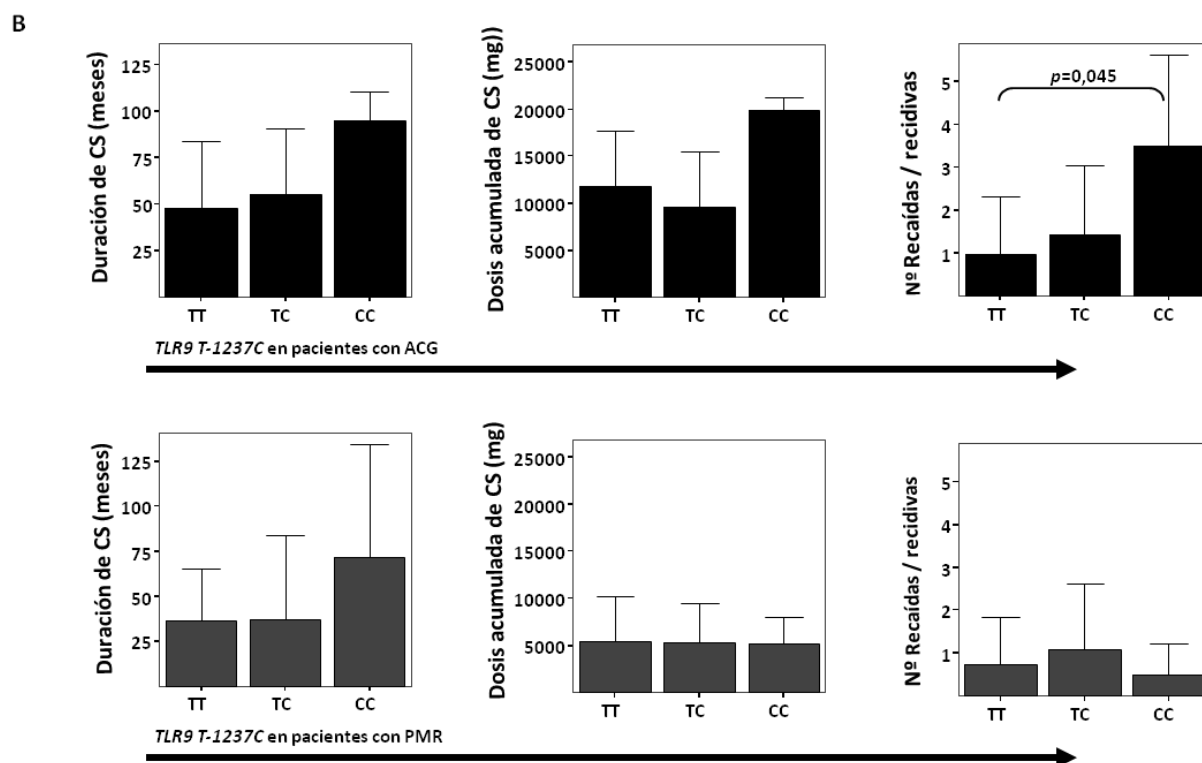


Figura 25B. Pronóstico de la enfermedad en pacientes con ACG y PMR según el genotipo del TLR9. B) Polimorfismos del gen del TLR9 (T-1237C). La gravedad de la enfermedad se evaluó acorde a las variables: duración del tratamiento con CS en meses (izquierda), dosis acumulada de CS en mg (centro) y número de recaídas/recidivas (derecha) según los genotipos del TLR9. Los datos se representan como la media $\pm$ DE para aquellos pacientes con más de dos años de seguimiento (ACG, barras negras; PMR, barras grises). Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

4.3.-Expresión y función de los TLRs según el genotipo de los polimorfismos en gen del TLR4 y TLR9 en pacientes con ACG y PMR activas y controles sanos

En base a los resultados obtenidos hasta el momento en los que no observamos ninguna asociación de los polimorfismos génicos con la susceptibilidad a la enfermedad y dado que estudios anteriores habían demostrado la existencia de expresión del TLR4 en pacientes con ACG, quisimos ir más allá y ver si estos polimorfismos pudieran estar afectando a la expresión del receptor. Para ello la expresión del TLR4 y TLR9 se evaluó en subpoblaciones de células mononucleares mediante citometría de flujo. Además para evaluar las consecuencias funcionales de los polimorfismos, la función del TLR4 se estudió igualmente en células mononucleares estimulando con un ligando específico para el TLR4 con es el LPS y midiendo la producción intracelular de citocinas por citometría de flujo. Aunque los resultados están probablemente limitados por el tamaño muestral, no se encontró asociación con la expresión de TLR4 en PBMCs (**Figura 26**) o un fenotipo distinto de respuesta del TLR4 con los genotipos +896 A/G y +1196 C/T en pacientes ni en controles (**Figura 27**).

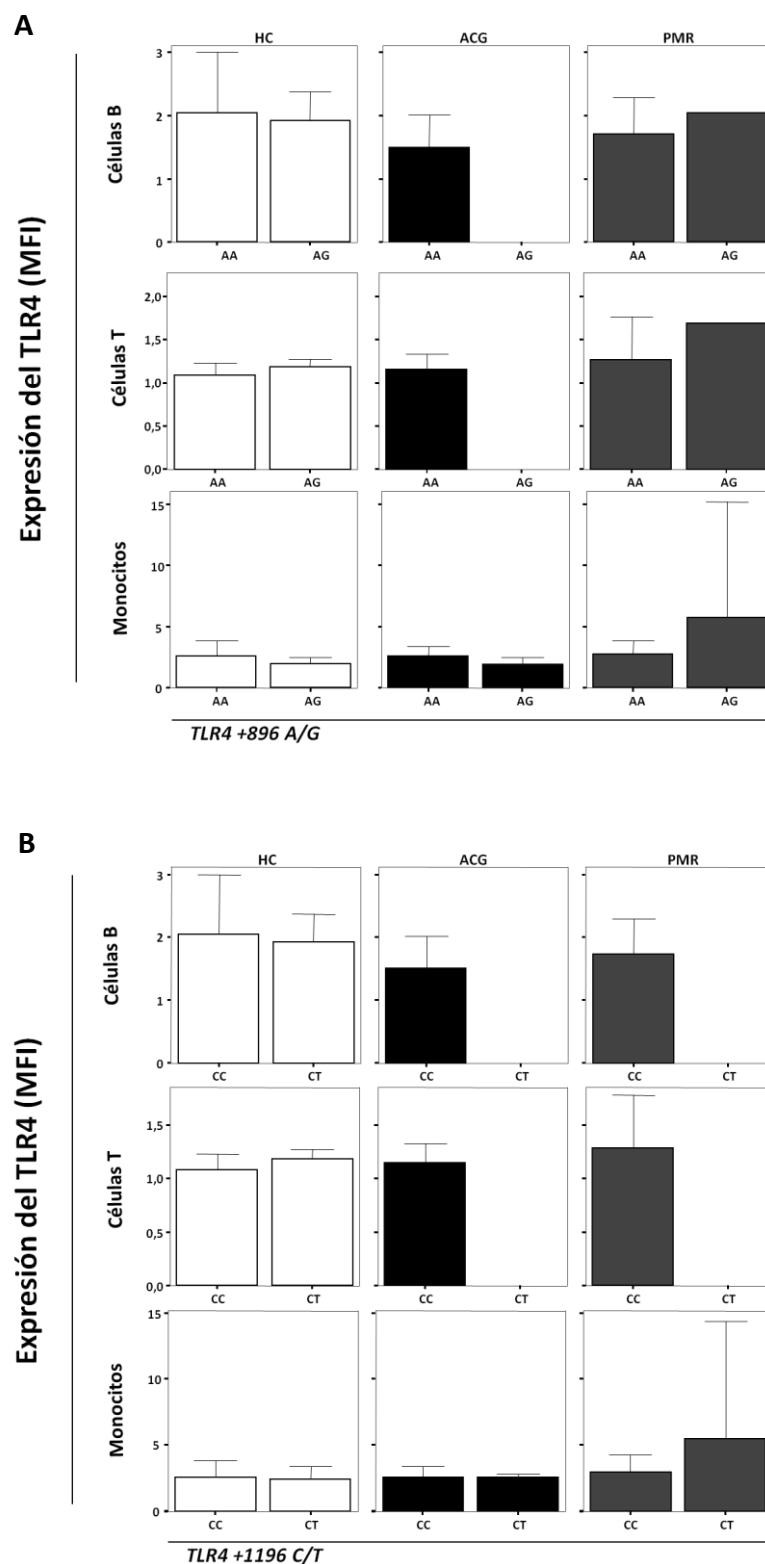


Figure 26- Expresión del TLR4 en subpoblaciones de PBMCs (células B, T y monocitos) según el genotipo del TLR4 en pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y en controles sanos. **A)** Polimorfismos del gen del TLR4 (+896 A/G) y **B)** Polimorfismos del gen del TLR4 (+1196 T/C). Los datos se expresan como la MFI en PBMCs.

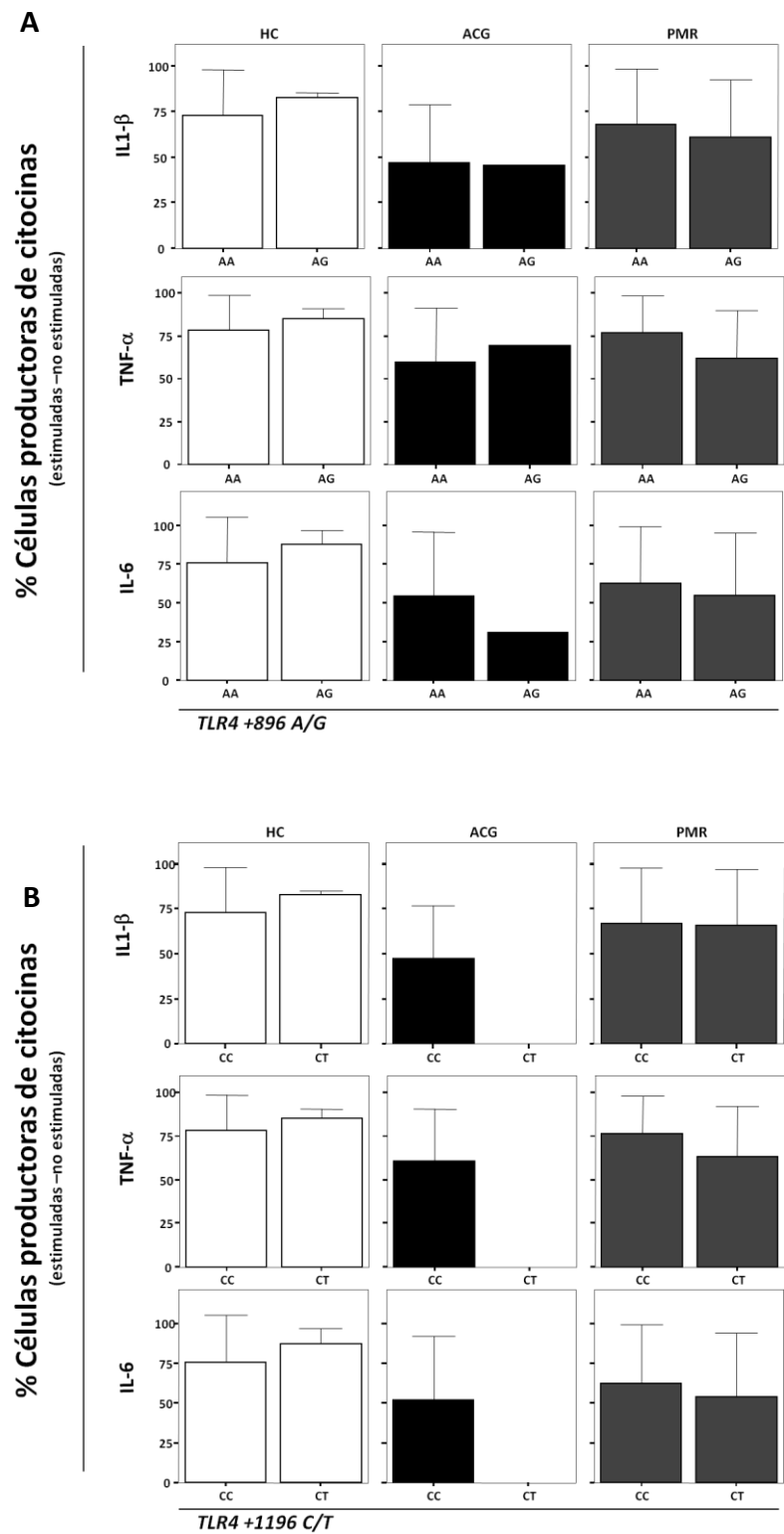


Figure 27- Función del TLR4 según el genotipo del TLR4 en pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y en controles sanos. A) Polimorfismos del gen del TLR4 (+896 A/G) y B) Polimorfismos del gen del TLR4 (+1196 T/C). La función del TLR4 se evaluó como el porcentaje de monocitos productores de citocinas proinflamatorias intracelulares tras estimulación del TLR4 con agonista específico (LPS). Los resultados se expresan como el delta del cultivo con estímulo respecto al cultivo sin estímulo. Los datos se representan como la media ±DE.

Respecto a los SNPs del TLR9, en la **Figura 28** se puede comprobar como en los pacientes con PMR, los portadores del genotipo CC para el polimorfismo TLR9 T-1486C se asociaron con un aumento en la expresión del TLR9 en células B circulantes. Sin embargo, no se encontraron otras asociaciones significativas entre células T circulantes ni monocitos, ni en los otros grupos de estudio.

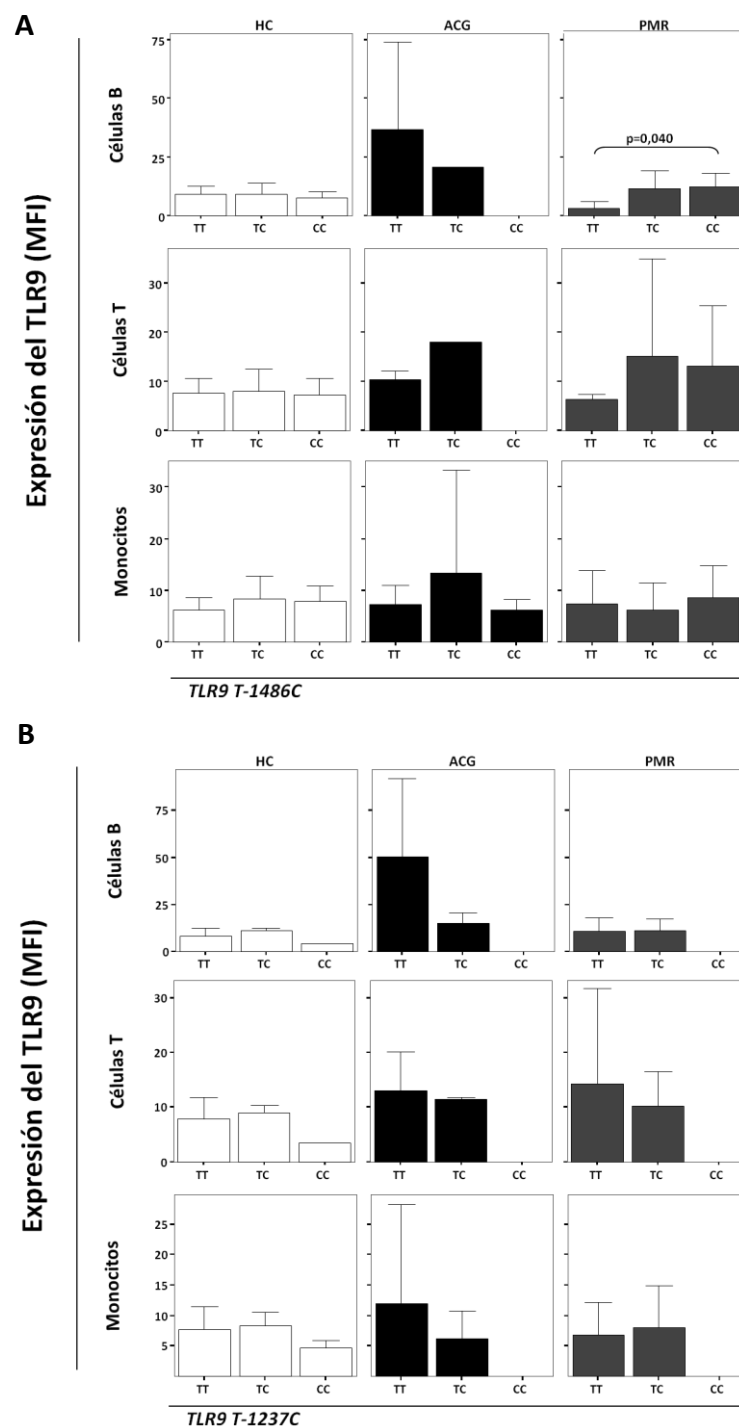


Figure 28- Expresión del TLR9 en subpoblaciones de PBMCs según el genotipo del TLR9 en pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y en controles sanos. A) Polimorfismos del gen del TLR9 (T-1486C) y B) Polimorfismos del gen del TLR9 (T-1237C). Los datos se expresan como la MFI en PBMCs y se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

En resumen, los polimorfismos del TLR4 y TLR9 no se asocian con susceptibilidad a ACG ni PMR. Sin embargo es posible que polimorfismos en el gen del TLR9 puedan asociarse con la gravedad en ACG. En cuanto a las posibles consecuencias funcionales, los polimorfismos del gen del TLR4 no influyen en la funcionalidad del TLR4 en las patologías estudiadas.

5. Niveles séricos de la Vitamina D y polimorfismos del receptor de la vitamina D en los pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento

La vitamina D posee capacidad inmunomoduladora y ejerce sus mecanismos efectores sobre la respuesta inmune innata y adquirida a través de una vía que implica al VDR. Los niveles circulantes de la vitamina D claramente disminuyen con la edad y existe una posible relación entre la vitamina D y las alteraciones del sistema inmune.

En este sentido, diversos estudios han puesto de manifiesto la asociación de niveles disminuidos de vitamina D circulantes con el desarrollo de diversos procesos autoinmunes, y un posible efecto beneficioso con la corrección de este déficit en estas enfermedades [76,80,83,101,102]. Por otro lado, los polimorfismos en el gen VDR podrían afectar a la unión de la vitamina D por cambios en la estructura del VDR y a sus efectos inmunomoduladores. Así, variaciones genéticas en el gen VDR se han asociado con susceptibilidad a enfermedades autoinmunes e inflamatorias.

Como se ha comentado a lo largo de esta tesis, la etiopatogénesis de estas 2 enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento sigue siendo desconocida, aunque es posible que factores genéticos y ambientales puedan estar implicados. Hasta la fecha no se han estudiado los niveles de vitamina D circulantes en estas patologías a pesar de que probablemente los efectos inmunomoduladores de la vitamina D puedan influenciar en la patogénesis de la ACG y PMR.

Por todo ello, nuestro primer planteamiento fue evaluar los niveles de vitamina D circulantes en ambas patologías y determinar su influencia en determinadas manifestaciones clínicas y analíticas de las mismas. En segundo lugar, analizar si existe una posible asociación de los polimorfismos en el gen VDR con la susceptibilidad a padecer PMR y ACG. Y, finalmente, investigar si los polimorfismos en el gen VDR se correlacionan con los niveles de vitamina D y las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

5.1.-Los pacientes con ACG presentan niveles de vitamina D circulantes disminuidos

El análisis de los niveles séricos de 25(OH)D₃ mostró que tanto los pacientes como los controles presentaban niveles de 25(OH)D₃ disminuidos, encontrándose en la mayoría de los casos por debajo de 30 ng/ml. Sin embargo, tanto los pacientes con ACG como con PMR presentaban niveles de 25(OH)D₃ compatibles con insuficiencia (< 20 ng/ml). En la **Figura 29** se puede apreciar como los pacientes con ACG activa, pero no en el caso de los pacientes con PMR activa, mostraban un descenso significativo en los niveles séricos de la 25(OH)D₃ comparados con los controles sanos de edad similar. Además, tampoco se observaron diferencias entre ambos grupos de pacientes con la enfermedad activa (**Figura 29**). Tales cambios no se acompañaron por cambios significativos en los niveles séricos de PTH (datos no mostrados).

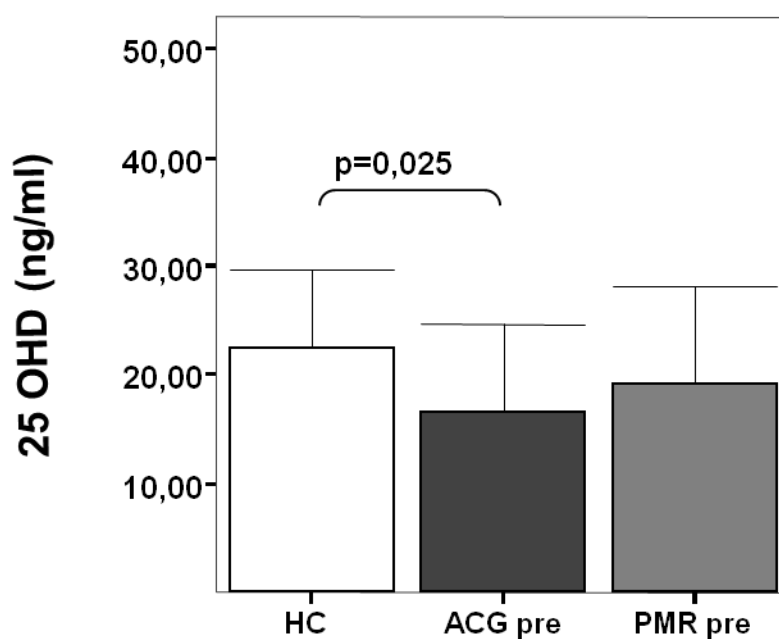


Figura 29.- Niveles circulantes de 25-OH-Vitamina D en HC y pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y sin tratamiento esteroideo. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

En cuanto a su influencia en las manifestaciones clínicas, en los pacientes con ACG no encontramos diferencias en los niveles de 25(OH)D₃ según la presencia de manifestaciones isquémicas o síntomas polimiálgicos. Tampoco encontramos diferencias en los niveles de 25(OH)D₃ al dividir a los pacientes con PMR clásica (VSG $\geq$ 40mm/h) o con VSG “baja” (VSG < 40mm/h).

5.2.-Los niveles de vitamina D circulantes se correlacionan con la edad y se localizan en el rango inferior de los valores normales en la mayoría de los individuos sanos

Como se ha comentado anteriormente, resultados previos en nuestro laboratorio han demostrado que el proceso de envejecimiento se asocia con una desregulación en el perfil de citocinas circulantes, principalmente debida a un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias[72], así como con cambios en la expresión y función de ciertos TLRs en individuos sanos [70]. La vitamina D tiene un profundo impacto en el sistema inmune actuando como inmunomodulador previniendo una expresión excesiva de citocinas proinflamatorias. Por otro lado, los niveles circulantes de vitamina D claramente disminuyen con la edad [226].

Tomando todo esto como referente, nos planteamos profundizar más en la influencia de la edad y en los efectos de la vitamina D sobre las funciones de las células del sistema inmune innato en individuos sanos, principalmente sobre la expresión y función de los TLRs.

En la **Figura 30** se puede observar como los niveles séricos de 25(OH)D₃ descienden con la edad y se localizan en el rango inferior de la normalidad, siendo dicho descenso significativo en los individuos de edad media y edad avanzada comparado con los individuos jóvenes (**Figura 30**). En general, un 5% de individuos jóvenes, un 21,7% de individuos de edad media y un 31,6% de individuos mayores tenían niveles de 25(OH)D₃ inferiores a 20ng/ml.

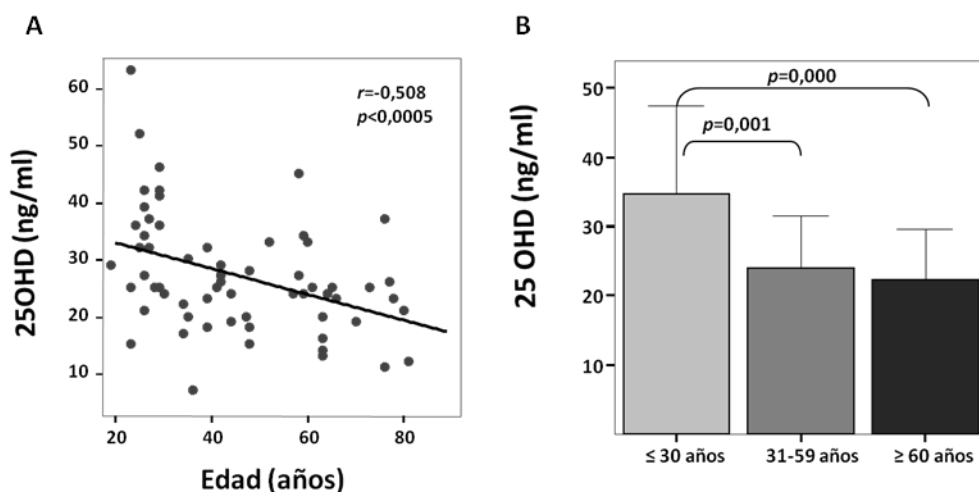


Figura 30. Influencia de la edad sobre los niveles de vitamina D en individuos sanos (HC).

A) Los datos se muestran como diagrama de dispersión entre los niveles circulantes de vit.D y la edad. El coeficiente de correlación de Spearman (r) y el nivel de significación (p) se muestran en la esquina superior derecha del gráfico.

B) La figura muestra los niveles circulantes de vitD en HC dentro de 3 grupos de edad: jóvenes (rango edad 20-30) edad media (rango edad: 31-59) y ancianos (rango edad: 60-86). Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

5.3.-Los niveles de vitamina D circulantes en individuos sanos se asocian con la expresión y función del TLR7

En cuanto a los efectos de la edad y los niveles de vitamina D sobre el sistema inmune en individuos sanos, uno de los hallazgos más consistentes de nuestro estudio fue una asociación significativa de los niveles séricos de 25(OH)D₃ con cambios en la expresión y un defecto en la función de ciertos TLRs, especialmente aquellos implicados en respuesta viral, como es el TLR7 (**Figura 31**).

Tal y como evidencia la **Figura 31A** los niveles de 25(OH)D₃ mostraron una correlación negativa significativa con la expresión (MFI) del TLR7 en células B y monocitos y también una clara tendencia en células T ($r=-0.350$, $p=0.054$). Los niveles de 25(OH)D₃ presentaron una correlación positiva significativa con la producción de las tres citocinas proinflamatorias tras activación específica del TLR7 con Imiquimod (**Figura 31B**). No se halló correlación significativa para ninguno de los otros TLRs

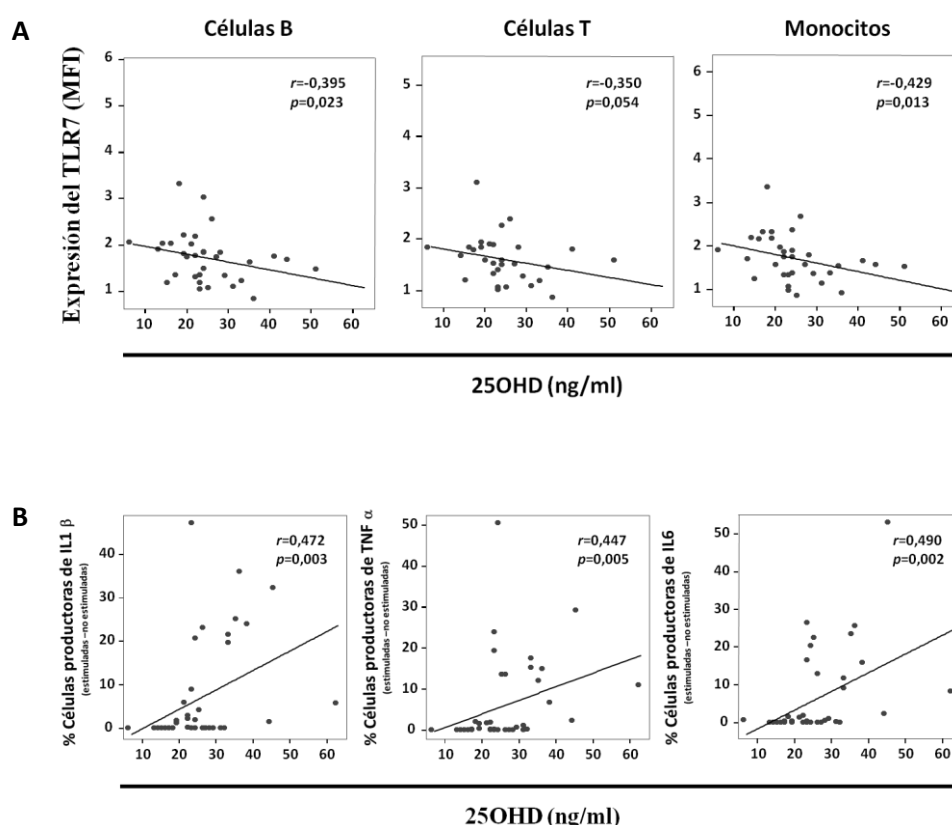


Figura 31. Correlación entre niveles circulantes de Vitamina D y la expresión y función de TLRs en individuos sanos (HC).

A) Los diagramas de dispersión muestran los datos de expresión de TLR7 en diferentes subpoblaciones de PBMCs (Células B, células T y monocitos) y los niveles de 25(OH)D₃ en individuos sanos. La expresión de TLRs se evaluó por citometría de flujo y se representa como MFI.

B) Los diagramas de dispersión muestran los datos entre los niveles circulantes de 25(OH)D₃ y la respuesta de TLR7 a agonistas específicos en monocitos circulantes. La respuesta de TLR7 se determinó por la producción de citocinas proinflamatorias intracelulares (IL-1 β , TNF- α , IL-6) mediante citometría de flujo. La producción se representa como la diferencia del porcentaje de células que expresan citocinas tras estimulación in vitro menos aquellas sin estimulación. Los coeficientes de correlación de Spearman (r) y los niveles de significación (p) se muestran en la esquina superior derecha del gráfico. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0.05$.

Dado que los resultados más consistentes, tanto en expresión como en función, se encontraron para el TLR7, estos resultados se analizaron en los diferentes grupos edad según la distribución de las estaciones soleadas, observándose que aquellos individuos de edad avanzada mostraban un descenso significativo de la función del TLR7 (**Figura 32**) durante las estaciones más oscuras en todas las subpoblaciones celulares, lo cual podría tener consecuencias epidemiológicas y clínicas.

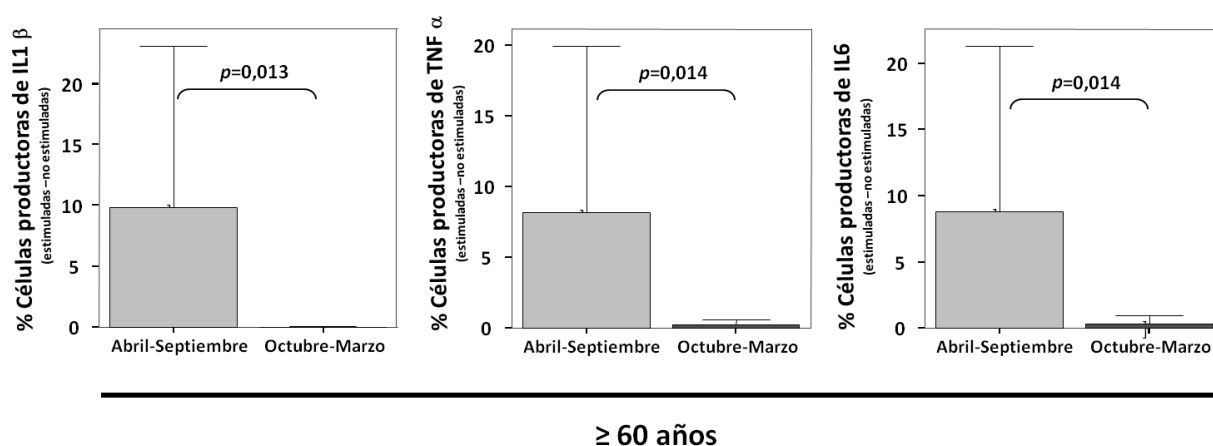


Figure 32. Función del TLR7 según las estaciones soleadas en ancianos. La respuesta de TLR7 se determinó por la producción de citocinas proinflamatorias intracelulares (IL-1 β , TNF- α , IL-6) mediante citometría de flujo. La producción se representa como la diferencia del porcentaje de células que expresan citocinas tras estimulación in vitro menos aquellas sin estimulación. Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$.

5.4.-Los niveles circulantes de catelicidina descienden con la edad y se correlacionan con los niveles circulantes de vitamina D

Diversos estudios sugieren que la 1,25(OH) $_2$ D $_3$ estimula la producción de péptidos antimicrobianos, principalmente catelicidina, en respuesta a posibles patógenos [85]. Puesto que se cree que esta estimulación depende del estado de vitamina D, nos planteamos analizar la posible asociación de los niveles circulantes de 25(OH)D $_3$ con los niveles plasmáticos de catelicidina en individuos sanos.

Además, a raíz de los resultados obtenidos anteriormente en los que hemos demostrado que los niveles circulantes de vitamina D se correlacionan con la edad, en este caso quisimos también evaluar si la edad influye en los niveles plasmáticos de catelicidina,

Así, en la **Figura 33** se puede observar como los niveles de catelicidina descenden con la edad.

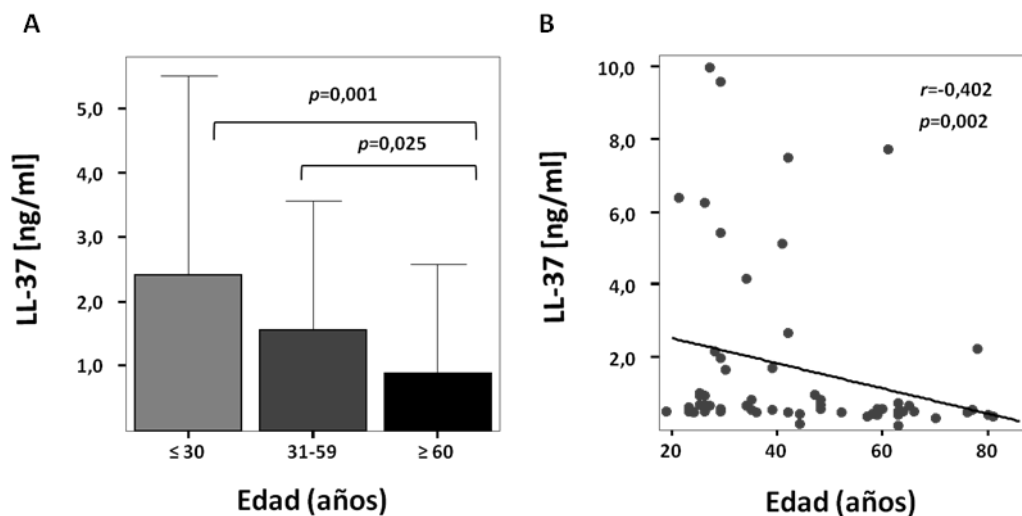


Figure 33.- Determinación de los niveles circulantes de catelicidina en individuos sanos.

A) La figura muestra los niveles circulantes de catelicidina en HC dentro de 3 grupos de edad: jóvenes (rango edad 20-30) edad media (rango edad: 31-59) y ancianos (rango edad: 60 -86). Los datos se representan como la media $\pm$ DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p < 0,05$

B) Los datos se muestran como diagrama de dispersión entre los niveles circulantes de catelicidina y la edad. El coeficiente de correlación de Spearman (r) y el nivel de significación (p) se muestran en la esquina superior derecha del gráfico.

Además de la relación con la edad en la **Figura 34** se puede apreciar como la catelicidina se correlaciona positivamente con los niveles circulantes de 25(OH)D₃

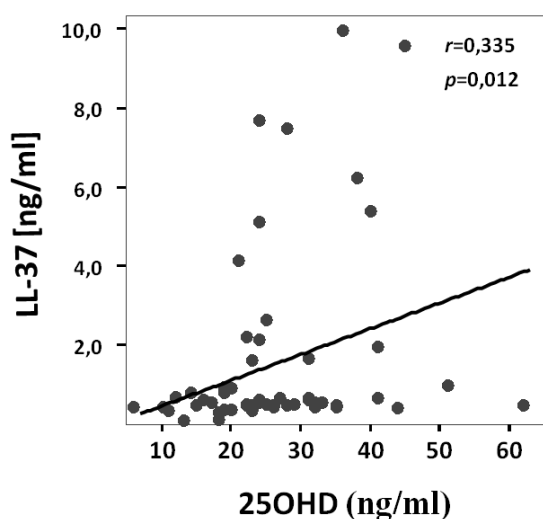


Figura 34. Correlación entre los niveles circulantes de catelicidina y los niveles de 25(OH)D₃ en individuos sanos.

Los datos se muestran como diagrama de dispersión entre los niveles circulantes de catelicidina y los niveles circulantes de 25(OH)D₃ la edad. El coeficiente de correlación de Spearman (r) y el nivel de significación (p) se muestran en la esquina superior derecha del gráfico.

En resumen, los niveles séricos de 25(OH)D₃ disminuyen con la edad y están especialmente disminuidos en pacientes con ACG. Además, la edad y los niveles de vitamina D circulantes se correlacionan con los niveles plasmáticos de catelicidina en individuos sanos.

5.5.-Análisis de las distribuciones alélicas y genotípicas de los polimorfismos del gen de VDR en PMR y ACG

La distribución de frecuencias genotípicas observadas estaban en equilibrio de Hardy-Weinberg excepto para el polimorfismo BsmI en el grupo de controles sanos (Tabla 12).

Tabla 12.- Distribución del p-valor del equilibrio Hardy-Weinberg de los polimorfismos del gen del VDR en pacientes y controles sanos.

SNP	Heterocigosidad Observada	Heterocigosidad Esperada	p-valor
Controles			
<i>Fok I</i> T>C	0.42857	0.42914	1.00000
<i>BsmI</i> G>A	0.39062	0.49596	0.01965
<i>Apal</i> C>A	0.49219	0.50169	0.86046
<i>TaqI</i> T>C	0.48438	0.47794	1.00000
ACG			
<i>Fok I</i> T>C	0.51087	0.46561	0.37658
<i>BsmI</i> G>A	0.54167	0.48495	0.29333
<i>Apal</i> C>A	0.46875	0.49820	0.68170
<i>TaqI</i> T>C	0.53125	0.48293	0.39516
PMR			
<i>Fok I</i> T>C	0.50192	0.47084	0.29602
<i>BsmI</i> G>A	0.42045	0.46868	0.11570
<i>Apal</i> C>A	0.45247	0.50049	0.13930
<i>TaqI</i> T>C	0.42424	0.46159	0.22805

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática.

La distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas para los polimorfismos del gen de VDR (*BsmI*, *FokI*, *TaqI* and *Apal*) se muestran en las **Tablas 13-15**. Los resultados no revelaron diferencias significativas entre los pacientes y el grupo de controles sanos. Sólo hubo una mayor frecuencia del portador del alelo b de BsmI en los pacientes con PMR [1,713 (1,022 a 2,872), p = 0,04] y ACG [2,128 (1,048-4,322), p = 0,03] en comparación con los controles sanos, pero no se puede considerar ya que dicho polimorfismo no estaba en equilibrio de Hardy Weinberg.

Tabla 13.- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del VDR (*FokI*, *BsmI*, *Apa I* y *TaqI*) en pacientes con ACG y controles sanos.

Genotipo	Controles (n= 126)	ACG (n= 92)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo <i>FokI</i> T>C [db SNP ID rs2228570]				
Frecuencia genotípica				
ff	12/126 (9,5%)	10/92 (10,9%)		Referencia
fF	54/126 (42,9%)	47/92 (51,1%)	0,927	1,044 (0,414 – 2,636)
FF	60/126 (47,6%)	35/92 (38,0%)	0,454	0,700 (0,274 – 1,787)
Frecuencia alélica				
f (T)	78/252 (31,0%)	67/184 (36,4%)		Referencia
F (C)	174/252 (69,0%)	117/184 (63,6%)	0,232	0,783 (0,524 – 1,170)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo f	66/126 (52,4%)	57/92 (62,0%)	0,159	1,481 (0,857 – 2,559)
Portador alelo F	114/126 (90,5%)	82/92 (89,1%)	0,745	0,863 (0,356 – 2,093)

Genotipo	Controles (n= 128)	ACG (n= 96)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo <i>BsmI</i> G>A [db SNP ID rs1544419]				
Frecuencia genotípica				
bb	46/128 (35,9%)	31/96 (32,3%)		Referencia
bB	50/128 (39,1%)	52/96 (54,2%)	0,154	1,543 (0,848 – 2,808)
BB	32/128 (25,0%)	13/96 (13,5%)	0,207	0,603 (0,274 – 1,327)
Frecuencia alélica				
b (G)	142/256 (55,5%)	114/192 (59,4%)		Referencia
B (A)	114/256 (44,5%)	78/192 (40,6%)	0,408	0,852 (0,583 – 1,245)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo b	96/128 (75,0%)	83/96 (86,5%)	0,034	2,128 (1,048 – 4,322)
Portador alelo B	82/128 (64,1%)	65/96 (67,7%)	0,570	1,176 (0,672 – 2,059)

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

Genotipo	Controles (n= 128)	ACG (n= 96)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo <i>Apal</i> C>A [db SNP ID rs7975232]				
Frecuencia genotípica				
aa	31/128 (24,2%)	21/96 (21,9%)		Referencia
aA	63/128 (49,2%)	45/96 (46,9%)	0,877	1,054 (0,538 – 2,067)
AA	34/128 (26,6%)	30/96 (31,3%)	0,484	1,303 (0,621 – 2,731)
Frecuencia alélica				
a (C)	125/256 (48,8%)	87/192 (45,3%)		Referencia
A (A)	131/256 (51,2%)	105/192 (54,7%)	0,461	1,152 (0,791 – 1,676)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo a	94/128 (73,4%)	66/96 (68,8%)	0,442	0,796 (0,444 – 1,426)
Portador alelo A	97/128 (75,8%)	75/96 (78,1%)	0,681	1,141 (0,608 – 2,144)

Genotipo	Controles (n= 128)	ACG (n= 96)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo <i>TaqI</i> T>C [db SNP ID rs731236]				
Frecuencia genotípica				
TT	47/128 (36,7%)	32/96 (33,3%)		Referencia
Tt	62/128 (48,4%)	51/96 (53,1%)	0,524	1,208 (0,675 – 2,163)
tt	19/128 (14,8%)	13/96 (13,5%)	0,991	1,005 (0,435 – 2,319)
Frecuencia alélica				
T (T)	156/256 (60,9%)	115/192 (59,9%)		Referencia
t (C)	100/256 (39,1%)	77/192 (40,1%)	0,823	1,045 (0,713 – 1,531)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo T	109/128 (85,2%)	83/96 (86,5%)	0,783	1,113 (0,520 – 2,382)
Portador alelo t	81/128 (63,3%)	64/96 (66,7%)	0,600	1,160 (0,665 – 2,024)

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

Tabla 14,- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del VDR (*FokI*, *BsmI*, *Apa I* y *TaqI*) en pacientes con PMR y controles sanos,

Genotipo	Controles (n= 126)	PMR (n= 261)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo FokI T>C [db SNP ID rs2228570]				
Frecuencia genotípica				
ff	12/126 (9,5%)	33/261 (12,6%)		Referencia
fF	54/126 (42,9%)	131/261 (50,2%)	0,737	0,882 (0,424 – 1,836)
FF	60/126 (47,6%)	97/261 (37,2%)	0,154	0,588 (0,282 – 1,226)
Frecuencia alélica				
f (T)	78/252 (31,0%)	197/522 (37,7%)		Referencia
F (C)	174/252 (69,0%)	325/522 (62,3%)	0,064	0,740 (0,537 – 1,019)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo f	66/126 (52,4%)	164/261 (62,8%)	0,050	1,537 (0,999 – 2,364)
Portador alelo F	114/126 (90,5%)	228/261 (87,4%)	0,370	0,727 (0,362 – 1,461)

Genotipo	Controles (n= 128)	PMR (n= 264)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo BsmI G>A [db SNP ID rs1544419]				
Frecuencia genotípica				
bb	46/128 (35,9%)	110/264 (41,7%)		Referencia
bB	50/128 (39,1%)	111/264 (42,0%)	0,761	0,928 (0,575 – 1,499)
BB	32/128 (25,0%)	43/264 (16,3%)	0,047	0,562 (0,317 – 0,996)
Frecuencia alélica				
b (G)	142/256 (55,5%)	331/528 (62,7%)		Referencia
B (A)	114/256 (44,5%)	197/528 (37,3%)	0,053	0,741 (0,548 – 1,004)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo b	96/128 (75,0%)	221/264 (83,7%)	0,040	1,713 (1,022 – 2,872)
Portador alelo B	82/128 (64,1%)	154/264 (58,3%)	0,277	0,785 (0,508 – 1,215)

Abreviaturas: PMR: polimialgia reumática; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

Genotipo	Controles (n= 128)	PMR (n= 263)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo ApaI C>A [db SNP ID rs7975232]				
Frecuencia genotípica				
aa	31/128 (24,2%)	76/263 (28,9%)		Referencia
aA	63/128 (49,2%)	119/263 (45,2%)	0,323	0,770 (0,459 – 1,293)
AA	34/128 (26,6%)	68/263 (25,9%)	0,496	0,816 (0,454 – 1,466)
Frecuencia alélica				
a (C)	125/256 (48,8%)	271/526 (51,5%)		Referencia
A (A)	131/256 (51,2%)	255/526 (48,5%)	0,480	0,898 (0,666 – 1,211)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo a	94/128 (73,4%)	195/263 (74,1%)	0,881	1,037 (0,642 – 1,676)
Portador alelo A	97/128 (75,8%)	187/263 (71,1%)	0,330	0,786 (0,484 – 1,276)

Genotipo	Controles (n= 128)	PMR (n= 264)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo TaqI T>C [db SNP ID rs731236]				
Frecuencia genotípica				
TT	47/128 (36,7%)	113/264 (42,8%)		Referencia
Tt	62/128 (48,4%)	112/264 (42,4%)	0,223	0,751 (0,474 – 1,191)
tt	19/128 (14,8%)	39/264 (14,8%)	0,631	0,854 (0,448 – 1,628)
Frecuencia alélica				
T (T)	156/256 (60,9%)	338/528 (64,0%)		Referencia
t (C)	100/256 (39,1%)	190/528 (36,0%)	0,403	0,877 (0,645 – 1,193)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo T	109/128 (85,2%)	225/264 (85,2%)	0,985	1,006 (0,555 – 1,822)
Portador alelo t	81/128 (63,3%)	151/264 (57,2%)	0,250	0,775 (0,502 – 1,197)

Abreviaturas: PMR: polimialgia reumática; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

Tabla 15,- Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen del VDR (*FokI*, *BsmI*, *Apa I* y *TaqI*) en pacientes con PMR y ACG

Genotipo	PMR (n= 261)	ACG (n= 92)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo <i>FokI</i> T>C [db SNP ID rs2228570]				
Frecuencia genotípica				
ff	33/261 (12,6%)	10/92 (10,9%)		Referencia
fF	131/261 (50,2%)	47/92 (51,1%)	0,672	1,184 (0,542 – 2,588)
FF	97/261 (37,2%)	35/92 (38,0%)	0,671	1,191 (0,532 – 2,666)
Frecuencia alélica				
f (T)	197/522 (37,7%)	67/184 (36,4%)		Referencia
F (C)	325/522 (62,3%)	117/184 (63,6%)	0,749	1,059 (0,747 – 1,500)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo f	164/261 (62,8%)	57/92 (62,0%)	0,881	0,963 (0,590 – 1,572)
Portador alelo F	228/261 (87,4%)	82/92 (89,1%)	0,655	1,187 (0,560 – 2,515)

Genotipo	PMR (n= 264)	ACG (n= 96)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo <i>BsmI</i> G>A [db SNP ID rs1544419]				
Frecuencia genotípica				
bb	110/264 (41,7%)	31/96 (32,3%)		Referencia
bB	111/264 (42,0%)	52/96 (54,2%)	0,053	1,662 (0,991 – 2,788)
BB	43/264 (16,3%)	13/96 (13,5%)	0,852	1,073 (0,513 – 2,242)
Frecuencia alélica				
b (G)	331/528 (62,7%)	114/192 (59,4%)		Referencia
B (A)	197/528 (37,3%)	78/192 (40,6%)	0,418	1,150 (0,820 – 1,611)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo b	221/264 (83,7%)	83/96 (86,5%)	0,525	1,242 (0,636 – 2,427)
Portador alelo B	154/264 (58,3%)	65/96 (67,7%)	0,107	1,498 (0,915 – 2,452)

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

Genotipo	PMR (n= 263)	ACG (n= 96)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo <i>Apal</i> C>A [db SNP ID rs7975232]				
Frecuencia genotípica				
aa	76/263 (28,9%)	21/96 (21,9%)		Referencia
aA	119/263(45,2%)	45/96 (46,9%)	0,298	1,369 (0,757 – 2,475)
AA	68/263 (25,9%)	30/96 (31,3%)	0,154	1,597 (0,836 – 3,048)
Frecuencia alélica				
a (C)	271/526 (51,5%)	87/192 (45,3%)		Referencia
A (A)	255/526 (48,5%)	105/192 (54,7%)	0,141	1,283 (0,921 – 1,787)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo a	195/263 (74,1%)	66/96 (68,8%)	0,310	0,767 (0,460 – 1,281)
Portador alelo A	187/263 (71,1%)	75/96 (78,1%)	0,185	1,451 (0,835 – 2,522)

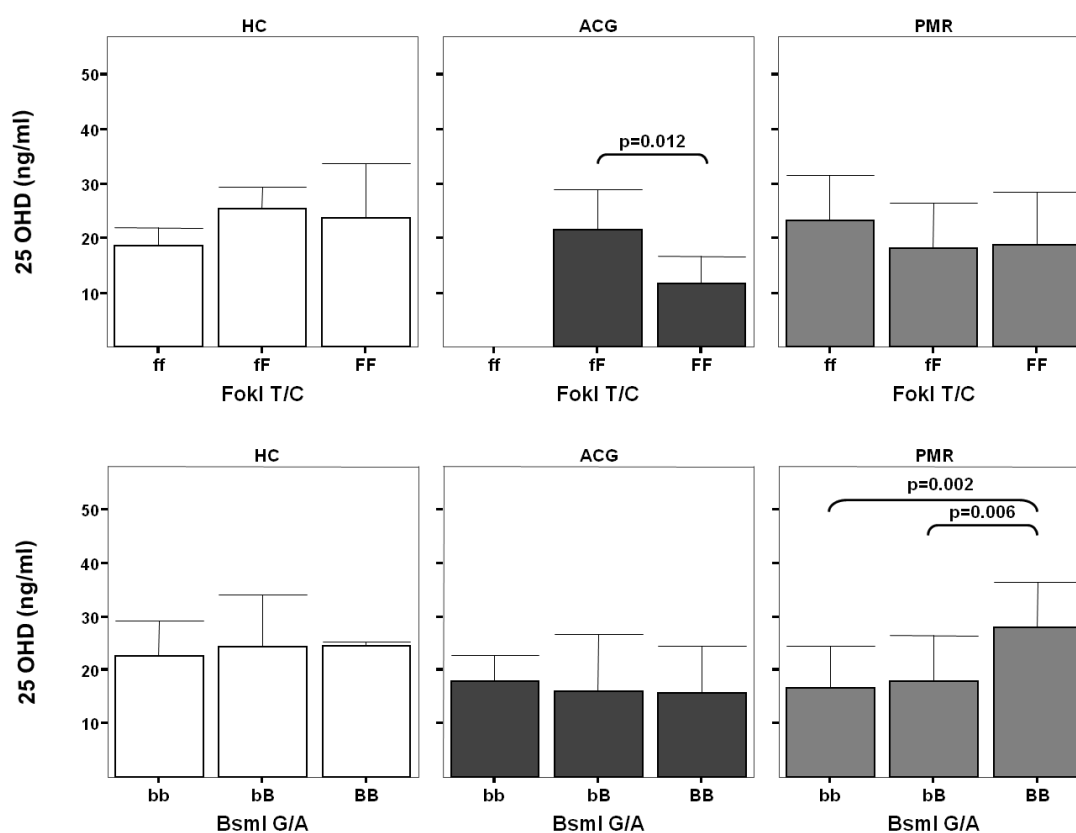
Genotipo	PMR (n= 264)	ACG (n= 96)	p-valor	OR (95% IC)
Polimorfismo <i>TaqI</i> T>C [db SNP ID rs731236]				
Frecuencia genotípica				
TT	113/264 (42,8%)	32/96 (33,3%)		Referencia
Tt	112/264 (42,4%)	51/96 (53,1%)	0,069	1,608 (0,962 – 2,687)
tt	39/264 (14,8%)	13/96 (13,5%)	0,666	1,177 (0,561 – 2,468)
Frecuencia alélica				
T (T)	338/528 (64,0%)	115/192 (59,9%)		Referencia
t (C)	190/528 (36,0%)	77/192 (40,1%)	0,312	1,191 (0,849 – 1,672)
Frecuencia portadores alélicos				
Portador alelo T	225/264 (85,2%)	83/96 (86,5%)	0,769	1,107 (0,563 – 2,176)
Portador alelo t	151/264 (57,2%)	64/96 (66,7%)	0,105	1,497 (0,917 – 2,442)

Abreviaturas: ACG: arteritis de células gigantes; PMR: polimialgia reumática; OR: *odd-ratio*; IC: intervalo de confianza.

5.6.-Estudios de asociación de los polimorfismos del gen del VDR (*BsmI* A/G, *FokI* T/C, *TaqI* C/T and *Apal* C/A con niveles séricos de 25(OH)D₃ y manifestaciones clínicas en pacientes con PMR y ACG

Con el fin de evaluar si los polimorfismos analizados se relacionaban con diferencias en los niveles de 25(OH)D₃, llevamos a cabo estudios de asociación. En la **Figura 35** se puede observar como en los controles sanos los niveles de 25(OH)D₃ no se asociaban con ningún polimorfismo del gen de VDR. Sin embargo, en los pacientes con ACG hubo una asociación significativa del genotipo FF de *FokI* con bajos niveles de 25(OH)D₃. Por otro lado, los pacientes con PMR mostraron una asociación de los genotipos BB, AA y tt para *BsmI*, *Apal* y *TaqI* respectivamente con mayores niveles séricos de 25(OH)D₃ comparado con el genotipo *wild-type* o el genotipo heterocigoto.

Finalmente, el análisis de asociación de los polimorfismos del gen del VDR con las manifestaciones clínicas, reveló que los pacientes con ACG no presentaban diferencias en los niveles de 25-(OH)-D según la presencia de manifestaciones isquémicas o síntomas polimiálgicos. Además, tampoco encontramos diferencias en los niveles de 25(OH)D₃ al dividir los pacientes con PMR en clásica (VSG > 40 mm/1h) o con VSG “baja” (< 40 mm/1h).



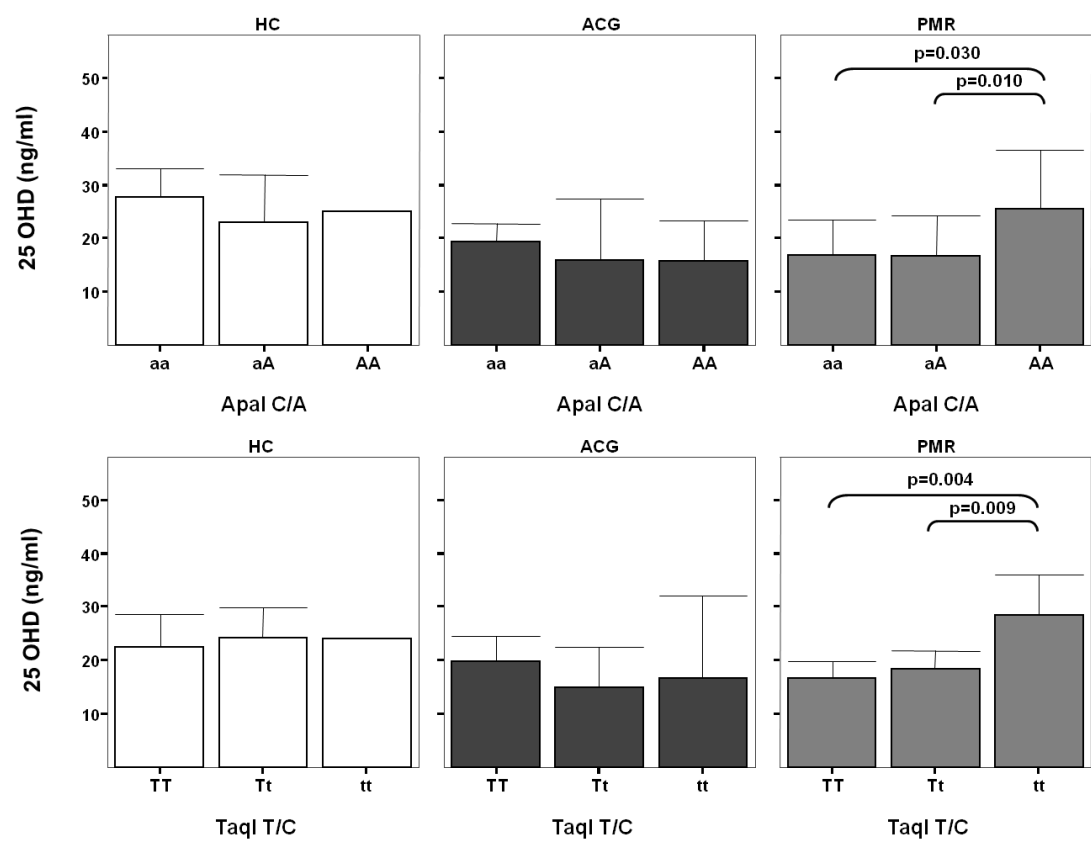


Figura 35- Niveles de vitamina D según el genotipo de los polimorfismos del gen VDR en pacientes con ACG y PMR al comienzo de la enfermedad y en controles sanos >60 años. Los datos se se representan como la media ± DE. Sólo se muestran las diferencias estadísticamente significativas, consideradas cuando $p<0,05$. (Barras blancas, controles; barras negras, ACG; y barras grises, PMR).

V. Discusión

V. DISCUSIÓN

El envejecimiento es uno de los factores de riesgo más importantes implicados en la patogénesis de la ACG, influyendo sobre los dos principales elementos que interaccionan para causar la inflamación vascular, como son el sistema inmune y la pared vascular.

Clínicamente, el envejecimiento inmunológico se caracteriza por fallos en los mecanismos de tolerancia, una desregulación de la respuesta inmune y la aparición de la inflamación. La falta de protección del individuo frente a lo propio y lo extraño resulta de una disminución de la regeneración de las células del sistema inmune. Además, las células están sometidas a un control menos estricto, liberan citocinas espontáneamente y modifican el umbral de sus valores en respuesta a estímulos inmunológicos.

Además, a medida que el individuo envejece, el tejido vascular en sí experimenta numerosos cambios estructurales, que se resumen como envejecimiento vascular. Este proceso trae consigo cambios en las fibras elásticas, las proteínas de la matriz y la remodelación de la capa media y la íntima, afectando al tráfico, a la renovación y a la supervivencia celular [49]. En consecuencia, es posible que en un individuo de edad avanzada que acumula un aumento de carga patogénica, ésta desencadene la activación de las DCs vasculares que ya no pueden proteger a una pared vascular alterada estructuralmente, facilitando la inflamación vascular.

En la literatura existe mucha información de cómo el envejecimiento afecta a la inmunidad adquirida. Sin embargo, el impacto del proceso de envejecimiento sobre la función del sistema inmune innato es menos claro. De acuerdo con estudios anteriores, recientemente nuestro grupo ha demostrado que el proceso de envejecimiento en individuos sanos se acompaña de una desregulación de citocinas, principalmente debido a un aumento de las citocinas pro y anti-inflamatorias, un predominio de las citocinas Th1 y una disminución en las citocinas IL-17 [72]. Además, hemos observado que el proceso de envejecimiento en individuos sanos también se acompaña de cambios en la expresión y función de determinados TLRs [70]. Así, una función anormal del sistema inmune podría contribuir a un empeoramiento de una lesión o infección dando lugar al desarrollo de algunas de las enfermedades observadas en los ancianos.

Dado que la inmunidad innata es la primera línea de defensa contra los patógenos, la comprensión de cómo el envejecimiento modifica este tipo de defensa puede ser especialmente relevante en el estudio de las enfermedades inflamatorias restringidas a la edad, como son la PMR y la ACG.

Durante muchos años la investigación en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento se ha centrado en el papel que desempeñan las células T y B en la respuesta inmune adquirida, y aunque éstas han sido tradicionalmente consideradas como enfermedades mediadas por células T, cada vez hay más evidencias de que las células del sistema inmune innato, incluyendo los fagocitos, juegan un papel muy importante en la patogénesis de estas enfermedades.

Existen numerosos trabajos que investigan la patogénesis de la ACG en el compartimento vascular. La patogénesis de la PMR puede ser similar a la de la ACG, pero se ha visto que la implicación vascular es mucho menos prominente. Por ello, en esta tesis hemos querido enfocar esta cuestión desde el punto de vista de las alteraciones que afectan al sistema inmune innato en el compartimento periférico.

Se sabe muy poco del efecto del envejecimiento sobre el sistema de quimiocinas [227]. Se ha descrito que los niveles séricos y las células T productoras de IL-8 están aumentadas en las personas de edad avanzada [227,228]. En contraste con estos resultados, nosotros no observamos diferencias significativas en los niveles circulantes de IL-8 entre individuos sanos jóvenes y mayores (datos no publicados).

También se ha sugerido que los niveles circulantes de IL-8 están aumentados en diferentes patologías vasculíticas, y que podría ser un marcador sensible de la actividad de la enfermedad [229] y desempeñar un papel importante en su patogénesis[229-235].

Como la IL-8 es una de las principales quimiocinas implicadas en la migración celular [12], estudiamos los niveles circulantes en pacientes en distintas fases de la enfermedad. En el suero de los pacientes con estas dos enfermedades inflamatorias en fase activa encontramos niveles significativamente elevados de IL-8 en comparación con los HC. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los niveles circulantes de IL-8 entre estas enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento. Aunque nuestros resultados indican que la IL-8 podría desempeñar un papel en el proceso inflamatorio en la PMR y ACG, los niveles circulantes de IL-8 no permiten distinguir entre estas dos enfermedades. En cuanto a la influencia del tratamiento, el hallazgo más importante que observamos es que los niveles circulantes de IL-8 únicamente disminuyen en los pacientes con ACG tras el tratamiento a corto plazo con CS y tras la remisión completa y sin tratamiento. Aunque no disponemos de una explicación clara, es posible que el tratamiento con altas dosis de CS induzca tal descenso [236].

Uno de los principales mecanismos mediados por las células del sistema inmune innato en la defensa del hospedador frente a patógenos es la fagocitosis. Las funciones defensivas de las células fagocíticas consisten en una secuencia de eventos, incluyendo la migración, el reconocimiento e ingestión de patógenos, y su destrucción mediante la liberación de ROIs. El último de ellos (también llamado "respiración oxidativa") no ha recibido la debida atención en los ancianos, a pesar de que puede ser considerado el evento más importante en el aclaramiento de un microorganismo invasor [237]. De acuerdo con un aumento de las moléculas de adhesión en los ancianos, nosotros observamos que los granulocitos de individuos de edad avanzada tienen una mayor capacidad para migrar que los granulocitos de individuos jóvenes. Sin embargo, la actividad fagocítica y la respiración oxidativa son muy similares entre ambos grupos de edad (datos no publicados).

Los fagocitos circulantes de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento se caracterizaron con respecto a su función. En esta tesis demostramos que, mientras que los pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento presentan una capacidad quimiotáctica y fagocítica intacta, la capacidad de respiración oxidativa está disminuida significativamente.

Dado que un defecto quimiotáctico funcional disminuye el número de granulocitos que migran de la circulación a los tejidos inflamados y, por lo tanto, la cantidad de células activas en los sitios de inflamación, lo primero que nos planteamos fue estudiar la función quimiotáctica en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento. Nuestros resultados sugieren un aumento, aunque no significativo, de la capacidad migratoria de los neutrófilos circulantes de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento. A pesar de que los pacientes con ACG y PMR presentan unos niveles séricos de IL-8 aumentados, no hallamos ninguna correlación entre la IL-8 y la respuesta de fase aguda o con la actividad quimiotáctica en estas patologías.

El papel de los neutrófilos en la patogénesis de la ACG no ha recibido la debida atención a pesar de que están entre las primeras células que invaden las lesiones inflamatorias [238]. Los neutrófilos pueden contribuir al proceso inflamatorio en la ACG mediante la activación de las células endoteliales, secretando mediadores proinflamatorios, y también mediante la producción de radicales libres de oxígeno como resultado del proceso fagocítico. Nosotros hemos observado que la actividad fagocítica de los granulocitos en los pacientes con ACG es significativamente mayor que en los HC y que en los pacientes con PMR. En estudios más amplios se debería confirmar si esto es una característica de los pacientes con ACG. Por otra parte, la relevancia de este hallazgo en la patogenia de la ACG no está clara.

La destrucción de los microorganismos es una función fisiológica crítica de los fagocitos. Los fagocitos tienen múltiples mecanismos para eliminar a los microorganismos, pero la generación de ROIs y el ácido hipocloroso se sigue considerando como el mecanismo de destrucción crítico para la mayoría de los patógenos invasores [15]. Nuestros resultados muestran que la capacidad de respiración oxidativa está disminuida significativamente en las enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento. Sin embargo, una deficiencia en la actividad respiratoria oxidativa en estos pacientes no tendría necesariamente que tener un impacto sobre la capacidad de sus leucocitos para destruir a los microorganismos una vez que han sido internalizados [239].

Los TLRs también pueden estar implicados en el aumento de la capacidad fagocítica de los neutrófilos circulantes de los pacientes con ACG hallada en nuestro trabajo. Es posible que, entre otros receptores, la expresión y la función de los TLRs en neutrófilos esté desregulada, y que tenga un efecto sobre las funciones efectoras analizadas en el presente estudio.

Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio es la falta de influencia del tratamiento a corto plazo con CS en las funciones efectoras de neutrófilos y monocitos. A pesar de que los CS tiene efectos pleiotrópicos sobre la respuesta inmune, sus efectos parecen estar más relacionadas con la inhibición de la respuesta de las células T, una vez que la enfermedad ha comenzado.

En conclusión, las funciones efectoras de los neutrófilos y monocitos están desreguladas y puede tener un papel en la patogénesis de las enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento. Esto es aún más importante, ya que evidencias recientes sugieren un papel inmunomodulador de los neutrófilos en la inmunidad innata y adquirida [240,241]. El papel exacto de las células circulantes y / o los infiltrados celulares en el tejido en estas patologías aún no se ha dilucidado.

Estos hallazgos en la disminución del burst oxidativo en los pacientes con ACG/PMR pueden explicarse como consecuencia de tres hipótesis diferentes: a) proceso de envejecimiento, b) actividad inflamatoria de la enfermedad, c) infecciones virales o bacterianas

Diversos estudios han demostrado que el envejecimiento se asocia con un descenso de la fagocitosis en neutrófilos y monocitos [63]. En contraste con estos estudios, nosotros no encontramos diferencias en la capacidad fagocítica ni en la respiración oxidativa entre individuos sanos jóvenes y ancianos. Estos datos nos sugieren que la alteración en la respiración oxidativa en los pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento no se debe al proceso de envejecimiento en sí propiamente dicho.

Otra posible explicación de nuestros resultados es que esta disminución en la respiración oxidativa se deba a la actividad inflamatoria de la enfermedad. Así, hemos observado que la capacidad de la respiración oxidativa en pacientes con PMR en fase activa de la enfermedad se correlaciona con los niveles de PCR. Sin embargo, esta alteración del burst oxidativo no se correlacionó con la actividad de la enfermedad en la ACG, ni en otra patología inflamatoria restringida a la edad, como es la EORA (datos no publicados). Además, tras la remisión clínica completa y sin ningún tipo de CS o tratamiento inmunosupresor las funciones efectoras de los monocitos y neutrófilos se restauraron a valores normales.

Una tercera hipótesis posible es que, además de la influencia del envejecimiento sobre estas patologías, existen numerosas evidencias de una posible etiología infecciosa en pacientes con PMR y ACG (**Tabla 1**).

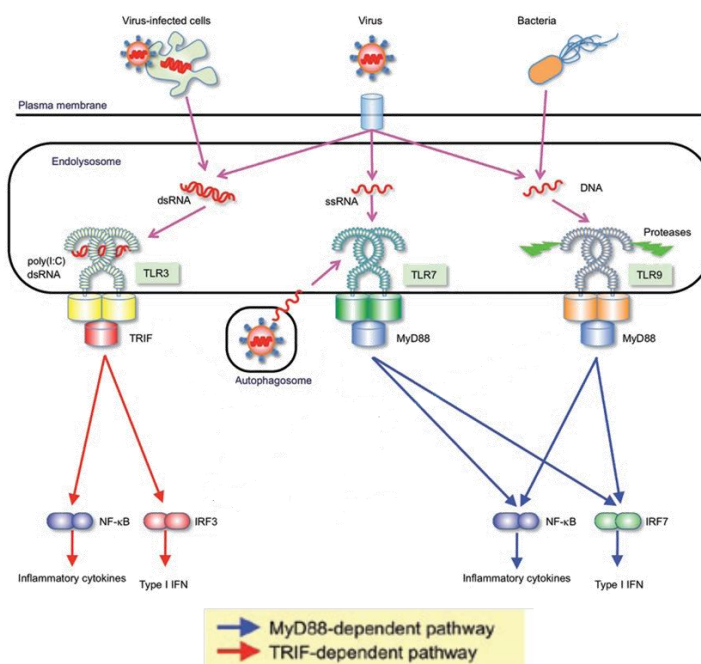
Tabla 1. Evidencias sobre una posible etiología infecciosa en ACG/PMR.

Possible etiología infecciosa
• Inicio de los síntomas similar a un cuadro infeccioso – “pseudogripal” • Cuadro autolimitado • Coincidencia en familiares no cosanguíneos • Aumento cíclico en la incidencia • Brotes epidémicos – Coincidiendo con brotes de infecciones virales y bacterianas

La clara importancia de la posible etiología infecciosa proviene también de la demostración de que el primer evento crítico en el proceso vasculítico es la activación de las DCs, que reconocen a los patógenos a través sus TLRs [186,187]. Las DCs, junto con los neutrófilos y monocitos, son otro de los elementos celulares claves del sistema inmune innato [242]. Ma-Krupa y col. [164] han demostrado que las DCs maduras se encuentran en la unión media-adventicia de la arteria temporal de pacientes con ACG activa, y que estas células, tras activación, producen quimiocinas y son capaces de reclutar y activar a las células T. Una de las vías mejor estudiadas que induce la activación de la inmunidad innata es la señalización a través de TLRs. Los TLRs, por tanto, van a establecer una importante conexión entre la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida mediante el reconocimiento de PAMPs.

En esta tesis doctoral hemos tratado de abordar el estudio de la expresión y función de los diferentes miembros de los TLRs en PBMCs de pacientes con PMR y ACG. El hallazgo más consistente ha sido el aumento significativo de la expresión de TLR7 en las células B, células T y monocitos de pacientes con enfermedad activa en comparación con los HC. La expresión del TLR3 y TLR9 también está aumentada en la ACG pero sólo en las células T y B, respectivamente. Dado que nos hemos centrado en el estudio de las alteraciones que acontecen en el compartimento periférico, la expresión de los miembros de los TLR en las arterias temporales no fue abordada en el presente estudio. A pesar de la remisión clínica, el tratamiento con CS a corto plazo no induce una disminución significativa en la expresión de los TLRs en PBMCs. Aunque hay una mayor expresión del TLR7, los monocitos circulantes de pacientes con enfermedad activa muestran una respuesta *in vitro* significativamente menor en la producción de citocinas.

Cuatro hipótesis diferentes pueden explicar estos hallazgos (**Figura 1**): a) una alteración en la transducción de la señal del TLR7, b) un defecto genético en el receptor, c) la saturación del receptor con ligandos naturales, d) o que los resultados encontrados en PMR y ACG no sean específicos de la enfermedad sino que sean la consecuencia de la reacción de fase aguda que se produce en estos síndromes.



1. Alteración en la cascada de activación del TLR7

2. Polimorfismo en el gen del TLR7

proteína no funcional

3. Saturación del receptor

4. Proceso Inflamatorio

Figura 1. Hipótesis posibles que expliquen la disfunción del TLR7.

En primer lugar, las vías de señalización de los TLRs se originan en los dominios TIR [243]. En el caso de TLR7, las moléculas adaptadoras que contienen dominios TIR, tales como MyD88 regulan las vías de señalización mediadas por los TLRs. MyD88 es común a todas las vías mediadas por los TLRs excepto para el TLR3. Por lo tanto, la hipótesis de una alteración en la transducción de la señal se descartó porque no encontramos una disminución de la respuesta para cualquiera de los otros TLRs analizados.

En segundo lugar, aunque se ha descrito un número significativo de SNPs para el gen del TLR7, sólo unos pocos se han estudiado en humanos [244-248]. Por lo tanto, el estudio de sólo tres SNPs no elimina una posible influencia genética en la respuesta del TLR7. Sin embargo, también hemos descartado un posible defecto genético ya que en aquellos pacientes en remisión completa y sin tratamiento con CS encontramos una respuesta normal a los agonistas específicos del TLR7.

En cuanto a otros SNPs presentes en genes de TLRs, se ha postulado un papel clave del TLR4 en la patogénesis de la ACG [163]. Además, otros estudios han revelado que los polimorfismos en el gen del TLR4 se asocian con el desarrollo de otras enfermedades granulomatosas crónicas tales con la enfermedad de Crohn y Sarcoidosis [217,218], así como con infecciones [219] y enfermedades cardiovasculares [220,221]. Dos de los polimorfismos del gen del TLR4 (+896 A/G y +1196 T/C), junto con algunos polimorfismos del gen del TLR9 son funcionalmente relevantes y también se han relacionado con el desarrollo de enfermedades inflamatorias [222-225]. Por todo ello, nos planteamos abordar el estudio de los polimorfismos del gen del TLR4 y TLR9, para ver si posibles polimorfismos en estos dos TLRs se asocian con susceptibilidad y así como ver si sus consecuencias funcionales pudieran estar implicadas en la patogénesis de estas enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento. Nuestros resultados no apoyan la asociación de estas variantes genéticas del TLR4 y TLR9 con la susceptibilidad a ACG y PMR, y ni con la expresión y función del TLR4. Los polimorfismos del TLR4 no tienen ninguna asociación con la gravedad de la enfermedad en ACG. Sin embargo, los polimorfismos del TLR9 estudiados podrían estar relacionados con el pronóstico de la ACG, lo cual debería ser confirmado en otras poblaciones y series más amplias.

Junto con el trabajo desarrollado en esta tesis, existen tres diferentes estudios que examinan el polimorfismo del gen del TLR4 (+896 A/G) en ACG. En los dos primeros estudios [222,223], se encontró un aumento en la frecuencia del alelo G en el polimorfismo del gen del TLR4 (+896 A/G), a pesar de que resultó ser significativo sólo en el estudio de Palomino -Morales y col.[222]. Sin embargo, los resultados de nuestro estudio no muestran la misma tendencia haciendo a los resultados previos bastante inconsistentes. Por lo tanto, para establecer claramente la asociación entre los polimorfismos del gen TLR4 con la ACG, realizamos un meta-análisis de las tres poblaciones

de ACG estudiadas hasta el momento, todas ellas procedentes de una zona geográfica similar. Si bien los resultados pueden estar limitados por el bajo número de estudios, este meta-análisis acumulativo no apoya la asociación del polimorfismo del gen del TLR4 (+896 A/G) con la susceptibilidad a desarrollar ACG.

La tercera hipótesis posible podría ser que, al comienzo de la enfermedad, el TLR7 estuviese saturado por ligandos específicos. Se ha demostrado que las infecciones virales aumentan la expresión de los TLRs [249]. El TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 típicamente residen en los endosomas donde pueden tener acceso a los ácidos nucleicos virales [250]. El TLR7 reconoce ARNss en el citoplasma de las células infectadas durante la replicación viral [251]. Presumiblemente, el TLR7 detecta una característica específica invariante presente en el ARN genómico o en intermedios de replicación virales de estos virus. Sin embargo, existen pocas evidencias sobre el ligando viral que sirve como auténtico PAMP uniéndose al TLR7, o sobre la regulación de los TLR por virus [28,250,251]. La expresión de IFN tipo I es dependiente de los factores de transcripción celular, factor regulador de interferón (IRF)-3 e IRF-7 que se activan como efectores *downstream* de las cascadas de señalización de los PRR [251]. Por lo tanto, si un virus está presente en el plasma de los pacientes durante la fase aguda de la enfermedad, la estimulación con el plasma de los pacientes debería inducir un aumento de la expresión de las respuestas dependientes de virus. Aquí, hemos demostrado que el cultivo *in vitro* de PBMCs sanos con plasma de pacientes con enfermedad activa aumenta la expresión del TLR7 y la expresión de varios genes que se sobreexpresan durante la activación viral (IFN- β , IFIT1, IRF7 y USP18) [252].

Como el TLR7 reconoce principalmente virus ARNss, intentamos identificar la presencia de un conjunto de virus en el plasma de pacientes con enfermedad activa sin resultados concluyentes. Hay varias hipótesis que podrían explicar nuestros resultados. En primer lugar, el virus completo puede no estar presente en el plasma en el momento del diagnóstico, y por lo tanto, a pesar de la alta sensibilidad de las técnicas moleculares para detectar las proteínas virales, no existe la posibilidad de identificar el agente causal. Una segunda posible explicación podría estar relacionada con las técnicas para la identificación de virus, ya que la mayoría de ellas han sido desarrolladas para comprobar su presencia en el comienzo de la enfermedad y también en muestras de mucosas respiratorias, donde el inóculo del virus es mucho mayor. Es posible que la sensibilidad de nuestro método en plasma sea menor [253]. Una tercera explicación es que otros microorganismos distintos de virus, virus diferentes de los evaluados aquí o un estímulo endógeno del TLR7 de origen no viral, puedan inducir una respuesta IFN tipo I a través de la vía de señalización del TLR7 [254-256].

Existen evidencias que indican que moléculas endógenas producidas por células muertas o en ciertas condiciones patológicas estimulan a los TLRs. Una respuesta inapropiada de estos receptores contribuye a un estado de inflamación agudo y crónico dando lugar al desarrollo o aceleración de enfermedades inflamatorias o autoinmunes sistémicas [23].

El reconocimiento de PAMPs a través de los TLR se asocia con cascadas de señalización inflamatorias, culminando en la producción de citocinas y quimiocinas, lo que conduce finalmente al aclaramiento de los patógenos [28]. Los datos epidemiológicos y en modelos animales han demostrado que una infección del tracto respiratorio altera la inmunidad y la patología frente a un segundo patógeno no relacionado, incluso mucho tiempo después de la eliminación del primer patógeno y en la ausencia de inmunidad por reacción cruzada [257-259]. Un trabajo reciente ha aportado evidencias de que la capacidad de respuesta de los TLRs se reestablece después de la primera curva de inflamación y muestra desensibilización a largo plazo de los macrófagos alveolares pulmonares frente a ligandos de TLRs [260]. Los mecanismos moleculares responsables de la desensibilización de los TLRs aún no se han identificado, y pueden incluir la regulación positiva de los antagonistas intracelulares, regulación negativa de moléculas adaptadoras, y / o influencia sostenida desde otras las rutas de señalización [261].

Alternativamente, es posible que los bucles de retroalimentación negativa que inhiben la señalización de los TLR (p.ej. aumento de IRAK-M) o específicamente inhiben la expresión de citocinas dependientes de NFkB (p.ej. aumento de IkB) estén activados en PBMCs de pacientes durante la enfermedad activa mediante los productos inflamatorios circulantes. De hecho, los pacientes con ACG y PMR activa muestran un aumento de las concentraciones séricas de citocinas inflamatorias [198,262], pero, en cambio, las concentraciones séricas de IFN α no se incrementan en la enfermedad activa. Podría ser también posible que los hallazgos de la función inmune innata en estas enfermedades inflamatorias restringidas a la edad pueden ser la consecuencia de la autoamplificación de bucles de retroalimentación y no sean específicos para cualquier enfermedad o agente etiológico [263].

Nuestros resultados plantean una cuarta hipótesis posible de que los hallazgos sobre la expresión y función de TLRs en PMR y ACG no sean específicos de las enfermedades y sean consecuencia de la reacción de fase aguda que se produce en estos síndromes. Aunque los pacientes con EORA y sepsis muestran en cierto grado similitudes en la expresión y la función de los pacientes con PMR y ACG, estos dos controles de enfermedad también muestran características distintas. Se ha sugerido que los sensores de la inmunidad innata incluyendo a los TLRs están regulados

diferencialmente en los diferentes subtipos celulares y durante las diferentes etapas del proceso inflamatorio [264].

En conclusión, nuestros datos sugieren la activación del TLR7 durante la fase activa de PMR y ACG, que se resuelve con una remisión completa de la enfermedad. Si estos hallazgos son la consecuencia de un marcado proceso inflamatorio en estas patologías o la activación por ligandos naturales está pendiente de ser explorado.

Cada vez existen más evidencias en la literatura de que la vitamina D, además de su papel en el metabolismo óseo, tiene un profundo impacto sobre el sistema inmune actuando como inmunomodulador de la respuesta inmune [79,80]. Por un lado, la vitamina D inhibe la inmunidad adquirida disminuyendo la proliferación de células T, la citotoxicidad de las células T CD8 y células NK, así como la proliferación de células B, la diferenciación a células plasmáticas y la producción de inmunoglobulinas. Pero por otro lado, la vitamina D potencia la inmunidad innata induciendo la proliferación de macrófagos y monocitos, además de prevenir una excesiva producción de citocinas proinflamatorias e incrementar el burst oxidativo de macrófagos, estimulando así la respuesta frente a infecciones[75,79,80,82-84].

Estudios previos de nuestro equipo han demostrado que la PMR y la ACG se caracterizan por una hiperproducción de IL-6 que es rápidamente suprimida tras el tratamiento esteroideo [262]. Además, en esta tesis demostramos que los pacientes con PMR y ACG tienen una desregulación del proceso fagocítico, principalmente una disminución del burst oxidativo, así como una activación del TLR7 durante la fase activa de la enfermedad.

Diversos estudios epidemiológicos y en modelos animales han demostrado que la deficiencia de vitamina D se asocia con mayor riesgo y/o gravedad de numerosas enfermedades inflamatorias y autoinmunes [76,80,83,101,102]. Sin embargo, hasta la fecha no se han estudiado los niveles de vitamina D circulantes en las patologías estudiadas aquí. En esta tesis, observamos como los pacientes con ACG presentan niveles de vitamina D circulantes disminuidos.

Debido a la creciente importancia de los efectos inmunomoduladores de la vitamina D y a raíz de los resultados presentados en esta tesis en los que los pacientes con PMR y ACG presentan una desregulación de la respuesta inmune innata, nos planteamos la pregunta de si es posible que la vitamina D sea otro de los posibles factores predisponentes que pueda influir en la patogénesis de la enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento. De acuerdo con estudios previos en los que las principales enfermedades reumáticas mediadas por el sistema inmune, tales como AR, LES, SS, se caracterizan por bajos niveles de vitamina D circulantes [103-106], nosotros hemos observado que los

pacientes con ACG presentan unos niveles de vitamina D circulantes disminuidos significativamente. En cuanto a la influencia de la vitamina D sobre determinadas manifestaciones clínicas, en los pacientes con ACG no encontramos diferencias en los niveles de 25(OH)VD₃ según la presencia de manifestaciones isquémicas o síntomas polimiálgicos. Tampoco encontramos diferencias en los niveles de 25(OH)VD₃ al dividir a los pacientes con PMR clásica (VSG > 40mm/h) o con VSG “baja” (VSG < 40mm/h).

El envejecimiento afecta a todas las células del sistema inmune innato, incluyendo cambios en el número de células y en la función. Los defectos en la función de algunas células son intrínsecos, mientras que para otras células son extrínsecos a partir de las interacciones con otros tipos de células o con factores ambientales que están alterados en el envejecimiento [265,266]. Dado que los niveles de vitamina D circulantes claramente disminuyen con la edad [226], nos planteamos la posibilidad de que el descenso observado en los niveles de vitamina D circulantes y la posible relación con la disregulación en la función inmune innata en estas patologías inflamatorias crónicas restringidas a la edad pueda deberse también al proceso de envejecimiento.

Por lo tanto, para resolver esta cuestión investigamos la influencia *in vivo* de la edad y de los efectos inmunomodulares de la vitamina D sobre las funciones de la inmunidad innata en individuos sanos, principalmente sobre la expresión y función de los TLRs. Conforme a estudios previos, observamos que los niveles de vitamina D circulantes descienden con la edad y además se localizan en el rango inferior de los valores normales en la mayoría de los individuos sanos. Sin embargo, el hallazgo más sorprendente que observamos es que el déficit de vitamina D se acompaña de cambios en la expresión y una función defectuosa del TLR7. Por un lado, la vitamina D circulante muestra una correlación negativa con la expresión del TLR7 en diferentes subpoblaciones celulares. Pero más relevante es la observación de que los niveles de vitamina D circulantes se correlacionan positivamente con la producción de citocinas proinflamatorias tras activación específica del TLR7 con un agonista específico. Además, esta fuerte asociación encontrada entre los niveles circulantes y la expresión y función del TLR7 se ha confirmado en un análisis de regresión logística multivariante [70].

La exposición a la luz ultravioleta determina, entre otros factores, la producción de vitamina D que puede variar a través de las diferentes estaciones del año. Si el estado de vitamina D afecta al sistema inmune innato, este hecho podría explicar porqué algunas enfermedades están claramente relacionadas con la estacionalidad. Así, hemos analizado estos resultados en tres diferentes grupos de edad según estacionalidad, observando que la asociación de la vitamina D con la disfunción del TLR7 es más profunda en los individuos sanos de edad avanzada, y especialmente durante las estaciones menos soleadas, lo cual podría tener consecuencias epidemiológicas y clínicas.

Una de las principales manifestaciones clínicas del envejecimiento inmunológico es un aumento en la susceptibilidad frente a infecciones con mayor morbilidad y mortalidad, tanto frente a nuevas infecciones como a infecciones crónicas o latentes [62]. Ginde y col. [267] han demostrado un aumento en la prevalencia de las infecciones de las vías respiratorias superiores en relación con niveles disminuidos de vitamina D circulantes, siendo además esta prevalencia mayor en los meses de invierno cuando los niveles de vitamina D están en sus niveles más bajos [267]. Puesto que el TLR7 es esencial para el reconocimiento del virus influenza y la respuesta de citocinas inflamatorias por las células inmunes [268], los resultados presentados en esta tesis doctoral encajan con la hipótesis de que la insuficiencia de vitamina D puede ser un factor clave para explicar la epidemiología de algunas infecciones virales como la gripe [269]. De hecho, el tratamiento con suplementos de vitamina D previene el desarrollo de los resfriados o la gripe [269,270].

Otra de las respuestas de la señalización por TLRs es la inducción de la producción de péptidos antimicrobianos, los cuales constituyen también una parte integral de la respuesta inmune innata frente a diversas infecciones. Diversos estudios sugieren que la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ estimula la producción de péptidos antimicrobianos, principalmente catelicidina, en células del sistema inmune y otras células de superficies epiteliales que están constantemente expuestas a posibles patógenos [85-87]. Liu y col. [271] han demostrado que la activación del TLR2-TLR1 con ligandos específicos en macrófagos humanos sobrerregula la expresión del VDR y de la enzima $1-\alpha$ hidroxilasa responsable de la conversión de $25(\text{OH})\text{VD}_3$ a $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$. Además, estos autores sugieren que la sobrerregulación de esta maquinaria de la vitamina D, que posteriormente pueda dar lugar a un aumento en la producción de catelicidina, depende de la presencia de unos niveles adecuados de vitamina D. En este sentido, se cree que la $25(\text{OH})\text{VD}_3$, principal forma circulante que determina el estado de vitamina D, es importante para la producción de la forma hormonal, la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$, y por tanto para la producción de la catelicidina [271]. Aunque la expresión génica de la catelicidina es dependiente del VDR, poco se sabe acerca de la asociación del estado de vitamina D y los niveles plasmáticos de catelicidina en individuos sanos. Un estudio prospectivo reciente ha demostrado una correlación entre los niveles de $25(\text{OH})\text{VD}_3$ y los niveles plasmáticos de catelicidina en individuos sanos [272]. De acuerdo con este estudio, en esta tesis nosotros también confirmamos que los niveles plasmáticos de catelicidina se correlacionan positivamente con los niveles circulantes de $25(\text{OH})\text{VD}_3$, pero más importante aún es que mostramos por primera vez que los niveles de catelicidina disminuyen con la edad en individuos sanos.

La vitamina D ejerce sus mecanismos efectores sobre la respuesta inmune innata y adquirida a través de una vía que implica al VDR. Los polimorfismos en el gen VDR potencialmente podrían

afectar a la unión del VDR a la $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ y a los efectos inmunomoduladores de la vitamina D. En este sentido, diversos estudios han investigado sobre una posible asociación entre los polimorfismos de VDR y un aumento en la incidencia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias [88,89]. En base a ello y a la vista de los resultados presentados hasta el momento en los que observamos que los pacientes con ACG presentan niveles disminuidos de vitamina D circulantes, nos planteamos investigar si existe una posible asociación entre los polimorfismos en el gen VDR con la susceptibilidad a padecer ACG y PMR y con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, así como una asociación entre los polimorfismos en el gen VDR con los niveles séricos de vitamina D. No encontramos ninguna asociación entre los cuatro polimorfismos en el gen VDR estudiados y la susceptibilidad a padecer ACG y PMR, ni con las manifestaciones clínicas en ninguna de las dos enfermedades. Además, tampoco observamos diferencias en la distribución de los polimorfismos entre la ACG y la PMR, lo que podría sugerir que ambas enfermedades comparten el mismo sustrato genético. Sin embargo, al estudiar la asociación entre los polimorfismos en el gen VDR y los niveles séricos de la vitamina D observamos una asociación significativa del genotipo FF de FokI con niveles séricos bajos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ en los pacientes con ACG, pero no con ningún otro polimorfismo estudiado. En los pacientes con PMR no observamos dicha asociación entre el genotipo FF de FokI y los niveles séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$. Por el contrario, los pacientes con PMR sí que mostraron una asociación de los genotipos BB, AA y tt para BsmI, ApaI y TaqI, respectivamente, con mayores niveles séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ comparado con el genotipo *wild-type* o el genotipo heterocigoto.

El polimorfismo FokI se localiza en el exón 2 y comprende un dominio de dedos de zinc de unión al ADN [89]. Este polimorfismo introduce un cambio de T por C en el primer codón de lectura generando una versión más corta de la proteína que es más activa transcripcionalmente. Es posible que este aumento en la actividad transcripcional del VDR genere un mayor consumo de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y como consecuencia los niveles de $25(\text{OH})\text{D}_3$ disminuyen, tal y como observamos en los pacientes con ACG. Por otro lado, los polimorfismos BsmI, ApaI y TaqI se localizan en el intrón 8 y exón 9, comprendiendo el dominio de unión a ligando, afectando a la unión de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ a su receptor [89]. En este caso, quizás la alteración en la unión a la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de lugar a un descenso del consumo de la misma, con lo que la $25(\text{OH})\text{D}_3$ no se convierte a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, resultando en unos mayores niveles séricos de $25(\text{OH})\text{D}_3$ como muestran los pacientes con PMR.

Estos hallazgos apuntan a un efecto diferencial del genotipo VDR en estas enfermedades lo cual podría estar influenciado por diferentes factores ambientales.

En conclusión, nuestros datos sugieren que los individuos de edad avanzada, con déficit de vitamina D, son más susceptibles a las infecciones a causa de una disfunción de los TLRs, lo que puede contribuir a un estado de inflamación crónica contribuyendo a la patogénesis de las enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento, como son la ACG y la PMR.

VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento presentan un aumento en los niveles séricos de IL-8 durante la fase activa de la enfermedad, lo que sugiere que la IL-8 podría desempeñar un papel en el proceso inflamatorio en la PMR y la ACG. Sin embargo, los niveles de IL-8 no permiten distinguir entre ambas patologías.
2. Los pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento presentan una desregulación de las funciones efectoras de los neutrófilos y de los monocitos, especialmente una disminución en la respiración oxidativa, lo cual podría tener un papel patogénico. Además, la alteración de la respiración oxidativa se correlaciona con la actividad de la enfermedad en los pacientes con PMR.
3. El tratamiento con CS, no parece influir en las funciones efectoras de neutrófilos y monocitos en ambas patologías. Los pacientes con PMR y ACG en remisión completa y sin tratamiento con CS recuperan sus funciones efectoras, con valores similares a los que presentan los individuos sanos de edad avanzada.
4. Los pacientes con ACG y PMR en fase activa presentan un aumento significativo en la expresión del TLR7 en células B, células T y monocitos sanguíneos. Sin embargo, y a pesar de una mayor expresión de este receptor, los monocitos de estos pacientes presentan un defecto en la producción de citocinas proinflamatorias como respuesta del TLR7 tras estimulación *in vitro* con agonistas específicos.
5. La respuesta *in vitro* del TLR7 principalmente afecta a la producción de citocinas proinflamatorias pero no a la producción de IFN- α . Además, este defecto no es secundario a variaciones de la estructura proteica de TLR7, y se recupera tras la completa remisión de la enfermedad.
6. La activación del TLR7 por un ligando natural en pacientes con PMR y ACG durante la fase activa podría dar lugar a una desensibilización selectiva del receptor. Sin embargo, aún no se ha identificado al agente etiológico implicado en la patogénesis. Si estos hallazgos son la consecuencia de un marcado proceso inflamatorio en estas patologías o la activación por ligandos naturales permanece por ser explorado.
7. Los polimorfismos del gen del TLR4 no se asocian con susceptibilidad a padecer ACG/PMR ni con sus manifestaciones clínicas. Sin embargo, los polimorfismos del gen del TLR9 podrían estar relacionados con el pronóstico de la ACG.

8. Los pacientes con ACG presentan niveles circulantes de vitamina D disminuidos. Los polimorfismos del gen VDR no se asocian con susceptibilidad a padecer ACG/PMR ni con sus manifestaciones clínicas. Además, tampoco observamos diferencias en la distribución de los polimorfismos entre la ACG y la PMR, lo que podría sugerir que ambas enfermedades comparten el mismo sustrato genético
9. En individuos sanos, el déficit de vitamina D se asocia a una función defectuosa del TLR7. Esta asociación es más profunda en individuos de edad avanzada durante las estaciones menos soleadas del año, lo cual puede tener consecuencias epidemiológicas y clínicas. La edad y los niveles de vitamina D circulantes se correlacionan con los niveles circulantes de péptidos antimicrobianos, como la catelicidina.

VII. Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Medzhitov R, Janeway C, Jr.: **Innate immunity**. *N Engl J Med* 2000, **343**:338-344.
2. Janeway CA, Jr., Medzhitov R: **Innate immune recognition**. *Annu Rev Immunol* 2002, **20**:197-216.
3. Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA: **The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity**. *Semin Immunol* 1998, **10**:363-372.
4. Kawai T, Akira S: **Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity**. *Immunity* 2011, **34**:637-650.
5. Underhill DM, Goodridge HS: **Information processing during phagocytosis**. *Nat Rev Immunol* 2012, **12**:492-502.
6. Aderem A, Underhill DM: **Mechanisms of phagocytosis in macrophages**. *Annu Rev Immunol* 1999, **17**:593-623.
7. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA: **Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils**. *Nat Immunol* 2011, **12**:1035-1044.
8. Kolaczowska E, Kubes P: **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation**. *Nat Rev Immunol* 2013, **13**:159-175.
9. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S: **Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated**. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:678-689.
10. Sadik CD, Kim ND, Luster AD: **Neutrophils cascading their way to inflammation**. *Trends Immunol* 2011, **32**:452-460.
11. Sanz MJ, Kubes P: **Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking**. *Eur J Immunol* 2012, **42**:278-283.
12. Charo IF, Ransohoff RM: **The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation**. *N Engl J Med* 2006, **354**:610-621.

13. Williams MR, Azcutia V, Newton G, Alcaide P, Luscinskas FW: **Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium.** *Trends Immunol* 2011, **32**:461-469.
14. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S: **Phagocytosis by neutrophils.** *Microbes Infect* 2003, **5**:1299-1306.
15. Dale DC, Boxer L, Liles WC: **The phagocytes: neutrophils and monocytes.** *Blood* 2008, **112**:935-945.
16. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC: **Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing.** *Blood* 1998, **92**:3007-3017.
17. Takeda K, Kaisho T, Akira S: **Toll-like receptors.** *Annu Rev Immunol* 2003, **21**:335-376.
18. Kawai T, Akira S: **The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition.** *Int Immunol* 2009, **21**:317-337.
19. Kabelitz D: **Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes.** *Curr Opin Immunol* 2007, **19**:39-45.
20. Browne EP: **Regulation of B-cell responses by Toll-like receptors.** *Immunology* 2012, **136**:370-379.
21. Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzone A, Davies DR, Segal DM: **Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors.** *Trends Immunol* 2003, **24**:528-533.
22. Takeda K, Akira S: **Microbial recognition by Toll-like receptors.** *J Dermatol Sci* 2004, **34**:73-82.
23. Kawai T, Akira S: **The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.** *Nat Immunol* 2010, **11**:373-384.
24. Takeda K, Akira S: **Toll-like receptors in innate immunity.** *Int Immunol* 2005, **17**:1-14.
25. Blasius AL, Beutler B: **Intracellular toll-like receptors.** *Immunity* 2010, **32**:305-315.
26. Pifer R, Benson A, Sturge CR, Yarovinsky F: **UNC93B1 is essential for TLR11 activation and IL-12-dependent host resistance to *Toxoplasma gondii*.** *J Biol Chem* 2011, **286**:3307-3314.

27. Kim YM, Brinkmann MM, Paquet ME, Ploegh HL: **UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes.** *Nature* 2008, **452**:234-238.
28. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: **Pathogen recognition and innate immunity.** *Cell* 2006, **124**:783-801.
29. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A: **Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:14459-14463.
30. Hallman M, Ramet M, Ezekowitz RA: **Toll-like receptors as sensors of pathogens.** *Pediatr Res* 2001, **50**:315-321.
31. Kumar H, Kawai T, Akira S: **Pathogen recognition in the innate immune response.** *Biochem J* 2009, **420**:1-16.
32. Mancuso G, Gambuzza M, Midiri A, Biondo C, Papasergi S, Akira S, Teti G, Beninati C: **Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells.** *Nat Immunol* 2009, **10**:587-594.
33. Gilliet M, Cao W, Liu YJ: **Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:594-606.
34. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C: **Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA.** *Science* 2004, **303**:1529-1531.
35. Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM: **Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands.** *Nat Immunol* 2009, **10**:1200-1207.
36. Kumar H, Kawai T, Akira S: **Pathogen recognition by the innate immune system.** *Int Rev Immunol* 2011, **30**:16-34.
37. Netea MG, Marodi L: **Innate immune mechanisms for recognition and uptake of Candida species.** *Trends Immunol* 2010, **31**:346-353.
38. Romani L: **Immunity to fungal infections.** *Nat Rev Immunol* 2011, **11**:275-288.

39. Gazzinelli RT, Denkers EY: **Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism.** *Nat Rev Immunol* 2006, **6**:895-906.
40. Underhill DM: **Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods.** *Immunol Rev* 2007, **219**:75-87.
41. Takeuchi O, Akira S: **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell* 2010, **140**:805-820.
42. Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R: **TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta.** *Nat Immunol* 2008, **9**:361-368.
43. Kawai T, Akira S: **TLR signaling.** *Semin Immunol* 2007, **19**:24-32.
44. Takeda K, Akira S: **TLR signaling pathways.** *Semin Immunol* 2004, **16**:3-9.
45. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S: **Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin.** *Immunity* 1999, **11**:115-122.
46. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S: **Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling.** *J Immunol* 2002, **169**:6668-6672.
47. Kawai T, Akira S: **Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling.** *Ann N Y Acad Sci* 2008, **1143**:1-20.
48. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, et al.: **CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer.** *Nat Immunol* 2010, **11**:155-161.
49. Mohan SV, Liao YJ, Kim JW, Goronzy JJ, Weyand CM: **Giant cell arteritis: immune and vascular aging as disease risk factors.** *Arthritis Res Ther* 2011, **13**:231.
50. Nikolich-Zugich J: **Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:512-522.
51. Nikolich-Zugich J, Li G, Uhrlaub JL, Renkema KR, Smithey MJ: **Age-related changes in CD8 T cell homeostasis and immunity to infection.** *Semin Immunol* 2012, **24**:356-364.

52. Aspinall R, Andrew D: **Thymic involution in aging.** *J Clin Immunol* 2000, **20**:250-256.
53. Stulnig T, Maczek C, Bock G, Majdic O, Wick G: **Reference intervals for human peripheral blood lymphocyte subpopulations from 'healthy' young and aged subjects.** *Int Arch Allergy Immunol* 1995, **108**:205-210.
54. Moss P: **The emerging role of cytomegalovirus in driving immune senescence: a novel therapeutic opportunity for improving health in the elderly.** *Curr Opin Immunol* 2010, **22**:529-534.
55. Czesnikiewicz-Guzik M, Lee WW, Cui D, Hiruma Y, Lamar DL, Yang ZZ, Ouslander JG, Weyand CM, Goronzy JJ: **T cell subset-specific susceptibility to aging.** *Clin Immunol* 2008, **127**:107-118.
56. Boren E, Gershwin ME: **Inflamm-aging: autoimmunity, and the immune-risk phenotype.** *Autoimmun Rev* 2004, **3**:401-406.
57. Nagel JE, Chopra RK, Chrest FJ, McCoy MT, Schneider EL, Holbrook NJ, Adler WH: **Decreased proliferation, interleukin 2 synthesis, and interleukin 2 receptor expression are accompanied by decreased mRNA expression in phytohemagglutinin-stimulated cells from elderly donors.** *J Clin Invest* 1988, **81**:1096-1102.
58. Caruso C, Candore G, Cigna D, DiLorenzo G, Sireci G, Dieli F, Salerno A: **Cytokine production pathway in the elderly.** *Immunol Res* 1996, **15**:84-90.
59. Castle S, Uyemura K, Wong W, Modlin R, Effros R: **Evidence of enhanced type 2 immune response and impaired upregulation of a type 1 response in frail elderly nursing home residents.** *Mech Ageing Dev* 1997, **94**:7-16.
60. Stacy S, Krolick KA, Infante AJ, Kraig E: **Immunological memory and late onset autoimmunity.** *Mech Ageing Dev* 2002, **123**:975-985.
61. Hsu HC, Mountz JD: **Origin of late-onset autoimmune disease.** *Immunol Allergy Clin North Am* 2003, **23**:65-82, vi.
62. Prelog M: **Aging of the immune system: a risk factor for autoimmunity?** *Autoimmun Rev* 2006, **5**:136-139.

63. Solana R, Tarazona R, Gayoso I, Lesur O, Dupuis G, Fulop T: **Innate immunosenescence: effect of aging on cells and receptors of the innate immune system in humans.** *Semin Immunol* 2012, **24**:331-341.
64. Fulop T, Larbi A, Douziech N, Fortin C, Guerard KP, Lesur O, Khalil A, Dupuis G: **Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging.** *Aging Cell* 2004, **3**:217-226.
65. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM: **Aging of the innate immune system.** *Curr Opin Immunol* 2010, **22**:507-513.
66. Nyugen J, Agrawal S, Gollapudi S, Gupta S: **Impaired functions of peripheral blood monocyte subpopulations in aged humans.** *J Clin Immunol* 2010, **30**:806-813.
67. Gomez CR, Boehmer ED, Kovacs EJ: **The aging innate immune system.** *Curr Opin Immunol* 2005, **17**:457-462.
68. Shaw AC, Panda A, Joshi SR, Qian F, Allore HG, Montgomery RR: **Dysregulation of human Toll-like receptor function in aging.** *Ageing Res Rev* 2011, **10**:346-353.
69. Panda A, Arjona A, Sapey E, Bai F, Fikrig E, Montgomery RR, Lord JM, Shaw AC: **Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age.** *Trends Immunol* 2009, **30**:325-333.
70. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Garcia-Unzueta M, Amado JA, Cacho PM, Martinez-Taboada VM: **Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function.** *J Leukoc Biol* 2012, **91**:829-838.
71. Campisi J, d'Adda di Fagagna F: **Cellular senescence: when bad things happen to good cells.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**:729-740.
72. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Munoz-Cacho P, Martinez-Taboada VM: **Aging is associated with circulating cytokine dysregulation.** *Cell Immunol* 2012, **273**:124-132.
73. Goronzy JJ, Lee WW, Weyand CM: **Aging and T-cell diversity.** *Exp Gerontol* 2007, **42**:400-406.

74. Goronzy JJ, Fulbright JW, Crowson CS, Poland GA, O'Fallon WM, Weyand CM: **Value of immunological markers in predicting responsiveness to influenza vaccination in elderly individuals.** *J Virol* 2001, **75**:12182-12187.
75. Mora JR, Iwata M, von Andrian UH: **Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage.** *Nat Rev Immunol* 2008, **8**:685-698.
76. Holick MF: **Vitamin D deficiency.** *N Engl J Med* 2007, **357**:266-281.
77. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW: **The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed.** *J Bone Miner Res* 1998, **13**:325-349.
78. Uitterlinden AG, Fang Y, van Meurs JB, van Leeuwen H, Pols HA: **Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004, **89-90**:187-193.
79. Peelen E, Knippenberg S, Muris AH, Thewissen M, Smolders J, Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J: **Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review.** *Autoimmun Rev* 2011, **10**:733-743.
80. Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC: **Vitamin D and inflammation.** *Joint Bone Spine* 2010, **77**:552-557.
81. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC: **1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes.** *Science* 1983, **221**:1181-1183.
82. Cantorna MT: **Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system.** *Proc Nutr Soc* 2010, **69**:286-289.
83. Cutolo M, Pizzorni C, Sulli A: **Vitamin D endocrine system involvement in autoimmune rheumatic diseases.** *Autoimmun Rev* 2011, **11**:84-87.
84. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N: **Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm.** *Joint Bone Spine* 2008, **75**:373-375.

85. Kamen DL, Tangpricha V: **Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity.** *J Mol Med (Berl)* 2010, **88**:441-450.
86. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, Tavera-Mendoza L, Lin R, Hanrahan JW, Mader S, et al.: **Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression.** *J Immunol* 2004, **173**:2909-2912.
87. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP: **Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3.** *FASEB J* 2005, **19**:1067-1077.
88. Valdivielso JM, Fernandez E: **Vitamin D receptor polymorphisms and diseases.** *Clin Chim Acta* 2006, **371**:1-12.
89. Whitfield GK, Remus LS, Jurutka PW, Zitzer H, Oza AK, Dang HT, Haussler CA, Galligan MA, Thatcher ML, Encinas Dominguez C, et al.: **Functionally relevant polymorphisms in the human nuclear vitamin D receptor gene.** *Mol Cell Endocrinol* 2001, **177**:145-159.
90. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP: **Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms.** *Gene* 2004, **338**:143-156.
91. Faraco JH, Morrison NA, Baker A, Shine J, Frossard PM: **Apal dimorphism at the human vitamin D receptor gene locus.** *Nucleic Acids Res* 1989, **17**:2150.
92. Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA: **Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**:6665-6669.
93. Morrison NA, Qi JC, Tokita A, Kelly PJ, Crofts L, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA: **Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles.** *Nature* 1994, **367**:284-287.
94. Gross C, Eccleshall TR, Malloy PJ, Villa ML, Marcus R, Feldman D: **The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women.** *J Bone Miner Res* 1996, **11**:1850-1855.

95. Gross C, Krishnan AV, Malloy PJ, Eccleshall TR, Zhao XY, Feldman D: **The vitamin D receptor gene start codon polymorphism: a functional analysis of FokI variants.** *J Bone Miner Res* 1998, **13**:1691-1699.
96. Saijo T, Ito M, Takeda E, Huq AH, Naito E, Yokota I, Sone T, Pike JW, Kuroda Y: **A unique mutation in the vitamin D receptor gene in three Japanese patients with vitamin D-dependent rickets type II: utility of single-strand conformation polymorphism analysis for heterozygous carrier detection.** *Am J Hum Genet* 1991, **49**:668-673.
97. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, Tonai T, Nishisho T, Mori S, Takeda E: **A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women.** *J Bone Miner Res* 1997, **12**:915-921.
98. Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J, O'Malley BW: **Cloning and expression of full-length cDNA encoding human vitamin D receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**:3294-3298.
99. Colin EM, Weel AE, Uitterlinden AG, Buurman CJ, Birkenhager JC, Pols HA, van Leeuwen JP: **Consequences of vitamin D receptor gene polymorphisms for growth inhibition of cultured human peripheral blood mononuclear cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D3.** *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000, **52**:211-216.
100. van Etten E, Verlinden L, Giuliatti A, Ramos-Lopez E, Branisteanu DD, Ferreira GB, Overbergh L, Verstuyf A, Bouillon R, Roep BO, et al.: **The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system.** *Eur J Immunol* 2007, **37**:395-405.
101. Arnson Y, Amital H, Shoenfeld Y: **Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**:1137-1142.
102. Adorini L, Penna G: **Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system.** *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008, **4**:404-412.
103. Pelajo CF, Lopez-Benitez JM, Miller LC: **Vitamin D and autoimmune rheumatologic disorders.** *Autoimmun Rev* 2010, **9**:507-510.

104. Cutolo M: **Vitamin D or hormone D deficiency in autoimmune rheumatic diseases, including undifferentiated connective tissue disease.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10**:123.
105. Arnson Y, Amital H, Agmon-Levin N, Alon D, Sanchez-Castanon M, Lopez-Hoyos M, Matucci-Cerinic M, Szucs G, Shapira Y, Szekanecz Z, et al.: **Serum 25-OH vitamin D concentrations are linked with various clinical aspects in patients with systemic sclerosis: a retrospective cohort study and review of the literature.** *Autoimmun Rev* 2011, **10**:490-494.
106. Agmon-Levin N, Kivity S, Tzioufas AG, Lopez Hoyos M, Rozman B, Efes I, Shapira Y, Shamis A, Amital H, Youinou P, et al.: **Low levels of vitamin-D are associated with neuropathy and lymphoma among patients with Sjogren's syndrome.** *J Autoimmun* 2012, **39**:234-239.
107. Hajas A, Sandor J, Csathy L, Csipo I, Barath S, Paragh G, Seres I, Szegedi G, Shoenfeld Y, Bodolay E: **Vitamin D insufficiency in a large MCTD population.** *Autoimmun Rev* 2011, **10**:317-324.
108. Smolders J, Thewissen M, Peelen E, Menheere P, Tervaert JW, Damoiseaux J, Hupperts R: **Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis.** *PLoS One* 2009, **4**:e6635.
109. Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, Hunder GG: **Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis.** *N Engl J Med* 2002, **347**:261-271.
110. Chuang TY, Hunder GG, Ilstrup DM, Kurland LT: **Polymyalgia rheumatica: a 10-year epidemiologic and clinical study.** *Ann Intern Med* 1982, **97**:672-680.
111. Gonzalez-Gay MA, Vazquez-Rodriguez TR, Lopez-Diaz MJ, Miranda-Filloo JA, Gonzalez-Juanatey C, Martin J, Llorca J: **Epidemiology of giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica.** *Arthritis Rheum* 2009, **61**:1454-1461.
112. Borchers AT, Gershwin ME: **Giant cell arteritis: a review of classification, pathophysiology, geoepidemiology and treatment.** *Autoimmun Rev* 2012, **11**:A544-554.
113. Salvarani C, Cantini F, Hunder GG: **Polymyalgia rheumatica and giant-cell arteritis.** *Lancet* 2008, **372**:234-245.

114. Blockmans D, De Ceuninck L, Vanderschueren S, Knockaert D, Mortelmans L, Bobbaers H: **Repetitive 18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in isolated polymyalgia rheumatica: a prospective study in 35 patients.** *Rheumatology (Oxford)* 2007, **46**:672-677.
115. Rodriguez-Valverde V, Martinez-Taboada V, Gonzalez-Gay M, Blanco R: **Vasculitis de grandes arterias. Arteritis de células gigantes. Polimialgia reumática. Arteritis de Takayasu.** *Medicine (Baltimore)* 1997, **7**:2614-2622.
116. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, Edworthy SM, Fauci AS, Leavitt RY, Lie JT, et al.: **The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis.** *Arthritis Rheum* 1990, **33**:1122-1128.
117. Jennette JC, Falk RJ, Bacon PA, Basu N, Cid MC, Ferrario F, Flores-Suarez LF, Gross WL, Guillevin L, Hagen EC, et al.: **2012 revised International Chapel Hill Consensus Conference Nomenclature of Vasculitides.** *Arthritis Rheum* 2013, **65**:1-11.
118. Salvarani C, Pipitone N, Versari A, Hunder GG: **Clinical features of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis.** *Nat Rev Rheumatol* 2012, **8**:509-521.
119. Hall S, Hunder GG: **Is temporal artery biopsy prudent?** *Mayo Clin Proc* 1984, **59**:793-796.
120. Healey LA: **Long-term follow-up of polymyalgia rheumatica: evidence for synovitis.** *Semin Arthritis Rheum* 1984, **13**:322-328.
121. Bird HA, Esselinckx W, Dixon AS, Mowat AG, Wood PH: **An evaluation of criteria for polymyalgia rheumatica.** *Ann Rheum Dis* 1979, **38**:434-439.
122. Dasgupta B, Cimmino MA, Maradit-Kremers H, Schmidt WA, Schirmer M, Salvarani C, Bachta A, Dejaco C, Duftner C, Jensen HS, et al.: **2012 provisional classification criteria for polymyalgia rheumatica: a European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology collaborative initiative.** *Ann Rheum Dis* 2012, **71**:484-492.
123. Salvarani C, Cimino L, Macchioni P, Consonni D, Cantini F, Bajocchi G, Pipitone N, Catanoso MG, Boiardi L: **Risk factors for visual loss in an Italian population-based cohort of patients with giant cell arteritis.** *Arthritis Rheum* 2005, **53**:293-297.

124. Huston KA, Hunder GG, Lie JT, Kennedy RH, Elveback LR: **Temporal arteritis: a 25-year epidemiologic, clinical, and pathologic study.** *Ann Intern Med* 1978, **88**:162-167.
125. Salvarani C, Gabriel SE, Gertz MA, Bjornsson J, Li CY, Hunder GG: **Primary systemic amyloidosis presenting as giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica.** *Arthritis Rheum* 1994, **37**:1621-1626.
126. Aiello PD, Trautmann JC, McPhee TJ, Kunselman AR, Hunder GG: **Visual prognosis in giant cell arteritis.** *Ophthalmology* 1993, **100**:550-555.
127. Reich KA, Giansiracusa DF, Strongwater SL: **Neurologic manifestations of giant cell arteritis.** *Am J Med* 1990, **89**:67-72.
128. Salvarani C, Della Bella C, Cimino L, Macchioni P, Formisano D, Bajocchi G, Pipitone N, Catanoso MG, Restuccia G, Ghinoi A, et al.: **Risk factors for severe cranial ischaemic events in an Italian population-based cohort of patients with giant cell arteritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2009, **48**:250-253.
129. Lie JT: **Aortic and extracranial large vessel giant cell arteritis: a review of 72 cases with histopathologic documentation.** *Semin Arthritis Rheum* 1995, **24**:422-431.
130. Liu G, Shupak R, Chiu BK: **Aortic dissection in giant-cell arteritis.** *Semin Arthritis Rheum* 1995, **25**:160-171.
131. Klein RG, Hunder GG, Stanson AW, Sheps SG: **Large artery involvement in giant cell (temporal) arteritis.** *Ann Intern Med* 1975, **83**:806-812.
132. Stanson AW, Klein RG, Hunder GG: **Extracranial angiographic findings in giant cell (temporal) arteritis.** *AJR Am J Roentgenol* 1976, **127**:957-963.
133. Hunder GG, Ward LE, Burbank MK: **Giant-cell arteritis producing an aortic arch syndrome.** *Ann Intern Med* 1967, **66**:578-582.
134. Rodriguez-Valverde V, Sarabia JM, Gonzalez-Gay MA, Figueroa M, Armona J, Blanco R, Fernandez-Sueiro JL, Martinez-Taboada VM: **Risk factors and predictive models of giant cell arteritis in polymyalgia rheumatica.** *Am J Med* 1997, **102**:331-336.

135. Cohen MD, Ginsburg WW: **Polymyalgia rheumatica**. *Rheum Dis Clin North Am* 1990, **16**:325-339.
136. Weyand CM, Goronzy JJ: **Giant cell arteritis as an antigen-driven disease**. *Rheum Dis Clin North Am* 1995, **21**:1027-1039.
137. Hickstein DD, Gravelyn TR, Wharton M: **Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica in a conjugal pair**. *Arthritis Rheum* 1981, **24**:1448-1450.
138. Meliconi R, Pulsatelli L, Uguccioni M, Salvarani C, Macchioni P, Melchiorri C, Focherini MC, Frizziero L, Facchini A: **Leukocyte infiltration in synovial tissue from the shoulder of patients with polymyalgia rheumatica. Quantitative analysis and influence of corticosteroid treatment**. *Arthritis Rheum* 1996, **39**:1199-1207.
139. Meliconi R, Pulsatelli L, Melchiorri C, Frizziero L, Salvarani C, Macchioni P, Uguccioni M, Focherini MC, Facchini A: **Synovial expression of cell adhesion molecules in polymyalgia rheumatica**. *Clin Exp Immunol* 1997, **107**:494-500.
140. Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ: **Tissue cytokine patterns in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis**. *Ann Intern Med* 1994, **121**:484-491.
141. Cantini F, Salvarani C, Olivieri I: **Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in the diagnosis of polymyalgia rheumatica**. *Ann Intern Med* 1998, **128**:873-874.
142. Kyle V, Cawston TE, Hazleman BL: **Erythrocyte sedimentation rate and C reactive protein in the assessment of polymyalgia rheumatica/giant cell arteritis on presentation and during follow up**. *Ann Rheum Dis* 1989, **48**:667-671.
143. Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, Hunder GG: **Laboratory investigations useful in giant cell arteritis and Takayasu's arteritis**. *Clin Exp Rheumatol* 2003, **21**:S23-28.
144. Duhaut P, Berruyer M, Pinede L, Demolombe-Rague S, Loire R, Seydoux D, Dechavanne M, Ninet J, Pasquier J: **Anticardiolipin antibodies and giant cell arteritis: a prospective, multicenter case-control study. Groupe de Recherche sur l'Arterite a Cellules Geantes**. *Arthritis Rheum* 1998, **41**:701-709.

145. Meyer O, Nicaise P, Moreau S, de Bandt M, Palazzo E, Hayem G, Chazeraïn P, Labarre C, Kahn MF: **Antibodies to cardiolipin and beta 2 glycoprotein I in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis.** *Rev Rhum Engl Ed* 1996, **63**:241-247.
146. McLean RM, Greco TP: **Anticardiolipin antibodies in the polymyalgia rheumatica-temporal arteritis syndromes.** *Clin Rheumatol* 1995, **14**:191-196.
147. Manna R, Latteri M, Cristiano G, Todaro L, Scuderi F, Gasbarrini G: **Anticardiolipin antibodies in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: a study of 40 cases.** *Br J Rheumatol* 1998, **37**:208-210.
148. Chakravarty K, Pountain G, Merry P, Byron M, Hazleman B, Scott DG: **A longitudinal study of anticardiolipin antibody in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis.** *J Rheumatol* 1995, **22**:1694-1697.
149. Armona J, Rodriguez-Valverde V, Gonzalez-Gay MA, Figueroa M, Fernandez-Sueiro JL, Blanco R, Martinez-Taboada V: **[Giant cell arteritis. A study of 191 patients].** *Med Clin (Barc)* 1995, **105**:734-737.
150. Klein RG, Campbell RJ, Hunder GG, Carney JA: **Skip lesions in temporal arteritis.** *Mayo Clin Proc* 1976, **51**:504-510.
151. Germano G, Pipitone N, Boiardi L, Chiarolanza I, Cimino L, Catanos MG, A C: **Does Ultrasonography Guidance Increase The Yield Of Temporal Artery Biopsy In Patients With Giant Cell Arteritis? Preliminary Results From A Single-Blinded Randomized Study.** *Arthritis Rheum* 2011, **63**:S594.
152. Salvarani C, Hunder GG: **Giant cell arteritis with low erythrocyte sedimentation rate: frequency of occurrence in a population-based study.** *Arthritis Rheum* 2001, **45**:140-145.
153. Narvaez J, Bernad B, Roig-Vilaseca D, Garcia-Gomez C, Gomez-Vaquero C, Juanola X, Rodriguez-Moreno J, Nolla JM, Valverde J: **Influence of previous corticosteroid therapy on temporal artery biopsy yield in giant cell arteritis.** *Semin Arthritis Rheum* 2007, **37**:13-19.
154. Brack A, Martinez-Taboada V, Stanson A, Goronzy JJ, Weyand CM: **Disease pattern in cranial and large-vessel giant cell arteritis.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:311-317.

155. Pipitone N, Versari A, Salvarani C: **Role of imaging studies in the diagnosis and follow-up of large-vessel vasculitis: an update.** *Rheumatology (Oxford)* 2008, **47**:403-408.
156. Pipitone N, Salvarani C: **Improving therapeutic options for patients with giant cell arteritis.** *Curr Opin Rheumatol* 2008, **20**:17-22.
157. Hernandez-Rodriguez J, Garcia-Martinez A, Casademont J, Filella X, Esteban MJ, Lopez-Soto A, Fernandez-Sola J, Urbano-Marquez A, Grau JM, Cid MC: **A strong initial systemic inflammatory response is associated with higher corticosteroid requirements and longer duration of therapy in patients with giant-cell arteritis.** *Arthritis Rheum* 2002, **47**:29-35.
158. Achkar AA, Lie JT, Hunder GG, O'Fallon WM, Gabriel SE: **How does previous corticosteroid treatment affect the biopsy findings in giant cell (temporal) arteritis?** *Ann Intern Med* 1994, **120**:987-992.
159. Gonzalez-Gay MA, Blanco R, Rodriguez-Valverde V, Martinez-Taboada VM, Delgado-Rodriguez M, Figueroa M, Uriarte E: **Permanent visual loss and cerebrovascular accidents in giant cell arteritis: predictors and response to treatment.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**:1497-1504.
160. Fraser JA, Weyand CM, Newman NJ, Biousse V: **The treatment of giant cell arteritis.** *Rev Neurol Dis* 2008, **5**:140-152.
161. Masson C: **Therapeutic approach to giant cell arteritis.** *Joint Bone Spine* 2012, **79**:219-227.
162. Salvarani C, Gabriel SE, O'Fallon WM, Hunder GG: **The incidence of giant cell arteritis in Olmsted County, Minnesota: apparent fluctuations in a cyclic pattern.** *Ann Intern Med* 1995, **123**:192-194.
163. Weyand CM, Ma-Krupa W, Pryshchep O, Groschel S, Bernardino R, Goronzy JJ: **Vascular dendritic cells in giant cell arteritis.** *Ann N Y Acad Sci* 2005, **1062**:195-208.
164. Ma-Krupa W, Jeon MS, Spoerl S, Tedder TF, Goronzy JJ, Weyand CM: **Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis.** *J Exp Med* 2004, **199**:173-183.
165. Ly KH, Regent A, Tamby MC, Mouthon L: **Pathogenesis of giant cell arteritis: More than just an inflammatory condition?** *Autoimmun Rev* 2010, **9**:635-645.

166. Pipitone N, Salvarani C: **The role of infectious agents in the pathogenesis of vasculitis.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008, **22**:897-911.
167. Gonzalez-Gay MA, Pineiro A, Gomez-Gigirey A, Garcia-Porrúa C, Pego-Reigosa R, Dierssen-Sotos T, Llorca J: **Influence of traditional risk factors of atherosclerosis in the development of severe ischemic complications in giant cell arteritis.** *Medicine (Baltimore)* 2004, **83**:342-347.
168. Martinez-Taboada VM, Bartolome MJ, Fernandez-Gonzalez MD, Blanco R, Rodriguez-Valverde V, Lopez-Hoyos M: **Homocysteine levels in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: influence of corticosteroid therapy.** *Rheumatology (Oxford)* 2003, **42**:1055-1061.
169. Liang GC, Simkin PA, Hunder GG, Wilske KR, Healey LA: **Familial aggregation of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis.** *Arthritis Rheum* 1974, **17**:19-24.
170. Calamia KT, Moore SB, Elveback LR, Hunder GG: **HLA-DR locus antigens in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis.** *J Rheumatol* 1981, **8**:993-996.
171. Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ: **The HLA-DRB1 locus as a genetic component in giant cell arteritis. Mapping of a disease-linked sequence motif to the antigen binding site of the HLA-DR molecule.** *J Clin Invest* 1992, **90**:2355-2361.
172. Bridgeford PH, Lowenstein M, Bocanegra TS, Vasey FB, Germain BF, Espinoza LR: **Polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: histocompatibility typing and hepatitis-B infection studies.** *Arthritis Rheum* 1980, **23**:516-518.
173. Cid MC, Ercilla G, Vilaseca J, Sanmarti R, Villalta J, Ingelmo M, Urbano-Marquez A: **Polymyalgia rheumatica: a syndrome associated with HLA-DR4 antigen.** *Arthritis Rheum* 1988, **31**:678-682.
174. Gonzalez-Gay MA, Garcia-Porrúa C, Ollier WE: **Polymyalgia rheumatica and biopsy-proven giant cell arteritis exhibit different HLA-DRB1* associations.** *J Rheumatol* 2003, **30**:2729.

175. Martinez-Taboda VM, Bartolome MJ, Lopez-Hoyos M, Blanco R, Mata C, Calvo J, Corrales A, Rodriguez-Valverde V: **HLA-DRB1 allele distribution in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: influence on clinical subgroups and prognosis.** *Semin Arthritis Rheum* 2004, **34**:454-464.
176. Weyand CM, Hunder NN, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ: **HLA-DRB1 alleles in polymyalgia rheumatica, giant cell arteritis, and rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1994, **37**:514-520.
177. Guerne PA, Salvi M, Seitz M, Bruhlmann P, Rivier G, Frey D, Mermillod B, Vischer TL, Tiercy JM: **Molecular analysis of HLA-DR polymorphism in polymyalgia rheumatica. Swiss Group for Research on HLA in Polymyalgia Rheumatica.** *J Rheumatol* 1997, **24**:671-676.
178. Combe B, Sany J, Le Quellec A, Clot J, Eliaou JF: **Distribution of HLA-DRB1 alleles of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in a Mediterranean population.** *J Rheumatol* 1998, **25**:94-98.
179. Gonzalez-Gay MA, Amoli MM, Garcia-Porrúa C, Ollier WE: **Genetic markers of disease susceptibility and severity in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica.** *Semin Arthritis Rheum* 2003, **33**:38-48.
180. Salvarani C, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni P, Cimino L, Bajocchi G, Catanoso MG, Boiardi L: **Interleukin-6 promoter polymorphism at position -174 in giant cell arteritis.** *J Rheumatol* 2005, **32**:2173-2177.
181. Gonzalez-Gay MA, Rueda B, Vilchez JR, Lopez-Nevot MA, Robledo G, Ruiz MP, Fernandez O, Garcia-Porrúa C, Gonzalez-Escribano MF, Martin J: **Contribution of MHC class I region to genetic susceptibility for giant cell arteritis.** *Rheumatology (Oxford)* 2007, **46**:431-434.
182. Enjuanes A, Benavente Y, Hernandez-Rodriguez J, Queralto C, Yague J, Jares P, de Sanjose S, Campo E, Cid MC: **Association of NOS2 and potential effect of VEGF, IL6, CCL2 and IL1RN polymorphisms and haplotypes on susceptibility to GCA--a simultaneous study of 130 potentially functional SNPs in 14 candidate genes.** *Rheumatology (Oxford)* 2012, **51**:841-851.
183. Weyand CM, Goronzy JJ: **Giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica.** *Ann Intern Med* 2003, **139**:505-515.

184. Weyand CM, Goronzy JJ: **Medium- and large-vessel vasculitis**. *N Engl J Med* 2003, **349**:160-169.
185. Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM: **Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries**. *Circulation* 2008, **118**:1276-1284.
186. Ma-Krupa W, Kwan M, Goronzy JJ, Weyand CM: **Toll-like receptors in giant cell arteritis**. *Clin Immunol* 2005, **115**:38-46.
187. Han JW, Shimada K, Ma-Krupa W, Johnson TL, Nerem RM, Goronzy JJ, Weyand CM: **Vessel wall-embedded dendritic cells induce T-cell autoreactivity and initiate vascular inflammation**. *Circ Res* 2008, **102**:546-553.
188. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA: **Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease**. *Nat Immunol* 2004, **5**:975-979.
189. Krupa WM, Dewan M, Jeon MS, Kurtin PJ, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM: **Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis**. *Am J Pathol* 2002, **161**:1815-1823.
190. Deng J, Younge BR, Olshen RA, Goronzy JJ, Weyand CM: **Th17 and Th1 T-cell responses in giant cell arteritis**. *Circulation* 2010, **121**:906-915.
191. Weyand CM, Younge BR, Goronzy JJ: **IFN-gamma and IL-17: the two faces of T-cell pathology in giant cell arteritis**. *Curr Opin Rheumatol* 2011, **23**:43-49.
192. Samson M, Audia S, Fraszczak J, Trad M, Ornetti P, Lakomy D, Ciudad M, Leguy V, Berthier S, Vinit J, et al.: **Th1 and Th17 lymphocytes expressing CD161 are implicated in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica pathogenesis**. *Arthritis Rheum* 2012, **64**:3788-3798.
193. Ciccia F, Alessandro R, Rizzo A, Principe S, Raiata F, Cavazza A, Guggino G, Accardo-Palumbo A, Boiardi L, Ferrante A, et al.: **Expression of interleukin-32 in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis**. *Arthritis Rheum* 2011, **63**:2097-2104.
194. Kim SH, Han SY, Azam T, Yoon DY, Dinarello CA: **Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNFalpha**. *Immunity* 2005, **22**:131-142.

195. Terrier B, Geri G, Choura W, Allenbach Y, Rosenzweig M, Costedoat-Chalumeau N, Fourret P, Musset L, Benveniste O, Six A, et al.: **Interleukin-21 modulates Th1 and Th17 responses in giant cell arteritis.** *Arthritis Rheum* 2012, **64**:2001-2011.
196. Ettinger R, Kuchen S, Lipsky PE: **The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease.** *Immunol Rev* 2008, **223**:60-86.
197. Weyand CM, Goronzy JJ: **Arterial wall injury in giant cell arteritis.** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:844-853.
198. Martinez-Taboada VM, Alvarez L, RuizSoto M, Marin-Vidalled MJ, Lopez-Hoyos M: **Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: role of cytokines in the pathogenesis and implications for treatment.** *Cytokine* 2008, **44**:207-220.
199. Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM: **Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis.** *Arthritis Rheum* 1993, **36**:1286-1294.
200. Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sanchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ, Grau JM, Urbano-Marquez A, Colomer D, Kleinman HK, et al.: **Elevated production of interleukin-6 is associated with a lower incidence of disease-related ischemic events in patients with giant-cell arteritis: angiogenic activity of interleukin-6 as a potential protective mechanism.** *Circulation* 2003, **107**:2428-2434.
201. Segarra M, Garcia-Martinez A, Sanchez M, Hernandez-Rodriguez J, Lozano E, Grau JM, Cid MC: **Gelatinase expression and proteolytic activity in giant-cell arteritis.** *Ann Rheum Dis* 2007, **66**:1429-1435.
202. Rodriguez-Pla A, Bosch-Gil JA, Rossello-Urgell J, Huguet-Redecilla P, Stone JH, Vilardell-Tarres M: **Metalloproteinase-2 and -9 in giant cell arteritis: involvement in vascular remodeling.** *Circulation* 2005, **112**:264-269.
203. Rittner HL, Kaiser M, Brack A, Szweida LI, Goronzy JJ, Weyand CM: **Tissue-destructive macrophages in giant cell arteritis.** *Circ Res* 1999, **84**:1050-1058.

204. Rittner HL, Hafner V, Klimiuk PA, Szweda LI, Goronzy JJ, Weyand CM: **Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis.** *J Clin Invest* 1999, **103**:1007-1013.
205. Kaiser M, Weyand CM, Björnsson J, Goronzy JJ: **Platelet-derived growth factor, intimal hyperplasia, and ischemic complications in giant cell arteritis.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**:623-633.
206. Makkuni D, Bharadwaj A, Wolfe K, Payne S, Hutchings A, Dasgupta B: **Is intimal hyperplasia a marker of neuro-ophthalmic complications of giant cell arteritis?** *Rheumatology (Oxford)* 2008, **47**:488-490.
207. Kaiser M, Younge B, Björnsson J, Goronzy JJ, Weyand CM: **Formation of new vasa vasorum in vasculitis. Production of angiogenic cytokines by multinucleated giant cells.** *Am J Pathol* 1999, **155**:765-774.
208. Kreiner F, Langberg H, Galbo H: **Increased muscle interstitial levels of inflammatory cytokines in polymyalgia rheumatica.** *Arthritis Rheum* 2010, **62**:3768-3775.
209. Martínez-Taboada V, Brack A, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM: **The inflammatory infiltrate in giant cell arteritis selects against B lymphocytes.** *J Rheumatol* 1996, **23**:1011-1014.
210. Martínez-Taboada VM, Goronzy JJ, Weyand CM: **Conceptos actuales sobre la patogenia de la arteritis de células gigantes.** . *Rev Esp Reumatol* 1994, **21**:293 – 299.
211. Gonzalez-Gay MA, Rodriguez-Valverde V, Blanco R, Fernandez-Sueiro JL, Armona J, Figueroa M, Martínez-Taboada VM: **Polymyalgia rheumatica without significantly increased erythrocyte sedimentation rate. A more benign syndrome.** *Arch Intern Med* 1997, **157**:317-320.
212. Martínez-Taboada V, Blanco R, Rodriguez-Valverde V: **Arteritis de células gigantes.** . *Semin Fund Esp Reumatol*. 2000, **1**:141–157.
213. Lorenz E, Frees KL, Schwartz DA: **Determination of the TLR4 genotype using allele-specific PCR.** *Biotechniques* 2001, **31**:22-24.

214. Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schumann RR: **Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor -2, -4, and -9 genes.** *J Immunol Methods* 2004, **285**:281-291.
215. Vupputuri MR, Goswami R, Gupta N, Ray D, Tandon N, Kumar N: **Prevalence and functional significance of 25-hydroxyvitamin D deficiency and vitamin D receptor gene polymorphisms in Asian Indians.** *Am J Clin Nutr* 2006, **83**:1411-1419.
216. Diebold SS: **Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors.** *Adv Drug Deliv Rev* 2008, **60**:813-823.
217. Browning BL, Huebner C, Petermann I, Gearry RB, Barclay ML, Shelling AN, Ferguson LR: **Has toll-like receptor 4 been prematurely dismissed as an inflammatory bowel disease gene? Association study combined with meta-analysis shows strong evidence for association.** *Am J Gastroenterol* 2007, **102**:2504-2512.
218. Pabst S, Baumgarten G, Stremmel A, Lennarz M, Knufermann P, Gillissen A, Vetter H, Grohe C: **Toll-like receptor (TLR) 4 polymorphisms are associated with a chronic course of sarcoidosis.** *Clin Exp Immunol* 2006, **143**:420-426.
219. Schroder NW, Schumann RR: **Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious disease.** *Lancet Infect Dis* 2005, **5**:156-164.
220. Frantz S, Ertl G, Bauersachs J: **Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease.** *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007, **4**:444-454.
221. Kiechl S, Lorenz E, Reindl M, Wiedermann CJ, Oberhollenzer F, Bonora E, Willeit J, Schwartz DA: **Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis.** *N Engl J Med* 2002, **347**:185-192.
222. Palomino-Morales R, Torres O, Vazquez-Rodriguez TR, Morado IC, Castaneda S, Callejas-Rubio JL, Miranda-Fillooy JA, Fernandez-Gutierrez B, Martin J, Gonzalez-Gay MA: **Association between toll-like receptor 4 gene polymorphism and biopsy-proven giant cell arteritis.** *J Rheumatol* 2009, **36**:1501-1506.

223. Boiardi L, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni P, Cimino L, Bajocchi GL, Catanoso MG, Pattacini L, et al.: **Toll-like receptor 4 (TLR4) gene polymorphisms in giant cell arteritis.** *Clin Exp Rheumatol* 2009, **27**:S40-44.
224. Veltkamp M, Van Moorsel CH, Rijkers GT, Ruven HJ, Van Den Bosch JM, Grutters JC: **Toll-like receptor (TLR)-9 genetics and function in sarcoidosis.** *Clin Exp Immunol* 2010, **162**:68-74.
225. Ng MT, Van't Hof R, Crockett JC, Hope ME, Berry S, Thomson J, McLean MH, McColl KE, El-Omar EM, Hold GL: **Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with Helicobacter pylori-induced gastric disease.** *Infect Immun* 2010, **78**:1345-1352.
226. Perez-Lopez FR, Chedraui P, Fernandez-Alonso AM: **Vitamin D and aging: beyond calcium and bone metabolism.** *Maturitas* 2011, **69**:27-36.
227. Mo R, Chen J, Han Y, Bueno-Cannizares C, Misek DE, Lescure PA, Hanash S, Yung RL: **T cell chemokine receptor expression in aging.** *J Immunol* 2003, **170**:895-904.
228. Mariani E, Pulsatelli L, Meneghetti A, Dolzani P, Mazzetti I, Neri S, Ravaglia G, Forti P, Facchini A: **Different IL-8 production by T and NK lymphocytes in elderly subjects.** *Mech Ageing Dev* 2001, **122**:1383-1395.
229. Gur-Toy G, Lenk N, Yalcin B, Aksaray S, Alli N: **Serum interleukin-8 as a serologic marker of activity in Behcet's disease.** *Int J Dermatol* 2005, **44**:657-660.
230. Tripathy NK, Sinha N, Nityanand S: **Interleukin-8 in Takayasu's arteritis: plasma levels and relationship with disease activity.** *Clin Exp Rheumatol* 2004, **22**:S27-30.
231. Freire Ade L, Bertolo MB, de Pinho AJ, Jr., Samara AM, Fernandes SR: **Increased serum levels of interleukin-8 in polyarteritis nodosa and Behcet's disease.** *Clin Rheumatol* 2004, **23**:203-205.
232. Asano T, Ogawa S: **Expression of IL-8 in Kawasaki disease.** *Clin Exp Immunol* 2000, **122**:514-519.

233. al-Dalaan A, al-Sedairy S, al-Balaa S, al-Janadi M, Elramahi K, Bahabri S, Siddiqui S: **Enhanced interleukin 8 secretion in circulation of patients with Behcet's disease.** *J Rheumatol* 1995, **22**:904-907.
234. Stabler T, Piette JC, Chevalier X, Marini-Portugal A, Kraus VB: **Serum cytokine profiles in relapsing polychondritis suggest monocyte/macrophage activation.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:3663-3667.
235. Pulsatelli L, Meliconi R, Boiardi L, Macchioni P, Salvarani C, Facchini A: **Elevated serum concentrations of the chemokine RANTES in patients with polymyalgia rheumatica.** *Clin Exp Rheumatol* 1998, **16**:263-268.
236. Belguendouz H, Messaoudene D, Hartani D, Chachoua L, Ahmed ML, Lahmar-Belguendouz K, Lahlou-Boukoffa O, Touil-Boukoffa C: **[Effect of corticotherapy on interleukin-8 and -12 and nitric oxide production during Behcet and idiopathic uveitis].** *J Fr Ophtalmol* 2008, **31**:387-395.
237. Braga PC, Sala MT, Dal Sasso M, Pecile A, Annoni G, Vergani C: **Age-associated differences in neutrophil oxidative burst (chemiluminescence).** *Exp Gerontol* 1998, **33**:477-484.
238. Foell D, Hernandez-Rodriguez J, Sanchez M, Vogl T, Cid MC, Roth J: **Early recruitment of phagocytes contributes to the vascular inflammation of giant cell arteritis.** *J Pathol* 2004, **204**:311-316.
239. Shalekoff S, Tiemessen CT, Gray CM, Martin DJ: **Depressed phagocytosis and oxidative burst in polymorphonuclear leukocytes from individuals with pulmonary tuberculosis with or without human immunodeficiency virus type 1 infection.** *Clin Diagn Lab Immunol* 1998, **5**:41-44.
240. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A: **Neutrophil function: from mechanisms to disease.** *Annu Rev Immunol* 2012, **30**:459-489.
241. Li JL, Ng LG: **Peeking into the secret life of neutrophils.** *Immunol Res* 2012, **53**:168-181.
242. Ju X, Clark G, Hart DN: **Review of human DC subtypes.** *Methods Mol Biol* 2010, **595**:3-20.

243. Akira S, Takeda K, Kaisho T: **Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.** *Nat Immunol* 2001, **2**:675-680.
244. Sanchez E, Callejas-Rubio JL, Sabio JM, Gonzalez-Gay MA, Jimenez-Alonso J, Mico L, de Ramon E, Camps M, Suarez A, Gutierrez C, et al.: **Investigation of TLR5 and TLR7 as candidate genes for susceptibility to systemic lupus erythematosus.** *Clin Exp Rheumatol* 2009, **27**:267-271.
245. Oh DY, Baumann K, Hamouda O, Eckert JK, Neumann K, Kucherer C, Bartmeyer B, Poggensee G, Oh N, Pruss A, et al.: **A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression.** *AIDS* 2009, **23**:297-307.
246. Moller-Larsen S, Nyegaard M, Haagerup A, Vestbo J, Kruse TA, Borglum AD: **Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders.** *Thorax* 2008, **63**:1064-1069.
247. Schott E, Witt H, Neumann K, Bergk A, Halangk J, Weich V, Muller T, Puhl G, Wiedenmann B, Berg T: **Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon-a-based therapy.** *J Viral Hepat* 2008, **15**:71-78.
248. Schott E, Witt H, Neumann K, Taube S, Oh DY, Schreier E, Vierich S, Puhl G, Bergk A, Halangk J, et al.: **A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection.** *J Hepatol* 2007, **47**:203-211.
249. McKimmie CS, Johnson N, Fooks AR, Fazakerley JK: **Viruses selectively upregulate Toll-like receptors in the central nervous system.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **336**:925-933.
250. Thompson JM, Iwasaki A: **Toll-like receptors regulation of viral infection and disease.** *Adv Drug Deliv Rev* 2008, **60**:786-794.
251. Erickson AK, Gale M, Jr.: **Regulation of interferon production and innate antiviral immunity through translational control of IRF-7.** *Cell Res* 2008, **18**:433-435.
252. Akira S: **Pathogen recognition by innate immunity and its signaling.** *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009, **85**:143-156.

253. Wu W, Tang YW: **Emerging molecular assays for detection and characterization of respiratory viruses.** *Clin Lab Med* 2009, **29**:673-693.
254. Petzke MM, Brooks A, Krupna MA, Mordue D, Schwartz I: **Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells.** *J Immunol* 2009, **183**:5279-5292.
255. Eberle F, Sirin M, Binder M, Dalpke AH: **Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors.** *Eur J Immunol* 2009, **39**:2537-2547.
256. Beutler BA: **TLRs and innate immunity.** *Blood* 2009, **113**:1399-1407.
257. Page KR, Scott AL, Manabe YC: **The expanding realm of heterologous immunity: friend or foe?** *Cell Microbiol* 2006, **8**:185-196.
258. Walzl G, Tafuro S, Moss P, Openshaw PJ, Hussell T: **Influenza virus lung infection protects from respiratory syncytial virus-induced immunopathology.** *J Exp Med* 2000, **192**:1317-1326.
259. Heltzer ML, Coffin SE, Maurer K, Bagashev A, Zhang Z, Orange JS, Sullivan KE: **Immune dysregulation in severe influenza.** *J Leukoc Biol* 2009, **85**:1036-1043.
260. Didierlaurent A, Goulding J, Patel S, Snelgrove R, Low L, Bebien M, Lawrence T, van Rijt LS, Lambrecht BN, Sirard JC, et al.: **Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection.** *J Exp Med* 2008, **205**:323-329.
261. Han J, Ulevitch RJ: **Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity.** *Nat Immunol* 2005, **6**:1198-1205.
262. Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Mata C, Marin MJ, Calvo-Alen J, Blanco R, Aurrecoechea E, Ruiz-Soto M, Martinez-Taboada VM: **Circulating cytokines in active polymyalgia rheumatica.** *Ann Rheum Dis* 2010, **69**:263-269.
263. Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN: **TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity.** *Nat Med* 2007, **13**:543-551.

264. Salomao R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, Gomes NE, Rigato O: **TLR signaling pathway in patients with sepsis.** *Shock* 2008, **30 Suppl 1**:73-77.
265. Agarwal S, Busse PJ: **Innate and adaptive immunosenescence.** *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010, **104**:183-190; quiz 190-182, 210.
266. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B: **The aging of the immune system.** *Transpl Int* 2009, **22**:1041-1050.
267. Ginde AA, Mansbach JM, Camargo CA, Jr.: **Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey.** *Arch Intern Med* 2009, **169**:384-390.
268. Wang JP, Bowen GN, Padden C, Cerny A, Finberg RW, Newburger PE, Kurt-Jones EA: **Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus.** *Blood* 2008, **112**:2028-2034.
269. Cannell JJ, Zasloff M, Garland CF, Scragg R, Giovannucci E: **On the epidemiology of influenza.** *Virology* 2008, **5**:29.
270. Aloia JF, Li-Ng M: **Re: epidemic influenza and vitamin D.** *Epidemiol Infect* 2007, **135**:1095-1096; author reply 1097-1098.
271. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, et al.: **Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response.** *Science* 2006, **311**:1770-1773.
272. Bhan I, Camargo CA, Jr., Wenger J, Ricciardi C, Ye J, Borregaard N, Thadhani R: **Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and human cathelicidin in healthy adults.** *J Allergy Clin Immunol* 2011, **127**:1302-1304 e1301.

Anexo I:
Publicaciones derivadas
de este trabajo de Tesis

Lack of association between Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and giant cell arteritis

Lorena Alvarez-Rodriguez, Marcos Lopez-Hoyos, Ignacio Beares, Pedro Muñoz Cacho, Cristina Mata, Jaime Calvo-Alen, Alfonso Corrales, Gaurav Tripathi, Ricardo Blanco, Maite Garcia-Unzueta, Ignacio Villa, and Victor M. Martinez-Taboada

Rheumatology (2011) 50 (9): 1562-1568

[doi:10.1093/rheumatology/ker168](https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker168)

Expression and function of toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis.

Lorena Álvarez Rodríguez, Marcos López-Hoyos, Cristina Mata, Ana Fontalba, Jaime Calvo Alen, María José Marín, José Luis Fernández-Luna, Jesús Agüero Balbín, Maitane Aranzamendi Zaldunbide, Ricardo Blanco, Víctor M Martínez-Taboada

Ann Rheum Dis 2011 Sep 13; 70(9):1677-83.

[doi:10.1136/ard.2010.140194](https://doi.org/10.1136/ard.2010.140194)

Toll-like receptor 4 gene polymorphism and giant cell arteritis susceptibility: a cumulative meta-analysis.

Lorena Alvarez-Rodriguez, Pedro Muñoz Cacho, Marcos Lopez-Hoyos, Ignacio Beares, Cristina Mata, Jaime Calvo-Alen, Ignacio Villa, Victor Manuel Martinez-Taboada

Autoimmun Rev 2011 Oct 25; 10(12):790-2

<http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2011.06.002>

Toll-like receptor 4 gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica and elderly-onset rheumatoid arthritis.

Lorena Alvarez-Rodriguez, Marcos López-Hoyos, Ignacio Beares, Cristina Mata, Maite Garcia-Unzueta, Jaime Calvo-Alen, Ricardo Blanco, Elena Aurrecoechea, Gaurav Tripathi, Victor Manuel Martinez-Taboada

Clin Exp Rheumatol 2011 Sep-Oct; 29(5):795-800

Aging is associated with circulating cytokine dysregulation.

Lorena Alvarez-Rodríguez, Marcos López-Hoyos, Pedro Muñoz-Cacho, Víctor Manuel Martínez-Taboada

Cell Immunol 2012 12; 273(2):124-32

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.01.001>

Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function.

Lorena Alvarez-Rodriguez, Marcos Lopez-Hoyos, Maite Garcia-Unzueta, Jose Antonio Amado, Pedro Muñoz Cacho, Victor Manuel Martinez-Taboada

J Leukoc Biol 2012 May 17; 91(5):829-38.

[doi:10.1189/jlb.1011523](https://doi.org/10.1189/jlb.1011523)

Toll-like receptor 9 gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis.

L Alvarez-Rodríguez, M López-Hoyos, I Beares, J Calvo-Alén, T Ruiz, I Villa, Vm Martínez-Taboada

Scandinavian Journal of Rheumatology, 2012, Vol. 41, No. 6 : Pages 487-489

[doi: 10.3109/03009742.2012.704392](https://doi.org/10.3109/03009742.2012.704392)

Expression and function of toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis

Lorena Álvarez Rodríguez,¹ Marcos López-Hoyos,² Cristina Mata,³ Ana Fontalba,⁴ Jaime Calvo Alen,³ María José Marín,¹ José Luis Fernández-Luna,⁴ Jesús Aguero Balbín,⁵ Maitane Aranzamendi Zaldunbide,⁵ Ricardo Blanco,¹ Víctor M Martínez-Taboada¹

► Additional data (supplementary tables and figures) are published online only. To view these files please visit the journal online at (<http://ard.bmj.com>).

¹Servicio de Reumatología, Universidad de Cantabria, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain

²Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain

³Sección de Reumatología, Hospital de Sierrallana, Torrelavega, Cantabria, Spain

⁴Unidad de Genética Molecular, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain

⁵Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain

Correspondence to Víctor M Martínez-Taboada, Facultad de Medicina, Rheumatology Division, Universidad de Cantabria, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Avda De Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain; vmartinez@medynet.com

Accepted 24 April 2011
Published Online First
13 June 2011

ABSTRACT

Objective To investigate the expression and function of the Toll-like receptor (TLR) family in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with polymyalgia rheumatica (PMR) and giant cell arteritis (GCA).

Methods The authors analysed 70 patients with PMR, 20 with GCA, and 24 healthy controls (HC). TLR expression was assessed by flow cytometry. TLR function was assessed by stimulating PBMCs with specific ligands.

Results A significantly increased expression of TLR7 in PBMCs of patients with active disease compared with HC was found. Despite increased expression of TLR7, circulating monocytes from patients showed a significantly lower in vitro response to TLR7 agonists. No amino acid substitutions predicted to be functionally damaging were found in TLR7. A normal response to specific TLR7 agonists in patients in complete remission eliminated a genetic defect. TLR expression and function were also affected to some degree in other diseases characterised by a strong acute phase response.

Conclusion These data suggest activation of TLR7 during the active phase of PMR and GCA which resolves with complete disease remission. Whether this finding is the consequence of the marked inflammatory process in these disorders or activation by natural ligands remains to be explored.

INTRODUCTION

Giant cell arteritis (GCA) and polymyalgia rheumatica (PMR) are two closely related syndromes affecting older people. GCA is a granulomatous vasculitis affecting medium- and large-sized arteries.¹ Around 50% of patients with GCA have PMR, a clinical syndrome characterised by pain and stiffness in the neck, shoulder and pelvic girdles.²⁻³ The aetiopathogenesis of these two disorders remains unknown, although genetic, autoimmune and environmental factors have been implicated.⁴⁻⁹ Among the environmental factors, there are several lines of evidence suggesting that infectious agents may be involved.⁴⁻¹⁰⁻¹¹ However, various attempts have failed to demonstrate the presence of microorganism(s) at the site of vascular inflammation.¹²⁻¹³

Accumulating evidence has demonstrated that activation of innate immunity is a requisite for inducing acquired immunity,¹⁴ and information about innate immunity in PMR and GCA is scarce and

limited to inflamed tissue and genetic analysis.¹⁵⁻¹⁸ Toll-like receptors (TLRs) play an essential role in the activation and regulation of innate and acquired immune responses through recognition of specific pathogen-associated molecular patterns and endogenous peptides.¹⁹⁻²⁰ TLR activation has been implicated in the loss of self-tolerance leading to autoimmunity and chronic inflammation.²⁰⁻²¹

We have studied the expression and function of the nine human TLRs in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with PMR and GCA at different stages of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The present study included 70 patients with PMR, 20 patients with GCA, and 24 healthy age-matched controls (HC). Eighty-three patients (66 PMR and 17 GCA) were studied at disease onset and without previous corticosteroid (CS) therapy (table 1). Seven patients (three GCA and four PMR) in complete remission without CS therapy for at least 2 years were also studied. Of the 17 patients with active GCA, 12 had signs of arteritis in the temporal artery biopsy (TAB),²² and the remaining patients fulfilled the American College of Rheumatology (ACR) classification criteria.²³ Two of the five patients with a negative TAB result showed signs of arteritis on angio-MRI studies. Patients with PMR were diagnosed according to the criteria proposed by Chuang *et al.*²⁴ In PMR patients, GCA was excluded because of a negative TAB and/or complete resolution of symptoms with low-dose CS (10–15 mg/day prednisone) and the absence of characteristic GCA manifestations. As disease controls, we included patients with sepsis (n=4) and patients with elderly-onset rheumatoid arthritis (EORA) (n=17). Patients with rheumatoid arthritis (RA) had to satisfy the ACR 1987 revised criteria for RA.²⁵ RA was classed as EORA if the age at symptom onset was higher than 60 years. All the patients and controls gave signed informed consent, and the study was approved by the regional ethics committee.

TLR protein expression in PBMCs

Cell surface expression of TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 and TLR6, and intracellular expression of TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9 were assessed on

Extended report

Table 1 Main demographic and clinical characteristics in patients with active polymyalgia rheumatica (PMR), active giant cell arteritis (GCA) and healthy controls

	Controls	PMR	GCA
Number of patients	24	66	17
Age (years)	68.8±8.7	74.2±7.9	73.9±8.5
Gender (% female)	79.2	69.7	47.1
Time to diagnosis (months)	–	3.3±2.6	2.4±2.2
PMR symptoms (%)	–	100	23.5
Ischaemic symptoms (%)	–	0	47.1
TAB (positive/done)	–	0/15	12/17
Pretreatment ESR (mm/1 h)	–	56.6±30.6	78.3±29.0
Pretreatment CRP (mg/dl)	0.3±0.2	5.0±6.6	10.4±6.1

Unless otherwise indicated, values are mean±SD.

CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; GCA, giant cell arteritis; PMR, polymyalgia rheumatica; TAB, temporal artery biopsy.

T cells, B cells and monocytes by flow cytometry. Cells collected into sodium heparin tubes were incubated with fluorochrome-conjugated anti-human CD19, anti-human CD3 and anti-human CD14 (BD Biosciences, San Diego, California, USA) to identify B cells, T cells and monocyte populations, respectively, and with fluorochrome-conjugated anti-human TLR (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 and TLR6) or mouse IgG2a isotype control (eBioscience, San Diego, California, USA), for 20 min in the dark. After being washed, the cells were resuspended in 1% paraformaldehyde. To determine intracellular expression of TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9, after being lysed, blocked with 2% pooled human serum for 20 min at 4°C in the dark, and being washed supplemented with 0.5% BSA, cells were permeabilised (BD Biosciences) and intracellularly stained with primary antibodies or mouse IgG2a isotype control antibodies (Acris Antibodies, Herford, Germany and eBioscience, respectively) for 30 min followed by fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibodies for another 30 min. Expression of TLRs was gated and analysed by flow cytometry (Cell Quest Pro; BD Biosciences) as mean fluorescence intensity with regard to isotype control signal (see online supplementary figure S1).

Assessment of TLR function in circulating monocytes

Flow cytometry analysis

Whole blood cells collected in sodium heparin tubes were polyclonally stimulated for 18 h with different agonists (see online supplementary table S1) for human TLR1 to TLR9 (InvivoGen, San Diego, California, USA) in the presence or absence of brefeldin A (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) in polypropylene tubes. After culture, cells were stained with FITC-conjugated anti-human CD14 (BD Biosciences) to identify the monocyte population. Then red blood cells were lysed with FACS lysing solution (BD Biosciences) for 10 min. After being washed, the cells were permeabilised and intracellularly stained with phycoerythrin-labelled monoclonal antibodies against cytokines (interleukin (IL)-1β, tumour necrosis factor (TNF)α, IL-6; BD Biosciences) and analysed by flow cytometry using Cell Quest Pro Software.

Detection of soluble interferon (IFN)α in serum and cell culture supernatants by ELISA

Supernatants obtained after PBMC culture with specific TLR agonists were collected and stored at –80°C until analysis. Circulating concentrations and release of IFNα into the culture supernatants were determined using the Human IFNα1 ELISA Ready SET GO Kit (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. The assay sensitivity was 15 pg/ml.

Multiplex SNaPshot genotyping

By using two amino acid substitution prediction methods, PolyPhen and SNPs3D, we determined the substitutions predicted to be functionally damaging for TLR7 among the single-nucleotide polymorphisms (SNPs) found in the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) human SNP database. For SNP genotyping, we used the SNaPshot Multiplex system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as indicated by the manufacturer. The forward extension primers were as follows: for rs36076482, 5'-gaacctaaaggttctgca-3' (18 bp), for rs36110053, 5'-atgaacgacaatgacatctctt-3' (22 bp), and for rs34557368, 5'-attcaggagaaatcacttagatgttt-3' (26 bp). The primer extension reactions were analysed using a capillary electrophoresis gene analyser (Applied Biosystems).

Statistical analysis

All the statistical analysis of data was carried out using SPSS V12.0 software. Statistical comparisons of data between patients and controls were performed using the Mann–Whitney U test. Differences before and after treatment were analysed by Wilcoxon signed-rank test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Differential expression of TLRs in patients with PMR and GCA

We observed significant differences in the expression of the different TLRs in PBMC subpopulations (figure 1). TLR1 expression in T cells was slightly lower in PMR patients than in HC. The expression of TLR3 was significantly higher in patients with active GCA in both T and B cells than in HC and patients with active PMR, respectively. The most consistent finding in the three different circulating cell subsets was a significantly increased expression of TLR7 in both inflammatory syndromes (figure 1 and online supplementary figure S1). Finally, increased expression of TLR9 in B cells was found in GCA patients with active disease, and no significant differences were found for TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 and TLR8 (figure 1).

Patients with PMR and GCA have a decrease in TLR7 response during the acute phase of the disease

TLR function was evaluated by the production of intracellular proinflammatory cytokines in circulating monocytes by flow cytometry after in vitro stimulation with specific TLR agonists. Overall, TLR response to specific agonists was very similar between patients and age-matched HC. Patients with GCA had a significant decrease in IL-1β production after specific TLR6 stimulation (data not shown). As shown in figure 2 (upper panel), a decrease in proinflammatory cytokine response to the specific TLR7 agonist, imiquimod, was found in patients compared with HC, especially in GCA patients. In order to avoid a specific imiquimod effect, a different TLR7 agonist (gardiquimod) was also used in a subgroup of patients. Although the results did not reach statistically significant differences, probably because of the smaller sample size, a similar picture was obtained with gardiquimod (figure 2, lower panel).

Changes in expression and function of TLRs also occur in other diseases characterised by a strong acute phase response

To test if the results found in PMR and GCA were disease specific, we also studied two additional groups of patients characterised by a strong acute phase response. One of them was also age restricted (EORA) and the other control group was not age-restricted and included patients with sepsis admitted to an intensive

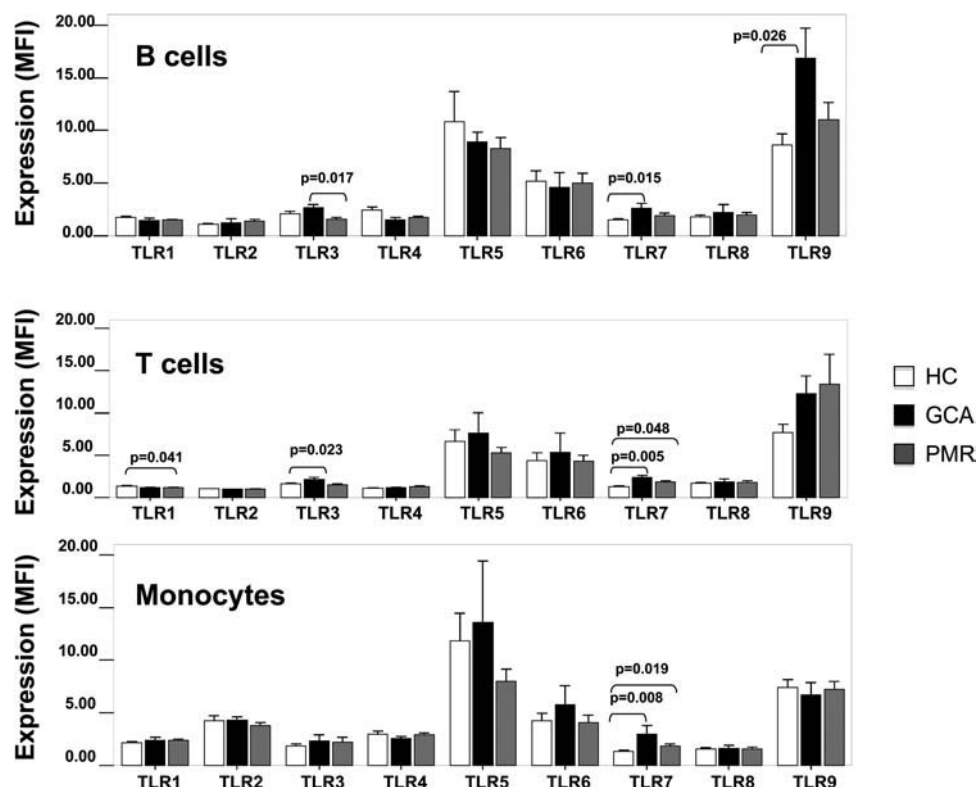


Figure 1 Expression of human Toll-like receptors (TLR1–9) in B cells (upper panel), T cells (middle panel) and monocytes (lower panel) of patients with polymyalgia rheumatica (PMR, grey bars), giant cell arteritis (GCA, black bars) and healthy controls (HC, white bars). Results are expressed as mean fluorescent intensity (MFI) units by flow cytometry and represent the mean $\pm$ SD. Statistically significant differences are indicated.

care unit. As shown in online supplementary figure S2A,B TLR expression and function were also affected in other diseases characterised by a strong acute phase response. Patients with EORA showed a similar pattern to patients with PMR or GCA in the expression of TLR4 and TLR7. However, TLR7 function in EORA was significantly different from that in GCA and closer to that in HC. Furthermore, EORA was characterised by a different function of TLR5 (LÁ Rodríguez, M López-Hoyos, JC Alen, VM Martínez-Taboada, unpublished data). TLR7 expression was also increased in patients with sepsis. However, a more striking finding was the impact of sepsis on the function of TLR7 and TLR4 (online supplementary figure S2A,B).

The decrease in TLR7 response is reversed after complete disease remission

The next step was to clarify if the decrease in TLR7 proinflammatory cytokine response was corrected after disease control with CS treatment. A subgroup of six GCA and 39 PMR patients was evaluated after a period of 6–10 weeks of remission with CS. Despite clinical and analytical inactive disease, short-term treatment with CS did not induce recovery of the TLR7 response to imiquimod and gardiquimod (figure 3A).

One possible explanation for the profound defect in TLR7 proinflammatory response, despite an appropriate protein expression, is that the protein expressed was not functional in terms of signal transduction. By using prediction methods, we identified three SNPs within the TLR7 coding sequence that introduced amino acid changes predicted to be functionally damaging for the TLR7 protein. Two of these changes affected a leucine-rich region, a functional domain critical for the recognition of pathogen components and induction of pathogen-specific responses. The third

SNP introduced a stop codon that renders a truncated protein lacking the C-terminus, including the transmembrane domain (online supplementary figure S3). We genotyped 53 HC and 87 patients and did not find the rare alleles in any case. Therefore these SNPs are highly infrequent in the studied population and are not associated with these inflammatory disorders.

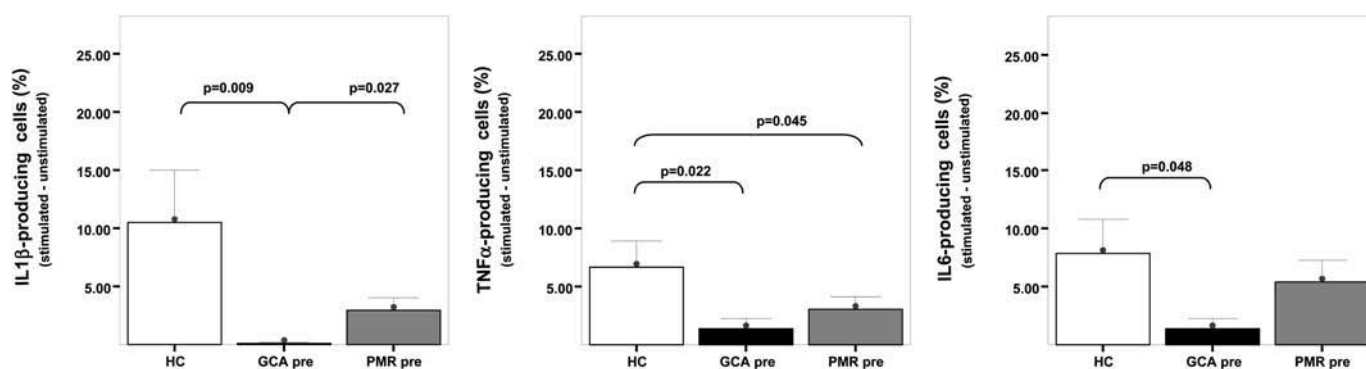
A different way to address the defective TLR7 response was to study patients in long-term complete remission without CS treatment to see if TLR7 function was still decreased. As shown in figure 3B, patients in remission had a similar response to HC and a greater response than patients with recent-onset disease. In summary, these results suggest that the defect in TLR7 proinflammatory response is not secondary to amino acid variations predicted to be damaging to the protein, and recovers after complete remission of the disease.

The decrease in TLR7 response mainly affects the production of proinflammatory cytokines

In the case of TLR7, Toll/IL-1 receptor (TIR) domain-containing adaptors, such as MyD88, regulate TLR-mediated signalling pathways. MyD88, which is common to all TLR-mediated pathways except TLR3, leads to the production of proinflammatory cytokines as well as IFN α . Therefore we addressed this issue by measuring the production of IFN α by PBMCs in culture supernatants after in vitro stimulation with specific TLR agonists. As shown in figure 4, in vitro stimulation with specific TLR7 agonists induced the production of IFN α by PBMCs to a higher extent than other extracellular TLRs (TLR4) or intracellular TLRs (TLR8) (data not shown). Although there was a tendency to release more IFN α after in vitro stimulation, especially in patients with GCA, the differences were not statistically significant.

Extended report

IMIQUIMOD



GARDIQUIMOD

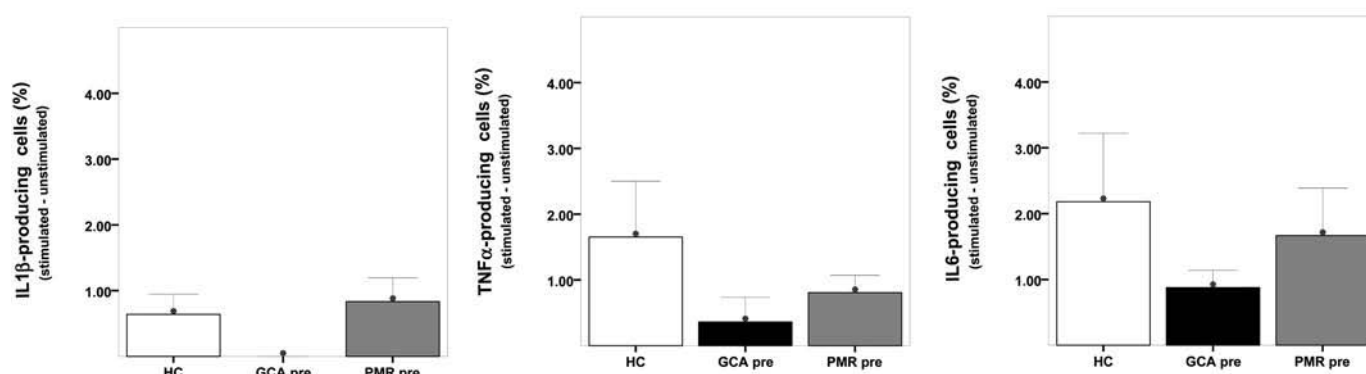


Figure 2 Toll-like receptor (TLR) function at disease onset in patients with polymyalgia rheumatica (PMR) and giant cell arteritis (GCA) and in healthy controls (HC). TLR function was assessed by measuring intracellular proinflammatory cytokine (interleukin (IL)-1 β and IL-6 and tumour necrosis factor (TNF) α) production of circulating monocytes after TLR stimulation with specific TLR agonists. Two different specific agonists for TLR7 were used: imiquimod (upper panel) and gardiquimod (lower panel). Results are expressed as the frequency of intracellular cytokine-staining cells by flow cytometry after stimulation as indicated in the Materials and Methods section and represent the mean $\pm$ SD. Statistically significant differences are indicated.

DISCUSSION

This study attempted to address the expression and function of the different TLR members in PBMCs of patients with PMR and GCA. We found significantly increased expression of TLR7 on B cells, T cells and monocytes of patients with active disease compared with HC. Expression of TLR members on temporal arteries was not addressed in the present study. Expression of TLR3 and TLR9 was also increased in GCA but only on T and B cells, respectively. We did not perform expression studies on specific T cell subsets that have been demonstrated in GCA vessels and that could express certain TLRs.²⁶ In spite of clinical remission, short-term treatment with CS did not induce a significant decrease in TLR expression on PBMCs. Despite increased expression of TLR7, circulating monocytes from patients with active disease showed a significantly lower in vitro response for the production of proinflammatory cytokines but not for IFN α to TLR7 agonists. Four different hypotheses may explain these findings: an alteration in the transduction signal of TLR7, a genetic defect in the receptor, receptor saturation with natural ligands, or that the results found in PMR and GCA are not disease specific but are the consequence of the acute phase reaction that occurs in these syndromes.

TLR signalling pathways originate from the TIR domains.¹⁹ In the case of TLR7, TIR domain-containing adaptors such as MyD88 regulate TLR-mediated signalling pathways. MyD88

is common to all TLR-mediated pathways except for TLR3. Therefore the hypothesis of an alteration in the transduction signal was discarded because no decreased response was found for any of the other TLRs analysed.

Although a significant number of SNPs have been described for the TLR7 gene, only a few have been studied in humans.^{27–31} Therefore the study of only three SNPs does not eliminate a possible genetic influence on the TLR7 response. Regarding other SNPs for TLR genes, a possible association of TLR4 (+896 A/G) gene polymorphism with susceptibility to GCA has been described,^{17 18 32} whereas no association has been found for PMR (unpublished). In addition, a possible genetic defect was also ruled out, since we found a normal response to specific TLR7 agonists in patients in complete remission and without CS treatment.

The third possible hypothesis is that, at the beginning of the disease, TLR7 was saturated by specific ligands. It has been demonstrated that viral infections upregulate the expression of TLRs.^{33 34} TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9 typically reside in the endosomes where they can gain access to viral nucleic acids.³⁵ TLR7 recognises ssRNA in the cytoplasm of infected cells during viral replication.³⁶ Presumably, TLR7 senses a specific invariant feature present in the genomic RNA or viral replication intermediates of these viruses. However, little evidence exists regarding the particular viral ligand that serves as the authentic

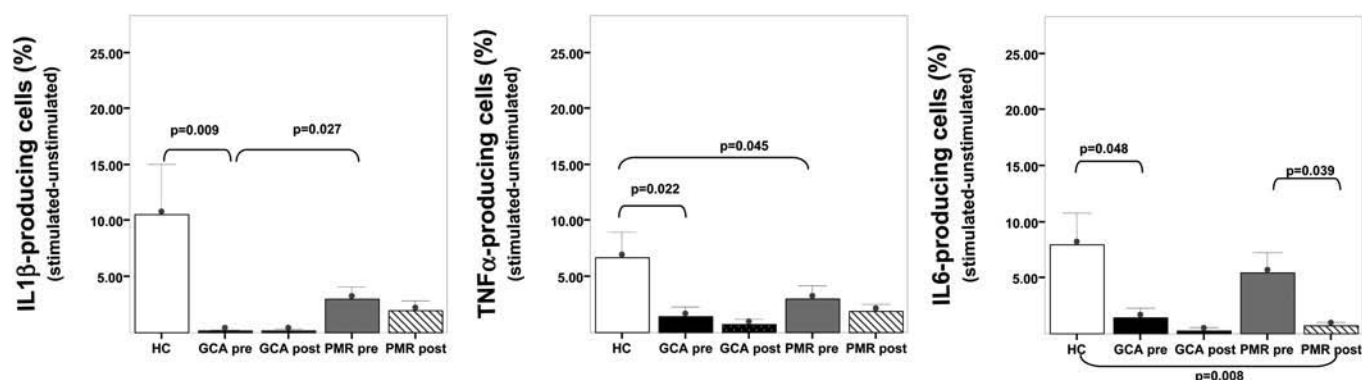
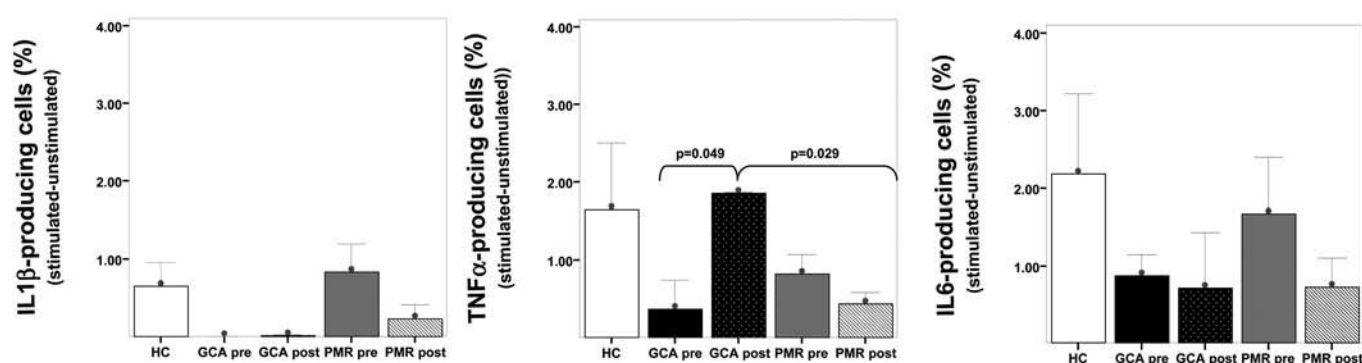
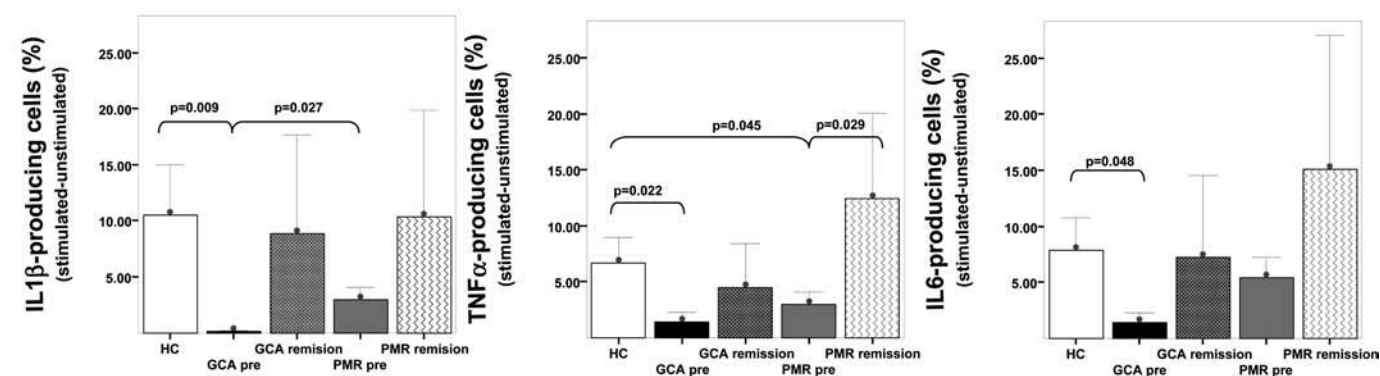
A IMIQUIMOD**GARDIQUIMOD****B IMIQUIMOD**

Figure 3 Toll-like receptor (TLR)7 function recovers after complete disease remission. (A) Intracellular proinflammatory cytokine (interleukin (IL)-1 β and IL-6 and tumour necrosis factor (TNF) α) production of circulating monocytes from polymyalgia rheumatica (PMR) and giant cell arteritis (GCA), after TLR7 stimulation with specific agonists, imiquimod (upper panel) and gardiquimod (lower panel), at disease onset (pre) and after disease remission (post). (B) Intracellular proinflammatory cytokine production of circulating monocytes after TLR7 stimulation with specific agonist, imiquimod, in patients with PMR and GCA in complete clinical remission without corticosteroids. Reference data from healthy controls (HC) are displayed as white bars. Results are expressed as the frequency of intracellular cytokine-staining cells by flow cytometry after stimulation as indicated in the Materials and Methods section and represent the mean $\pm$ SD. Statistically significant differences are indicated.

pathogen-associated molecular pattern that binds to TLR7, or about the regulation of TLRs by viruses.^{35–37} It is also possible that microorganisms different from viruses or an endogenous TLR7 stimulus of non-infectious origin may induce a type I IFN response through the TLR7 pathway.^{38–41} The possible role of viruses or endogenous TLR7 ligands is under investigation.

Ligation of TLRs is associated with inflammatory signalling cascades, culminating in cytokine and chemokine production,

which ultimately leads to pathogen clearance.⁴² Epidemiological and animal model data have demonstrated that one respiratory tract infection alters immunity and pathology to a second unrelated pathogen, even long after removal of the first pathogen and in the absence of cross-reactive immunity.^{43–45} Recent work has provided evidence that TLR responsiveness is reset after the first wave of inflammation and shows long-term desensitisation of lung alveolar macrophages to TLR ligands.⁴⁶ The molecular

Extended report

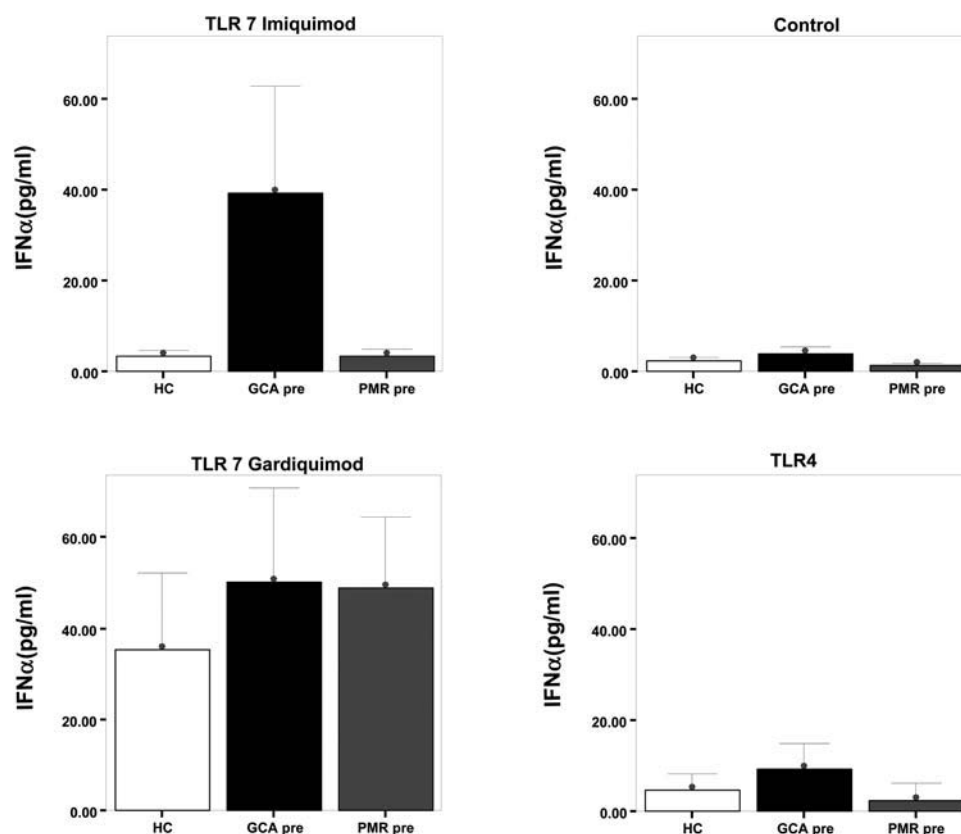


Figure 4 Culture supernatant interferon (IFN) α production of peripheral blood mononuclear cells after Toll-like receptor (TLR) stimulation with specific TLR agonists at disease onset without corticosteroid therapy. IFN α production was measured by ELISA after in vitro stimulation with specific TLR agonists. As control, cultures without stimuli are also shown. As expected, TLR7 stimulation with specific agonists induced higher IFN α production. No significant differences were found between patients and healthy controls (HC). Bars represent the mean $\pm$ SD. GCA, giant cell arteritis; PMR, polymyalgia rheumatica.

mechanisms responsible for TLR desensitisation remain to be identified, and they may include upregulation of intracellular antagonists, downregulation of adaptor molecules, and/or sustained influence from other signal pathways.⁴⁷ Alternatively, it is possible that negative feedback loops inhibiting TLR signalling (ie, increase in IRAK-M) or specifically inhibiting expression of NF κ B-dependent cytokines (ie, increase in I κ B) are activated in PBMCs from patients during active disease by circulating inflammatory products. Indeed, patients with active GCA and PMR show increased serum concentrations of inflammatory cytokines,^{48 49} but, in contrast, serum concentrations of IFN α are not increased in active disease (see online supplementary figure S4).

Our results raised the possibility that the findings on TLR expression and function in PMR and GCA are not disease specific and are the consequence of the acute phase reaction that occurs in these syndromes. Although patients with EORA and sepsis showed to some extent similarities in expression and function to patients with PMR and GCA, these two disease controls also displayed some distinct features. It has been suggested that sensors of innate immunity including TLRs are regulated differentially in the different cell subtypes and during the different stages of the inflammatory process.⁵⁰ It could be also possible, as suggested in other autoimmune disease, that the findings of the innate immune function in these age-restricted inflammatory diseases may be the consequence of autoamplification feedback loops and are not specific for any disease or aetiological agent.⁵¹

In summary, these data suggest activation of TLR7 during the active phase of PMR and GCA, which resolves with complete remission of disease. Whether this finding is the consequence of the marked inflammatory process in these disorders or the activation by natural ligands remains to be explored.

Acknowledgements This work was supported by grants from Fundación Marqués de Valdecilla, Fondo de Investigación Sanitaria (PI050475 and PI080098) and Fundación Mutua Madrileña. LA was supported by a grant for Research Aid from Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV. We are especially grateful to Iñaki Beares and Marta Gonzalez (supported by grants from Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV), and Carolina Santa Cruz (supported by a grant for Research Aid from Schering-Plough, Spain) for their helpful technical assistance. We thank the consultants of the Rheumatology Divisions who monitored the patients and all the patients and controls included in the present study.

Ethics approval This study was conducted with the approval of the Regional (Cantabria) Ethics Committee.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Huston KA, Hunder GG, Lie JT, *et al*. Temporal arteritis: a 25-year epidemiologic, clinical, and pathologic study. *Ann Intern Med* 1978;**88**:162–7.
- Meliconi R, Pulsatelli L, Uguccioni M, *et al*. Leukocyte infiltration in synovial tissue from the shoulder of patients with polymyalgia rheumatica. Quantitative analysis and influence of corticosteroid treatment. *Arthritis Rheum* 1996;**39**:1199–207.
- Salvarani C, Cantini F, Olivieri I, *et al*. Proximal bursitis in active polymyalgia rheumatica. *Ann Intern Med* 1997;**127**:27–31.
- Martinez-Taboada VM, Goronzy JJ, Weyand CM. Conceptos actuales sobre la patogenia de la arteritis de células gigantes. *Rev Esp Reumatol* 1994;**21**:293–9.
- Martinez-Taboada VM, Bartolome MJ, Lopez-Hoyos M, *et al*. HLA-DRB1 allele distribution in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: influence on clinical subgroups and prognosis. *Semin Arthritis Rheum* 2004;**34**:454–64.

6. **Pacheco MJ**, Amado JA, Lopez-Hoyos M, *et al*. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis function in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Semin Arthritis Rheum* 2003;**32**:266–72.
7. **Martínez-Taboada VM**, Bartolome MJ, Fernandez-Gonzalez MD, *et al*. Homocysteine levels in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: influence of corticosteroid therapy. *Rheumatology (Oxford)* 2003;**42**:1055–61.
8. **Lopez-Hoyos M**, Bartolome-Pacheco MJ, Blanco R, *et al*. Selective T cell receptor decrease in peripheral blood T lymphocytes of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2004;**63**:54–60.
9. **Martínez-Taboada V**, Hunder NN, Hunder GG, *et al*. Recognition of tissue residing antigen by T cells in vasculitic lesions of giant cell arteritis. *J Mol Med* 1996;**74**:695–703.
10. **Salvarani C**, Gabriel SE, O'Fallon WM, *et al*. The incidence of giant cell arteritis in Olmsted County, Minnesota: apparent fluctuations in a cyclic pattern. *Ann Intern Med* 1995;**123**:192–4.
11. **Elling P**, Olsson AT, Elling H. Synchronous variations of the incidence of temporal arteritis and polymyalgia rheumatica in different regions of Denmark; association with epidemics of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Rheumatol* 1996;**23**:112–19.
12. **Regan MJ**, Wood BJ, Hsieh YH, *et al*. Temporal arteritis and Chlamydia pneumoniae: failure to detect the organism by polymerase chain reaction in ninety cases and ninety controls. *Arthritis Rheum* 2002;**46**:1056–60.
13. **Helweg-Larsen J**, Tarp B, Obel N, *et al*. No evidence of parvovirus B19, Chlamydia pneumoniae or human herpes virus infection in temporal artery biopsies in patients with giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* 2002;**41**:445–9.
14. **Akira S**. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci* 2009;**85**:143–56.
15. **Deng J**, Ma-Krupa W, Gewirtz AT, *et al*. Toll-like receptors 4 and 5 induce distinct types of vasculitis. *Circ Res* 2009;**104**:488–95.
16. **Wagner AD**, Wittkop U, Prahst A, *et al*. Dendritic cells co-localize with activated CD4+ T cells in giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;**21**:185–92.
17. **Palomino-Morales R**, Torres O, Vazquez-Rodriguez TR, *et al*. Association between toll-like receptor 4 gene polymorphism and biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2009;**36**:1501–6.
18. **Boiardi L**, Casali B, Farnetti E, *et al*. Toll-like receptor 4 (TLR4) gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2009;**27**(1 Suppl 52):S40–4.
19. **Akira S**, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001;**2**:675–80.
20. **Wagner H**. Endogenous TLR ligands and autoimmunity. *Adv Immunol* 2006;**91**:159–73.
21. **Marshak-Rothstein A**. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2006;**6**:823–35.
22. **Martínez-Taboada V**, Brack A, Hunder GG, *et al*. The inflammatory infiltrate in giant cell arteritis selects against B lymphocytes. *J Rheumatol* 1996;**23**:1011–14.
23. **Hunder GG**, Bloch DA, Michel BA, *et al*. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;**33**:1122–8.
24. **Chuang TY**, Hunder GG, Ilstrup DM, *et al*. Polymyalgia rheumatica: a 10-year epidemiologic and clinical study. *Ann Intern Med* 1982;**97**:672–80.
25. **Arnett FC**, Edworthy SM, Bloch DA, *et al*. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;**31**:315–24.
26. **Cole JE**, Georgiou E, Monaco C. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010;**2010**:393946.
27. **Sánchez E**, Callejas-Rubio JL, Sabio JM, *et al*. Investigation of TLR5 and TLR7 as candidate genes for susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2009;**27**:267–71.
28. **Oh DY**, Baumann K, Hamouda O, *et al*. A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression. *AIDS* 2009;**23**:297–307.
29. **Møller-Larsen S**, Nyegaard M, Haagerup A, *et al*. Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders. *Thorax* 2008;**63**:1064–9.
30. **Schott E**, Witt H, Neumann K, *et al*. Association of TLR7 single nucleotide polymorphisms with chronic HCV-infection and response to interferon- α -based therapy. *J Viral Hepat* 2008;**15**:71–8.
31. **Schott E**, Witt H, Neumann K, *et al*. A Toll-like receptor 7 single nucleotide polymorphism protects from advanced inflammation and fibrosis in male patients with chronic HCV-infection. *J Hepatol* 2007;**47**:203–11.
32. **Alvarez-Rodriguez L**, Lopez-Hoyos M, Beares I, *et al*. Lack of association between Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and giant cell arteritis. *Rheumatology* 2011;(In Press). DOI: 10.1093/rheumatology/ker168 and PMID: 21586524.
33. **An H**, Xu H, Yu Y, *et al*. Up-regulation of TLR9 gene expression by LPS in mouse macrophages via activation of NF- κ B, ERK and p38 MAPK signal pathways. *Immunol Lett* 2002;**81**:165–9.
34. **McKimmie CS**, Johnson N, Fooks AR, *et al*. Viruses selectively upregulate Toll-like receptors in the central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;**336**:925–33.
35. **Thompson JM**, Iwasaki A. Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;**60**:786–94.
36. **Andersen JM**, Al-Khairy D, Ingalls RR. Innate immunity at the mucosal surface: role of toll-like receptor 3 and toll-like receptor 9 in cervical epithelial cell responses to microbial pathogens. *Biol Reprod* 2006;**74**:824–31.
37. **Xu N**, Yao HP, Sun Z, *et al*. Toll-like receptor 7 and 9 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis B and related hepatocellular carcinoma. *Acta Pharmacol Sin* 2008;**29**:239–44.
38. **Petzke MM**, Brooks A, Krupna MA, *et al*. Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. *J Immunol* 2009;**183**:5279–92.
39. **Eberle F**, Sirin M, Binder M, *et al*. Bacterial RNA is recognized by different sets of immunoreceptors. *Eur J Immunol* 2009;**39**:2537–47.
40. **Beutler BA**. TLRs and innate immunity. *Blood* 2009;**113**:1399–407.
41. **Baccala R**, Gonzalez-Quintanilla R, Lawson BR, *et al*. Sensors of the innate immune system: their mode of action. *Nat Rev Rheumatol* 2009;**5**:448–56.
42. **Akira S**, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;**124**:783–801.
43. **Page KR**, Scott AL, Manabe YC. The expanding realm of heterologous immunity: friend or foe? *Cell Microbiol* 2006;**8**:185–96.
44. **Walzl G**, Tafuro S, Moss P, *et al*. Influenza virus lung infection protects from respiratory syncytial virus-induced immunopathology. *J Exp Med* 2000;**192**:1317–26.
45. **Heltzer ML**, Coffin SE, Maurer K, *et al*. Immune dysregulation in severe influenza. *J Leukoc Biol* 2009;**85**:1036–43.
46. **Didierlaurent A**, Goulding J, Patel S, *et al*. Sustained desensitization to bacterial Toll-like receptor ligands after resolution of respiratory influenza infection. *J Exp Med* 2008;**205**:323–9.
47. **Han J**, Ulevitch RJ. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. *Nat Immunol* 2005;**6**:1198–205.
48. **Martínez-Taboada VM**, Alvarez L, RuizSoto M, *et al*. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: role of cytokines in the pathogenesis and implications for treatment. *Cytokine* 2008;**44**:207–20.
49. **Alvarez-Rodríguez L**, Lopez-Hoyos M, Mata C, *et al*. Circulating cytokines in active polymyalgia rheumatica. *Ann Rheum Dis* 2010;**69**:263–9.
50. **Salomão R**, Martins PS, Brunialti MK, *et al*. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock* 2008;**30**(Suppl 1):73–7.
51. **Baccala R**, Hoebe K, Kono DH, *et al*. TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med* 2007;**13**:543–51.



Expression and function of toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis

Lorena Álvarez Rodríguez, Marcos López-Hoyos, Cristina Mata, et al.

Ann Rheum Dis 2011 70: 1677-1683 originally published online June 13, 2011

doi: 10.1136/ard.2010.140194

Updated information and services can be found at:

<http://ard.bmj.com/content/70/9/1677.full.html>

These include:

Data Supplement

"Web Only Data"

<http://ard.bmj.com/content/suppl/2011/05/09/ard.2010.140194.DC1.html>

References

This article cites 51 articles, 17 of which can be accessed free at:

<http://ard.bmj.com/content/70/9/1677.full.html#ref-list-1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

Immunology (including allergy) (45760 articles)
Inflammation (13887 articles)
Connective tissue disease (7709 articles)
Musculoskeletal syndromes (17608 articles)
Vasculitis (1939 articles)

Notes

To request permissions go to:

<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:

<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:

<http://group.bmj.com/subscribe/>



Contents lists available at ScienceDirect

Autoimmunity Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/autrev

Review

Toll-like receptor 4 gene polymorphism and giant cell arteritis susceptibility: A cumulative meta-analysis

Lorena Alvarez-Rodriguez ^a, Pedro Muñoz Cacho ^d, Marcos Lopez-Hoyos ^b, Ignacio Beares ^b, Cristina Mata ^c, Jaime Calvo-Alen ^c, Ignacio Villa ^c, Victor Manuel Martinez-Taboada ^{a,*}^a Division of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Spain^b Division of Immunology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain^c Section of Rheumatology, Hospital de Sierrallana-IFIMAV, Torrelavega, Cantabria, Spain^d Gerencia Atención Primaria, Servicio Cántabro de Salud, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2011

Accepted 10 June 2011

Available online 25 June 2011

Keywords:

Toll like receptor 4

Gene polymorphism

Giant cell arteritis

Meta-analysis

ABSTRACT

Objective: Toll-like receptor (TLR) 4 (+896 A/G) gene polymorphism has been reported to be associated with susceptibility to giant cell arteritis (GCA) with inconsistent results. To provide a more definitive conclusion, a cumulative meta-analysis of the association of TLR4 (+896 A/G) polymorphism with GCA susceptibility combining previous studies was performed.

Methods: The cumulative meta-analysis included 3 case–control studies which provided a total of 437 patients and 1023 controls. Meta-analysis was conducted by fitting random effects models and checked for heterogeneity and publication bias. Combined odds ratio (OR) and associated 95% confidence intervals (CI) were obtained by using a DerSimonian and Laird random effects model.

Results: Three studies, all from a South European ancestry, were identified through a literature search and included in this meta-analysis. The cumulative meta-analysis showed that the pooled random effects OR was non significant (OR: 1.46, 95% CI: 0.95–2.25; $p=0.082$). There is some evidence suggestive of moderate–high heterogeneity between the three studies, I^2 34.2% (95% CI: 0–55.2).

Conclusion: This cumulative meta-analysis does not demonstrate an association of TLR4 (+896 A/G) gene polymorphism with susceptibility to GCA. Further studies using larger samples and in populations from different geographic origins are needed to determine the exact role of TLR4 gene polymorphisms in GCA.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	790
2. Material and methods	791
2.1. Study selection	791
2.2. Statistical analysis	791
3. Results	791
4. Discussion	791
Take-home messages	792
Acknowledgments	792
References	792

1. Introduction

Giant cell arteritis (GCA) is a granulomatous vasculitis affecting medium- and large-sized arteries that occur exclusively in elderly people [1]. The etiopathogenesis of GCA remains unknown although genetic, autoimmune, and environmental factors have been implicated [2–8]. Susceptibility to inflammatory diseases may be the result of the

* Corresponding author at: Rheumatology Division, Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla", Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Avda. Valdecilla s/n. 39008, Santander, Spain. Tel.: +34 942 202510; fax: +34 942 324641.

E-mail address: vmartinez@medynet.com (V.M. Martinez-Taboada).

interaction of multiple genetic factors that regulate the threshold of autoreactivity, and this could be the case in GCA [9,10].

Accumulating evidence supports the role of innate immunity, and specially TLR4, in patients with GCA [11]. In fact, a population-based genetic study has suggested the association of TLR4 (+896 A/G) gene polymorphism with susceptibility to develop GCA [12]. However these results have not been confirmed in other two studies [11,13], and the contribution of the polymorphism to the development of this complex syndrome remains to be established. As one of the major limitations of genetic studies on diseases with a low prevalence is the inclusion of patient populations with a low sample size, we carried out a meta-analysis of the three GCA populations reported at this time, all of them from a similar geographic area [11–13].

2. Material and methods

2.1. Study selection

Computerized bibliographic search of PUBMED and EMBASE was supplemented with manual searches of reference list and abstracts proceedings of the most relevant international meetings (up to May 2011). We searched using keywords: toll like receptor 4, gene polymorphism, SNP (single nucleotide polymorphism), polymorphism, and giant cell arteritis. Searches were limited to published English language articles. This search produced 3 case-control studies and the meta-analysis included a total of 437 patients and 1023 controls.

2.2. Statistical analysis

Meta-analyses were conducted by fitting random effects models (Supplementary Fig. 1) and were checked for small size and publication bias by visually examining for possible asymmetry in funnel plots [14] and Egger's test [15]. Cochran's Q statistic to test for heterogeneity and the I^2 statistic to quantify the proportion of the total variation owing the heterogeneity were calculated [16]. We also conducted a cumulative meta-analysis (Fig. 1) whereby studies were pooled chronologically and presented in order of publication [17]. Combined odds ratio (OR) and associated 95% confidence intervals (CI) were obtained by using a DerSimonian and Laird random effects model [18]. Statistics were performed using Comprehensive Meta-analysis, version 2.0 (Biostat, Englewood, NJ, USA) [19].

3. Results

As results from previous studies [11–13] have been rather inconsistent, we conducted a meta-analysis of the TLR4 (+896 A/G) gene polymorphism with susceptibility to GCA. This meta-analysis included 3 case-control studies which provided a total of 437 patients and 1023 controls. The cumulative meta-analysis showed no modification in effect estimate with the two initial studies, but decreased the point estimate by

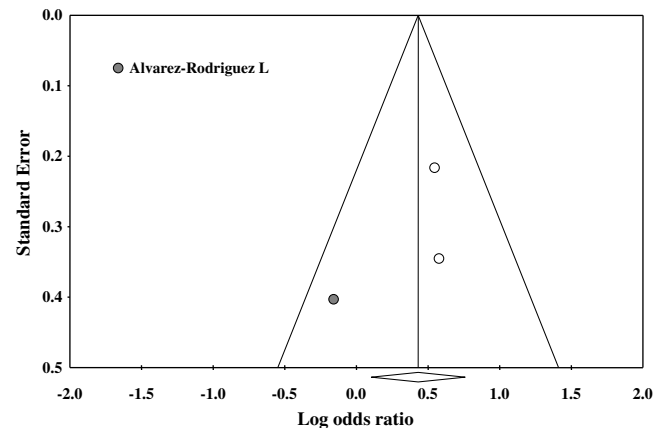


Fig. 2. Funnel plot of standard error by log odds ratio.

adding the most recent one (Fig. 1). Pooled random effects OR was non significant (OR 1.46, 95% CI: 0.95–2.25; $p = 0.082$). Visual inspection of the funnel plots (Fig. 2) is compatible with asymmetry, mainly with a possible gap in the top left-hand side of the graph. However Egger's weighted regression analysis suggested a low likelihood ($p = 0.509$). There is some evidence suggestive of moderate–high heterogeneity between the tree studies, I^2 34.2% (95% CI: 0–55.2%).

4. Discussion

There is an overwhelming abundance of genetic association studies available in the literature, which can often be collectively difficult to interpret [20]. One of the major limitations of genetic studies on diseases with a low prevalence is the inclusion of patient populations with a low sample size. In this regard, meta-analysis provides a tool to investigate contradictory results in genetic association studies by estimating population-wide effects of genetic risk factors in diseases and explaining sources of bias and heterogeneity [21]. Furthermore, cumulative meta-analysis allows the evaluation of a study's contribution to the combined effect of the preceding research. It accrues evidence, gradually adding studies one at a time and provides updated estimates along with confidence intervals whenever new evidence emerges.

Two co-segregating SNPs (+896 A/G and +1196 C/T) within the gene encoding TLR4 have been characterized and studied in several inflammatory conditions including GCA [11–13]. There are three different studies that examine TLR4 polymorphisms in GCA, two from different regions in Spain and a third one from Italy, another Mediterranean country. In the two initial studies [12,13], an increased frequency of the G allele in the TLR4 (+896 A/G) gene polymorphism was found although it was significant only in the Palomino-Morales work [12]. The most recent study did not show the same tendency [11],

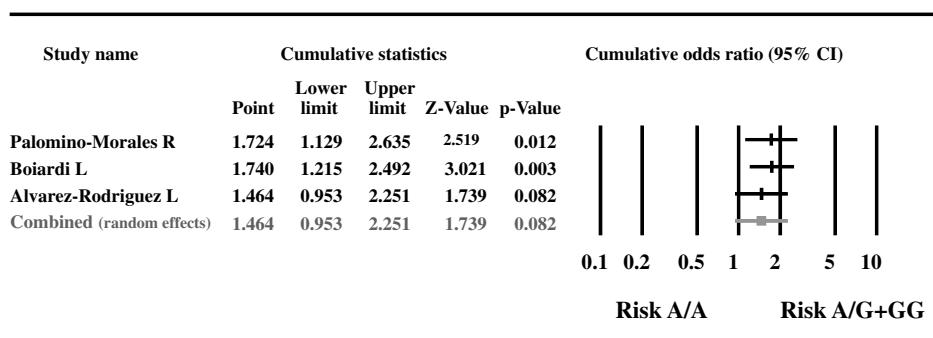


Fig. 1. Results of the cumulative meta-analysis of TLR4 (Asp299Gly) gene polymorphism in GCA. The meta-analysis included 3 case-control studies which provided a total of 437 patients and 1023 controls. The random effects combined odds ratio with the corresponding 95% confidence interval.

making previous results rather inconsistent. As stated earlier, one of the major limitations of genetic studies on diseases with a low prevalence like GCA is the inclusion of patient populations with a low sample size. Therefore, we underwent a meta-analysis of the three GCA populations reported at this time, all of them from a similar geographic area. The results of this meta-analysis do not support the association of the TLR4 +896 A/G mutation with susceptibility to develop GCA.

There are several reasons suggesting that these results should be interpreted with caution. Although visual inspection of the funnel plots was compatible with asymmetry, Egger's weighted regression analysis suggested a low likelihood ($p = 0.509$). However, it is unlikely that funnel plots will be useful in meta-analysis containing fewer than five studies [22]. Egger et al. [15] listed different possible reasons for funnel plot asymmetry (Supplementary Table1). There is some evidence suggestive of moderate-high heterogeneity between the three studies, I^2 of 34.2% with a wide 95% CI ranging from 0 to 55.2%. In the present study, it is possible that a true heterogeneity due to differences in underlying risk exists. In fact, the differences between the studies included in this meta-analysis are mainly due to the prevalence of the A/A genotype in the control group, and not because of the presence of mutation in the patient population. This may reflect differences in the selection of the control population and therefore, in the underlying risk calculation. Indeed, different genetic susceptibility risk has been described for a number of rheumatic diseases according to the geographic origin. Another source of heterogeneity may be also the inclusion of patient populations with different characteristics. In this regard, the two initial studies included only patients with biopsy-proven GCA [12,13], and the third study also included patients with clinically diagnosed disease, and therefore, a wider spectrum of this large-vessel vasculitis [11]. Finally, it has been shown that significant between-study heterogeneity (diversity) is frequent, and that the results of the first study correlate only modestly with subsequent research on the same association [23]. The first study often suggests a stronger genetic effect than is found by subsequent studies, the so called "winners curse" phenomenon [24,25]. Both bias and genuine population diversity might explain why early association studies tend to overestimate the disease protection or predisposition conferred by a genetic polymorphism [23]. Therefore, a systematic meta-analytic approach may assist in estimating population-wide effects of genetic risk factors in human disease.

In conclusion, this cumulative meta-analysis does not demonstrate an association of TLR4 (+896 A/G) gene polymorphism with susceptibility to GCA. Further studies using larger samples and in populations from different geographic origin are needed to determine the exact role of TLR4 gene polymorphisms in GCA.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.autrev.2011.06.002.

Take-home messages

- Although the results might be limited by the low number of studies, this meta-analysis does not demonstrate an association of TLR4 (+896 A/G) gene polymorphism with susceptibility to GCA.
- New studies are needed to determine the exact role of TLR4 gene polymorphisms in GCA.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundación Marqués de Valdecilla, Fondo de Investigación Sanitaria (PI050475 and PI080098),

and Fundación Mutua Madrileña. LA-R and IB were supported by a grant for Research Aid from Fundación Marqués de Valdecilla–IFIMAV.

References

- [1] Huston KA, Hunder GG, Lie JT, Kennedy KH, Elveback LR. Temporal arteritis. A 25 year epidemiological, clinical and pathologic study. *Ann Intern Med* 1978;88:162–7.
- [2] Martínez-Taboada VM, Goronzy JJ, Weyand CM. Conceptos actuales sobre la patogenia de la arteritis de células gigantes. *Rev Esp Reumatol* 1994;21:293–9.
- [3] Martínez-Taboada VM, Bartolome MJ, Lopez-Hoyos M, Blanco R, Mata C, Calvo J, et al. HLA-DRB1 allele distribution in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: influence on clinical subgroups and prognosis. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34:454–64.
- [4] Pacheco MJ, Amado JA, Lopez-Hoyos M, Blanco R, Garcia-Unzueta MT, Rodriguez-Valverde V, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis function in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Semin Arthritis Rheum* 2003;32:266–72.
- [5] Martínez-Taboada VM, Bartolome MJ, Fernandez-Gonzalez MD, Blanco R, Rodriguez-Valverde V, Lopez-Hoyos M. Homocysteine levels in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: influence of corticosteroid therapy. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:1055–61.
- [6] Lopez-Hoyos M, Bartolome-Pacheco MJ, Blanco R, Rodriguez-Valverde V, Martínez-Taboada VM. Selective T cell receptor decrease in peripheral blood T lymphocytes of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:54–60.
- [7] Martínez-Taboada V, Hunder NNH, Hunder GG, Weyand CM, Goronzy JJ. Recognition of tissue residing antigen by T cells in vasculitic lesions of giant cell arteritis. *J Mol Med* 1996;74:695–703.
- [8] Brack A, Geisler A, Martínez-Taboada V, Younger BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Giant cell vasculitis is a T cell-dependent disease. *Mol Med* 1997;8:530–43.
- [9] González-Gay MA, Amoli MM, García-Porrúa C, Ollier WE. Genetic markers of disease susceptibility and severity in giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Semin Arthritis Rheum* 2003;33:38–48.
- [10] Martínez-Taboada VM, Alvarez Rodriguez L, Ruiz Soto M, Marín MJ, Lopez-Hoyos M. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: role of cytokines in the pathogenesis and implications for treatment. *Cytokine* 2008;44:207–20.
- [11] Alvarez-Rodriguez L, Lopez-Hoyos M, Beares I, Muñoz-Cacho P, Mata C, Calvo-Alen J, et al. Lack of association between toll-like receptor 4 gene polymorphisms and giant cell arteritis. *Rheumatology (Oxford)* May 17 2011 [Epub ahead of print].
- [12] Palomino-Morales R, Torres O, Vazquez-Rodriguez TR, Morado IC, Castañeda S, Callejas-Rubio JL, et al. Association between toll-like receptor 4 gene polymorphism and biopsy-proven giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2009;36:1501–6.
- [13] Boiardi L, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni P, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2009;27(Suppl 52):S40–4.
- [14] Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR. Publication bias. In: Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR, editors. *Introduction to meta-analysis*. Chichester: Wiley & Sons; 2009. p. 277–92.
- [15] Egger M, Davey Smith G, Schneider M. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ* 1997;315:629–34.
- [16] Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analysis. *BMJ* 2003;327:557–60.
- [17] Lau J, Schmid CH, Chalmers TC. Cumulative meta-analysis of clinical trials builds evidence for exemplary medical care. *J Clin Epidemiol* 1995;48:45–57.
- [18] DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin Trials* 1986;7:177–88.
- [19] Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR. *Introduction to meta-analysis*. John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK; 2009.
- [20] Bagos PG, Nikolopoulos GK. Generalized least squares for assessing trends in cumulative meta-analysis with applications in genetic epidemiology. *J Clin Epidemiol* 2009 Oct;62(10):1037–44 [Epub 2009 Apr 5].
- [21] Zintzaras E, Lau J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. *J Clin Epidemiol* 2008 Jul;61(7):634–45.
- [22] Sterne J, Becker B, Egger M. The funnel plot. In: Rothstein H, Sutton A, Borenstein M, editors. *Publication bias in meta-analysis. prevention, assessment and adjustments*. Chichester: Wiley; 2005.
- [23] Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nat Genet* 2001;29:306–9.
- [24] Kraft P. Curses–winner's and otherwise–in genetic epidemiology. *Epidemiology* 2008;19:649–51.
- [25] Zollner S, Pritchard JK. Overcoming the winner's curse: estimating penetrance parameters from case-control data. *Am J Hum Genet* 2007;80:605–15.



Aging is associated with circulating cytokine dysregulation

Lorena Álvarez-Rodríguez^a, Marcos López-Hoyos^b, Pedro Muñoz-Cacho^c,
Víctor Manuel Martínez-Taboada^{a,*}

^a Division of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Cantabria, Spain

^b Division of Immunology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Cantabria, Spain

^c Gerencia de Atención Primaria, Servicio Cántabro de Salud, Santander, Cantabria, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 November 2011

Accepted 3 January 2012

Available online 12 January 2012

Keywords:

Aging

Cytokines

Th1

Th2

Th17

ABSTRACT

Purpose: Aging is accompanied by a progressive increase in pro-inflammatory cytokine status. However, little is known about the development of age-dependent modifications in other circulating cytokines. The aim of this study was to investigate *in vivo* the influence of age on circulating cytokine production in healthy subjects (HC).

Methods: Circulating cytokines were measured by CBA and ELISA in 73 HC. Intracellular cytokine production was assessed in CD3+ and CD14+ cells by flow cytometry. Production of cytokines in cell culture supernatants was also studied after polyclonal stimulation.

Results: Subjects were divided into three different groups according to age: 28 young HC (<30 years, 26.2 ± 2.4), 24 middle age HC (30–60 years, 44.7 ± 8.4) and 21 elderly HC (>60 years, 70.6 ± 7.9). Age was positively correlated with the circulating levels of IL-12p70, IL-1 β , TNF α , IL-6, and IL-10. Age had a negative correlation with circulating levels of IL-17. Besides, age was positively correlated with spontaneous intracellular expression of proinflammatory cytokines in circulating monocytes. No correlation was found with other intracellular cytokine expression or with the production of cytokines in cell culture supernatants after *in vitro* stimulation. Gender had a marginal effect on the circulating cytokine profile.

Conclusion: Aging has a significant impact on the production of circulating cytokines in healthy individuals. The circulating cytokine milieu may contribute to the development of age-restricted conditions.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The aging process is accompanied by qualitative and quantitative changes in the immune system. This process, also called immunosenescence, is followed by profound changes in T cell subsets, antigen recognition repertoires, and effector functions [1–5]. As a consequence, elderly individuals show an increased susceptibility to neoplasias, infections and autoimmune disorders.

Traditionally, effector CD4+ T cells have been classified into T helper 1 (Th1)¹ and Th2 subsets, based on their cytokine production profile. Recently, Th1 and Th2 have had to make room for a third effector subset, Th17. This later subset is characterized by the production of IL-17 and may be induced by distinct pathways that up-regulate transcription factors, such as ROR γ t and STAT-3.

* Corresponding author. Address: Division of Rheumatology, Hospital Universitario “Marqués de Valdecilla-IFIMAV”, Facultad de Medicina, Avda. Valdecilla s/n, 39008 Santander, Spain. Fax: +34 942 324641.

E-mail address: vmartinez@medynet.com (V.M. Martínez-Taboada).

¹ Abbreviations: CBA, cytometric bead arrays; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HC, healthy controls; IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; Th, T helper; TNF, Tumor Necrosis Factor

IL-6 is the most important cytokine responsible for the induction of IL-17 secreting cells, whereas IL-23 is not necessary for Th17 differentiation but is for growth, survival and effector functions [6]. The scenario becomes more complex when other functional subsets are being proposed according to the cytokine they produced and their functional effects. Thus, additional regulatory T cells, such as Tr1 (TGF β) or Tr3 (IL-10), as well as other Th cells, such as Th9 (IL-9) or Th22 (IL-22) have recently been described [7,8].

Aging influences many components of the immune response and most importantly, profound changes in T cell function are evident in older individuals [9]. Most of the data about changes induced in macrophages with aging have been obtained from murine models, and information on human monocytes/macrophages is limited. Some of them have shown that phagocytic function remains intact [10] whereas in others the function of macrophages declines along with aging [11]. It has been suggested that a pro-inflammatory status is one of the major characteristics of aging [12–14]. The plasma concentration of IL-6 is considered to be a major variable in the human immune profile of old age, which reflects the role of high levels of inflammatory cytokines in shortening the life span [14–18]. However, studies examining alterations in pro-inflammatory cytokine production in the elderly are contradictory.

Both an increase and no change in pro-inflammatory cytokine production between different age groups have been reported [19–22]. Although several recent reports have suggested that there is a decrease in the production of pro-inflammatory cytokines by macrophages from aged humans and mice, most literature suggests the opposite, together with an increase of proinflammatory markers such as C-reactive protein [19,23,24]. As stated above, this discrepancy may reflect problems regarding the methodology used in cytokine detection or the selection of subjects [13]. It has been demonstrated that in fact underlying inflammatory diseases and poor nutrition may actually be responsible for this circulating pro-inflammatory state, rather than the natural aging process [23]. The greater prevalence of morbidity and higher cardiovascular risk factors in aged humans may also contribute to elevated levels of inflammatory cytokines, in addition to a fundamentally altered immune system [25,26]. The aging process differentially affects the Th1 and Th2 subsets, although information is again contradictory [12,27–29]. It has been suggested that a shift towards an increased role of Th2 cytokines and a diminished role of Th1 cytokines emerges with aging [12,27,29]. Other authors have suggested that the microenvironment in which CD4⁺ T cells develop in older people may cause the production of more cells committed to Th1 than in younger subjects [30,28,31].

In order to dissect alterations of the immune system involved with aging, we studied the function of circulating T cells and monocytes, by assessing an array of cytokines produced upon cell activation. In particular, we quantified the cytokine levels in serum and investigated the production of intracellular cytokines, and in culture supernatants by *in vitro* activated blood T cells and monocytes.

2. Material and methods

2.1. Study subjects

The study included 73 healthy individuals (HC) without a previous history of chronic infectious, neoplastic or inflammatory

diseases. HC were divided into three different groups according to age: 28 young HC (<30 years, 26.2 ± 2.4), 24 middle-age HC (30–60 years, 44.7 ± 8.4) and 21 elderly HC (>60 years, 70.6 ± 7.9). All the HC gave written informed consent, and the study was approved by the regional Ethics Committee.

2.2. Detection of soluble cytokines in serum

The serum was isolated from 4 ml of blood, obtained in tubes without additives, from each individual and stored at -80°C until analysis. The quantitative determination of inflammatory cytokines in serum was performed using the Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammation kit (BD Biosciences; San Diego, CA). This kit allows us to quantitatively measure interleukin (IL) 12p70, Tumor Necrosis Factor (TNF) α , IL-10, IL-6, and IL-1 β protein levels in a single sample. The fluorescence produced by CBA beads was measured on a FACScalibur Flow Cytometer and analyzed using Software CBA Folder Excel 98 (BD Biosciences). Detection limits were 1.9 pg/ml for IL-12p70, 3.7 pg/ml for TNF α , 3.3 pg/ml for IL-10, 2.5 pg/ml for IL-6, and 7.2 pg/ml for IL-1 β .

IL-17 and IL-23 circulating levels were determined by quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the commercial human IL-17A and human IL-23 ELISA Ready SET GO kit (eBioscience, San Diego, CA), respectively, and following the manufacturer's instructions. The assay sensitivities for IL-17 and IL-23 were 0.5 pg/ml and 0.72 pg/ml, respectively, by using zero standard +3 standard deviation. The quantitative determination of serum IFN γ was performed by ELISA (DIAclone, Besançon, France) according to the manufacturer's instructions. The minimum detectable level of IFN γ was 0.69 pg/ml. Serum levels of IL-9 were determined using the commercial human IL-9 ELISA Ready SET GO kit (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. The assay sensitivity was 1 pg/ml. Serum levels of IL-13 were determined using Pelikine Compact Human IL-13 ELISA kit (SANQUIN, Amsterdam, Netherlands). The assay sensitivity was 3 pg/ml.

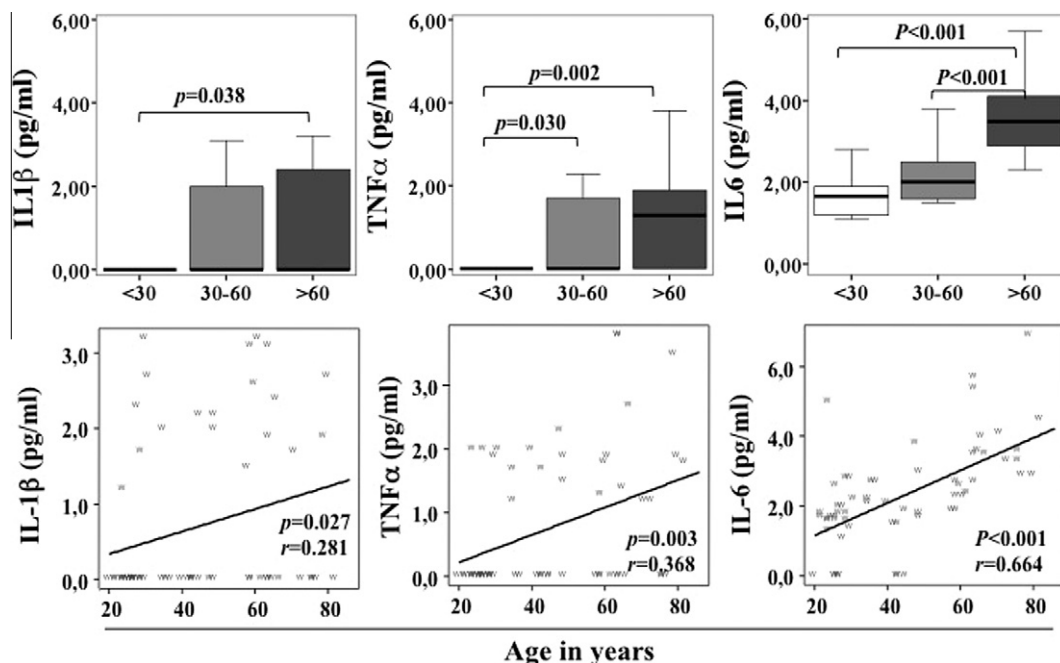


Fig. 1. Age and circulating pro-inflammatory cytokines. Circulating pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α , and IL-6) were measured by CBA in 62 healthy controls. Levels of circulating proinflammatory cytokines are shown in the different age groups as boxplot (upper panel) and as correlation graphics (lower panel).

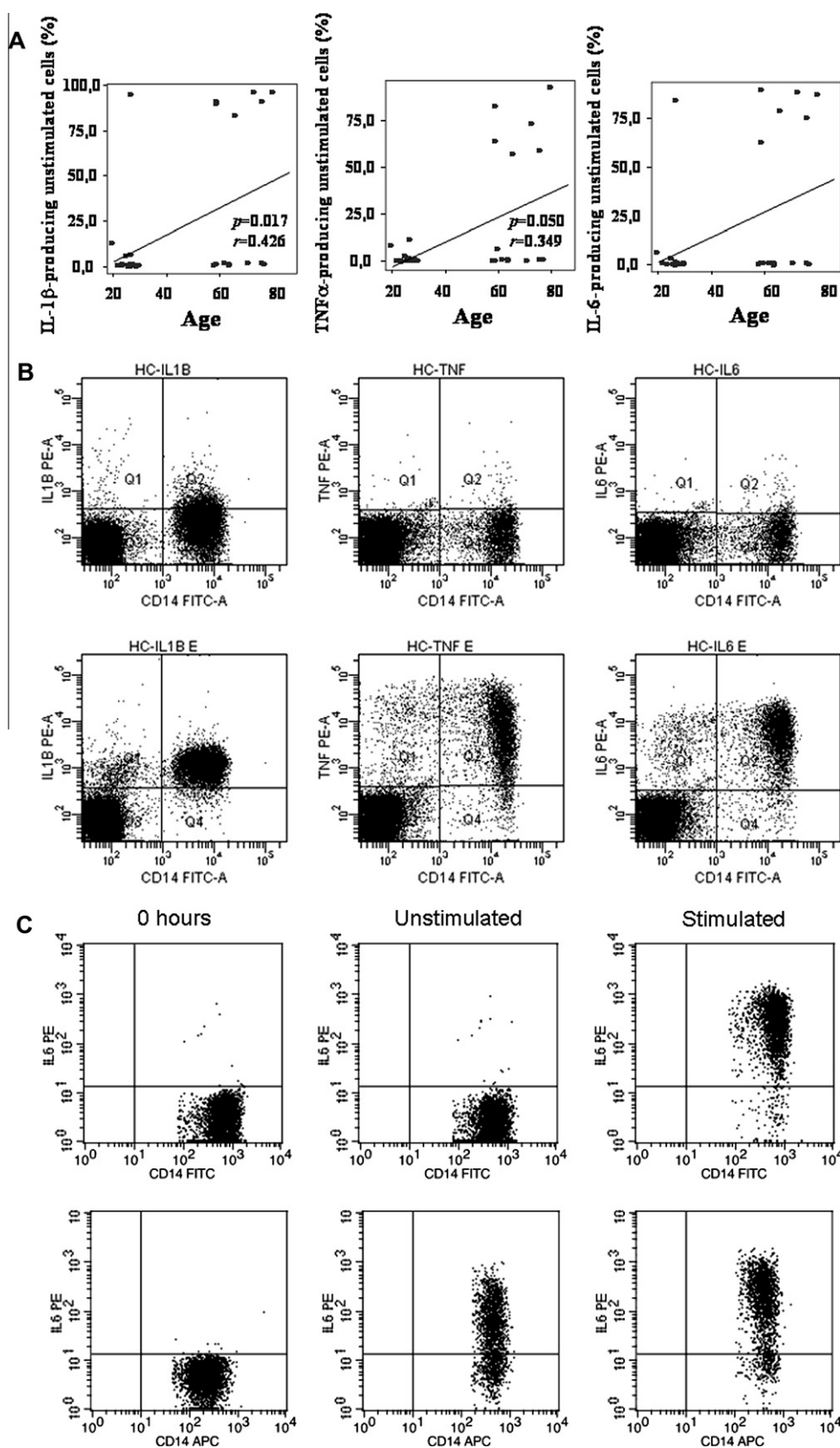


Fig. 2. Age and intracellular pro-inflammatory cytokines. Intracellular pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α , and IL-6) were measured *ex vivo* and after *in vitro* stimulus by flow cytometry in 32 healthy controls. Correlation between unstimulated intracellular pro-inflammatory cytokines and age is shown in (A). A flow cytometry example is also shown with dot plots from unstimulated (upper) and stimulated (lower) cells (B). (C) shows a representative flow cytometry dot plot from a patient producing very low levels of spontaneous intracellular IL-6 (unstimulated) in the upper middle panel, versus a patient producing high levels (lower middle). As control, in each patient the dot plots of cells at 0 h of culture and at 4 h of culture without stimulus are shown on the left and middle, respectively. The positive stimulated control for each patient is shown on the right side (Stimulated).

Table 1

Multivariate regression analysis of relationships between age, gender and intracellular pro-inflammatory cytokines.

	S.E	p	OR	C.I. 95%
IL1β producing unstimulated cells (%)				
Age	0.070	0.025	1.073	1.021–1.128
Gender	1.635	1.058	0.122	0.645–40.760
Constant	−3.430	1.361	0.012	
H-L: 3.676 ($p = 0.885$); R^2 : 0.424				
TNFα producing unstimulated cells (%)				
Age	0.046	0.020	1.048	1.007–1.090
Gender	0.831	0.910	0.361	0.386–13.669
Constant	−2.393	1.130	0.034	0.091
H-L: 6.045 ($p = 0.642$); R^2 : 0.238				
IL6 producing unstimulated cells (%)				
Age	0.045	0.021	1.046	1.004–1.091
Gender	1.566	0.963	0.104	0.725–31.630
Constant	−2.557	1.200	0.033	0.078
H-L: 6.747 ($p = 0.564$); R^2 : 0.260				

H-L: Hosmer-Lemesow test.

 R^2 : R^2 defined by Nagelkerke.

2.3. Detection of intracellular cytokines in circulating lymphocytes and monocytes by flow cytometry analysis

Cells collected in sodium heparin tubes were polyclonally stimulated for 4 h with either phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (1 μ g/ml; Sigma–Aldrich) and ionomycin (50 μ g/ml; Calbiochem, Gibbstown, NJ) in polystyrene tubes (lymphocytes) or with lipopolysaccharide (LPS) (100 μ g/ml; Sigma–Aldrich) in polypropylene tubes (monocytes) in the presence of brefeldin A (500 μ g/ml; Sigma–Aldrich) (induced or stimulated cytokine expression). As control, cells were incubated in identical medium without stimulus (spontaneous or unstimulated cytokine expression). After culture, cells were stained with PerCP-conjugated anti-CD3 antibody and FITC-conjugated anti-CD14 antibody (BD Biosciences) to identify T lymphocyte and monocyte subpopulations, respectively. Thereafter, the red blood cells were lysed

with FACS lysing solution (BD Biosciences), and the mononuclear cells were permeabilized using FACS Permeabilizing Solution (BD Biosciences), and intracellularly stained with FITC- or PE-conjugated cytokine-specific monoclonal antibodies for IL-2, IFN γ , and IL-4 for lymphocytes, and IL-1 β , TNF α , and IL-6 for monocytes (BD Biosciences). Levels of intracellular cytokine-producing cells were determined by FACScalibur Flow Cytometer and analyzed using Paint-A-Gate or Cell Quest Pro Software (BD Biosciences).

For characterization of Th17 cells, cells were stimulated under the same conditions, followed by surface (CD3, CD4, CD161, CCR6 and TCR $\gamma\delta$) and intracellular staining (IFN γ and IL-17). All the antibodies were provided by BD Biosciences (San Jose, CA) except Alexa Fluor 488-conjugated anti-IL-17 monoclonal antibody, which was provided by eBiosciences.

2.4. Detection of cytokines in cell culture supernatants

PBMCs from heparinized blood were obtained by Ficoll Histopaque 1077 (Sigma Aldrich) gradient centrifugation. PBMCs from 11 HC were cultured in RPMI 1640 and 10% FBS with PMA (100 ng/ml) and ionomycin (4 μ g/ml) for 24 h. Supernatants were obtained and stored at -80°C until analysis. The release of IL-1 β , TNF α and IL-6 into the culture supernatants was determined using the CBA kit, as described above. Release of IL-12p70 and IL-10 was determined by ELISA (DIACLONE), in accordance with the manufacturer's instructions. The sensitivity of the ELISA kit for IL-12p70 and IL-10 was 0.75 pg/ml and 1.30 pg/ml, respectively.

2.5. Statistical analysis

All the statistical analysis of data was carried out using the SPSS 15.0 software (Chicago, IL, USA). The statistical comparisons of data between different age groups were performed using the Mann–Whitney U test. The relationship between the different variables of the study was determined by calculating the Spearman correlation coefficient. Because the values of most cytokines were

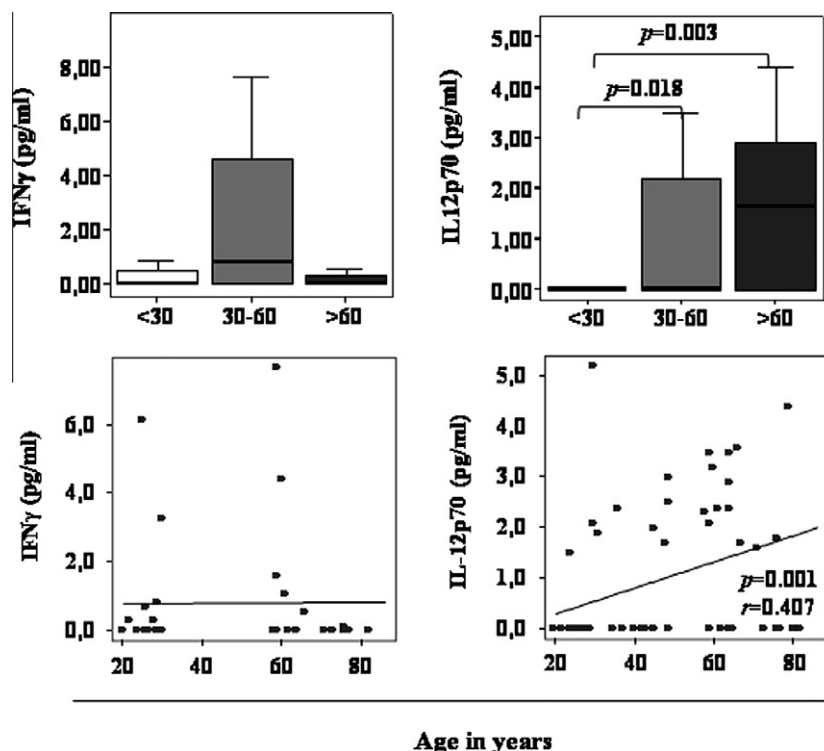


Fig. 3. Age and circulating Th1 cytokines. Circulating Th1 cytokines, IL-12p70 ($n = 62$) and IFN γ ($n = 34$), were measured by CBA and ELISA. Levels of circulating Th1 cytokines are shown in the different age groups as boxplot (upper panel) and as correlation graphics (lower panel).

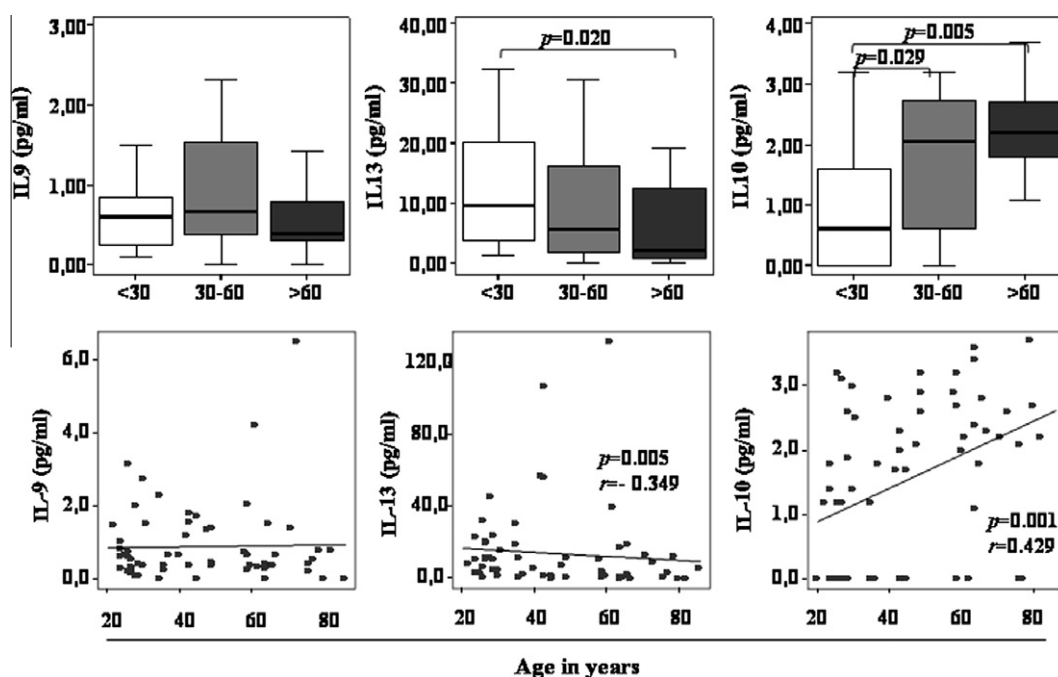


Fig. 4. Age and circulating Th2 cytokines. Circulating Th2 cytokines (IL-9 and IL-13) were measured by ELISA in 65 healthy controls. Circulating anti-inflammatory cytokine (IL-10) was measured by CBA in 62 healthy controls. Levels of circulating Th2 cytokines and IL-10 are shown in the different age groups as boxplot (upper panel) and as correlation graphics (lower panel).

non-normally distributed and log transformation also did not result in normal distributions, we dichotomized all cytokine levels ($\leq$ median = 0; $>$ median = 1) for the multivariate analyses. We used unconditional logistic regression [32,33] to estimate odds ratios and 95 percent confidence intervals associated to aging (in years) and controlling for gender (women reference group). Enter methods were used in all cases, Wald chi-square statistic for statistical significance of individual regression coefficients, and Hosmer–Lemeshow test and R^2 index defined by Nagelkerke [34] to assess the fit of the logistic model against the actual outcome. Differences were considered significant when p values were <0.05 .

3. Results

3.1. Age is associated with an increase in circulating pro-inflammatory cytokines

As shown in Fig. 1, age was positively correlated with the circulating levels of pro-inflammatory cytokines: $\text{TNF}\alpha$ ($r = 0.368$, $p = 0.003$), $\text{IL-1}\beta$ ($r = 0.281$, $p = 0.027$), and IL-6 ($r = 0.664$, $p < 0.0001$). Besides, age was positively correlated with spontaneous intracellular pro-inflammatory cytokine expression by circulating monocytes for $\text{TNF}\alpha$ producing unstimulated cells ($r = 0.349$, $p = 0.050$) and $\text{IL-1}\beta$ producing unstimulated cells ($r = 0.426$, $p = 0.017$) (Fig. 2). We found no correlation between serum levels of pro-inflammatory cytokines and spontaneous intracellular pro-inflammatory cytokine expression by monocytes. In the multivariate regression analysis, IL-6 producing unstimulated cells ($p = 0.032$) were also associated with age (Table 1). Such correlation was lost when monocytes were stimulated *in vitro* (data not shown).

3.2. Th1 and Th2 subsets are differentially affected by the aging process

It has been suggested that a shift towards an increased role of Th2 cytokines and a diminished role of Th1 cytokines emerges with

aging [12], although there is great controversy [27–31]. Here we addressed this issue by measuring Th-derived circulating cytokine levels and intracellular cytokine expression.

Age was positively correlated with the circulating levels of a Th1-inducing cytokine such as IL-12p70 ($r = 0.407$, $p = 0.001$) (Fig. 3). No differences in serum levels were found for the characteristic Th1 cytokine, $\text{IFN}\gamma$, although a non-significant increase was observed in the middle-age group. Furthermore, no correlation between spontaneous intracellular Th1 (IL-2 and $\text{IFN}\gamma$) expression or after *in vitro* stimulation on T cells was found (data not shown). Serum Th2 cytokines and IL-10 levels are shown in Fig. 4. A negative correlation was found with the circulating levels of a Th2 cytokine such as IL-13 ($r = -0.349$, $p = 0.005$). This correlation was lost in the logistic regression analysis. No correlation with circulating IL-9 or with spontaneous intracellular IL-4 expression or after *in vitro* stimulation was found. No correlation was found with the production of any cytokine in cell culture supernatants after *in vitro* stimulation (data not shown). As shown in Fig. 4, age was also positively correlated with the circulating levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 ($r = 0.429$, $p = 0.001$).

3.3. Circulating IL17 levels decrease with age in healthy controls

A negative correlation between age and circulating levels of IL-17 was also found ($r = -0.427$, $p = 0.005$). As shown in Fig. 5A, healthy controls over the age of 60 years had significant lower levels of circulating IL-17 when compared to young subjects ($p = 0.016$). No correlation was found between IL-23 and age, although a similar trend was also seen for this cytokine. Despite the decrease in circulating IL-17 with age, we found no significant changes in the frequencies of circulating $\text{IL17}^+ \text{IFN}\gamma^-$ or $\text{IL17}^+ \text{CCR6}^+$ cells in the different age groups (Fig. 5B). In addition, no correlation between serum IL-17 levels and the percentage of circulating $\text{IL17}^+ \text{IFN}\gamma^-$ or $\text{IL17}^+ \text{CCR6}^+$ cells was found ($r = 0.500$, $p = 0.667$; and $r = 0.084$, $p = 0.844$, respectively).

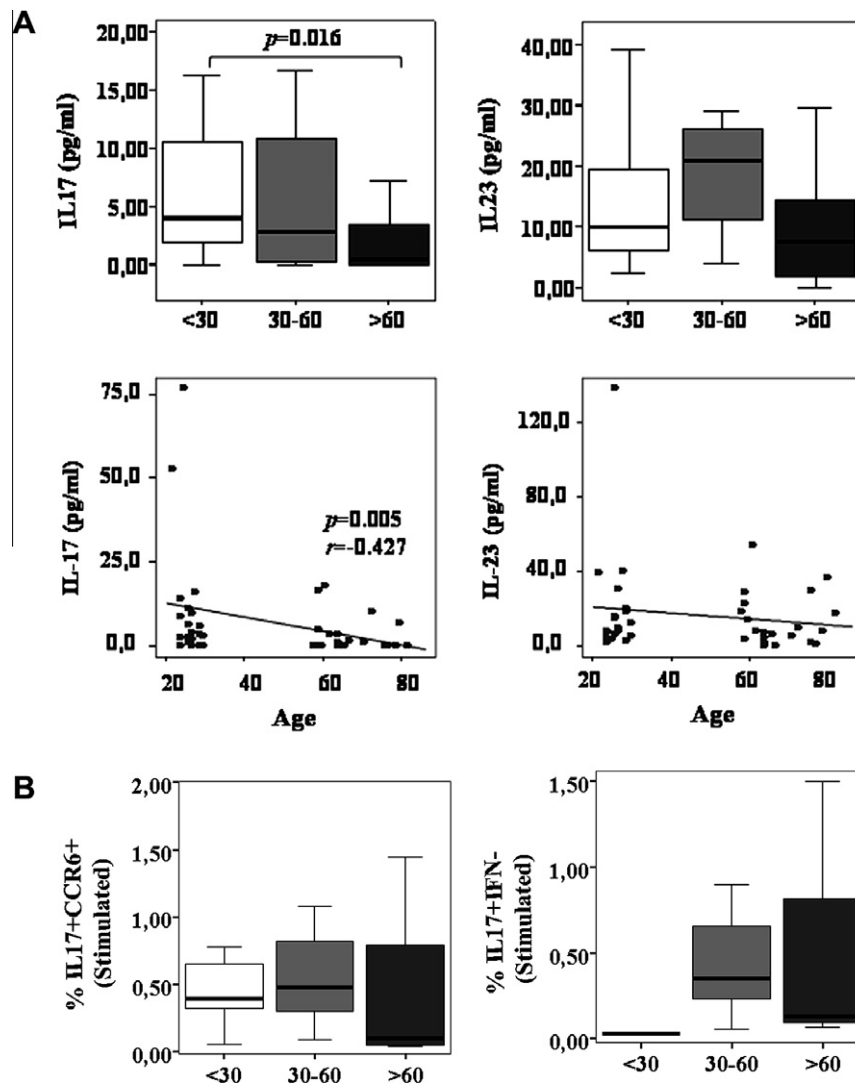


Fig. 5. (A) Age and soluble Th17 cytokines. Circulating IL-17 and IL-23 were measured by ELISA in 41 healthy controls. Levels of circulating cytokines are shown in the different age groups as boxplot (upper panel) or as a correlation of the whole group with age (lower panel). (B) Age and circulating Th17 cells. Frequencies of peripheral blood Th17 cells in 22 healthy controls: <30 years-old ($n = 7$, except in right panel), 30–60 years-old ($n = 11$) and >60 years old ($n = 4$). Th17 cells were defined as IL-17+CCR6+ cells (left) or as IL-17+ IFN γ - cells (right).

3.4. Gender has a marginal effect on the circulating cytokine profile

As gender has been shown to determine the cytokine profile in several studies [2], we analyzed its influence on the circulating cytokine profile. The study population consisted of 49 (67.1%) females and 24 (32.9%) males. As shown in Fig. 6, females showed a significant increase in circulating levels of TNF α ($p = 0.013$), and a marginal increase in IL-6 ($p = 0.044$) and IL-10 ($p = 0.049$). As shown in Table 2, and after multivariate regression analysis, only circulating levels of TNF α ($p = 0.046$) were marginally associated with gender.

3.5. Correlation among different serum levels of cytokines

Our aim was to evaluate whether there was a correlation between different serum cytokine levels in the subjects included in the study. Thus, serum levels of proinflammatory cytokines correlated positively with serum levels of IL-10 (Table 3). Besides, there was a significant negative correlation of IL-6, but not of IL-1 and TNF- α , with IL-17. Furthermore, IL-17 correlated negatively with IL-12 but not with IL-10 serum levels (Table 3).

4. Discussion

Herein, we investigated *in vivo* the influence of age on circulating cytokine production in a large group of healthy subjects. The present study provides further evidence for cytokine dysregulation during apparently normal aging. The aging process was accompanied by an increase in pro- and anti-inflammatory cytokines, a predominance of Th1 cytokines, and a decrease in Th17 cytokines. Although several groups have addressed the influence of age in the production of circulating cytokines, the findings have been usually difficult to interpret due to several facts including subject selection, methodological differences, or the inclusion of patients with different inflammatory conditions [2]. Here we have taken advantage of using different approaches to study a wide array of cytokines in the peripheral compartment. First, we have analyzed circulating levels of cytokines in a large sample of HC. However, quantification of circulating cytokine levels using solid-phase assays may be misleading, as many complicating factors influence detection with these assays [13]. In order to examine the presence of Th precursor cells in the peripheral blood of HC, we assessed intracellular cytokine production by peripheral blood T cells.

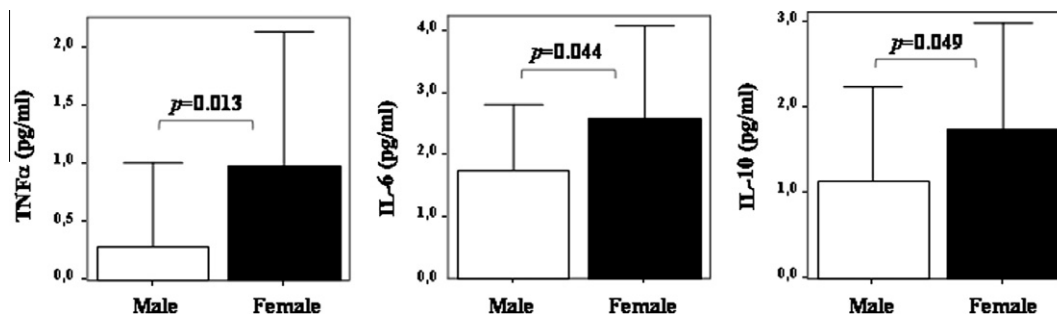


Fig. 6. Influence of gender in circulating cytokine production. The study population consisted of 49 (67.1%) females and 24 (32.9%) males. As shown, females showed a significant increase in circulating levels of TNFα, and marginally of IL-6 and IL-10. No differences were found for other cytokines.

Table 2

Multivariate regression analysis of relationships between age, gender and circulating cytokines.

	S.E	p	OR	C.I. 95%
IL12p70 (pg/ml)				
Age	0.040	0.016	1.041	1.010–1.074
Gender	−0.417	0.645	0.659	0.186–2.333
Constant	−2.360	0.855	0.094	
H-L: 14.302 ($p = 0.074$); R^2 : 0.181				
TNFα (pg/ml)				
Age	0.038	0.016	1.038	1.007–1.071
Gender	−1.446	0.725	0.236	0.057–0.974
Constant	−1.887	0.822	0.152	
H-L: 6.361 ($p = 0.607$); R^2 : 0.257				
IL10 (pg/ml)				
Age	0.054	0.017	1.055	1.020–1.092
Gender	−1.138	0.637	0.320	0.092–1.116
Constant	−1.934	0.813	0.145	
H-L: 11.652 ($p = 0.167$); R^2 : 0.325				
IL6 (pg/ml)				
Age	0.086	0.022	1.090	1.045–1.137
Gender	−0.701	0.688	0.308	0.129–1.911
Constant	−3.406	0.971	0.033	
H-L: 12.134 ($p = 0.145$); R^2 : 0.477				
IL17 (pg/ml)				
Age	−0.038	0.017	0.963	0.932–0.995
Gender	0.589	0.774	1.803	0.395–8.223
Constant	1.683	0.913	5.379	
H-L: 4.030 ($p = 0.854$); R^2 : 0.218				

H-L: Hosmer-Lemesow test.

R^2 : R^2 defined by Nagelkerke.

Furthermore, we also studied the intracellular production of pro-inflammatory cytokines in circulating monocytes. Finally, we also assessed the capacity for cytokine secretion of lymphocytes and monocytes to culture supernatants after *in vitro* activation. With this approach, a general picture of different cytokine subsets is provided for apparently healthy individuals, although we are aware that there was no significant correlation between cytokine levels in serum and function, such as intracellular production of cytokines or secretion to culture supernatants, as previously described by us [35].

Table 3

Correlation of the serum levels of cytokines measured in the whole population ($n = 73$).

	IL-6	IL-1	TNF-α	IL-10	IL-12	IL-17
IL-6		0.349 (0.005)	0.519 (<0.001)	0.415 (0.001)	0.452 (<0.001)	−0.440 (0.004)
IL-1	0.349 (0.005)		0.463 (<0.001)	0.348 (0.006)	0.585 (<0.001)	0.005 (0.976)
TNF-α	0.519 (<0.001)	0.463 (<0.001)		0.529 (<0.001)	0.347 (0.006)	−0.038 (0.815)
IL-10	0.415 (0.001)	0.348 (0.006)	0.348 (0.006)		0.585 (<0.001)	−0.239 (0.133)
IL-12	0.452 (<0.001)	0.502 (<0.001)	0.347 (0.006)	0.452 (<0.001)		−0.411 (0.008)
IL-17	−0.440 (0.004)	0.005 (0.976)	−0.38 (0.815)	−0.239 (0.133)	−0.411 (0.008)	

The r Spearman correlation coefficient (p level of significance) is shown.

In agreement with previous studies [14], we found a significant positive correlation between age and circulating levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1β and TNFα. Although macrophages have been assumed to be a primary source of pro-inflammatory cytokines in the elderly, other cell populations may contribute to cytokine production also. In fact, both T cell and monocyte pro-inflammatory cytokine levels were seen to increase with age [13]. Our results also confirm that *ex vivo*, circulating monocytes are one of the possible sources of pro-inflammatory cytokines, as determined by intracellular cytokine staining. However, we can not exclude that pro-inflammatory cytokines were also produced by other different cell types.

IL-10 exerts an inhibitory effect on pro-inflammatory function on those individuals who are genetically predisposed to produce high levels of IL-10 and have a higher probability to survive longer [25,26]. Here we found a significant positive correlation of circulating IL-10 with age, which is in disagreement with previous studies [14]. Although other explanations cannot be excluded, it is possible that the increase in IL-10 with age could be a compensatory mechanism from the pro-inflammatory state. Besides, positive correlation of age with IL-12p70 and TNFα suggests certain predominance of a Th1 phenotype with aging.

The recently described Th17 subset of CD4+ T cells is involved in inflammation and autoimmunity [6]. Greater development and activation of Th17 cells have been described in old mice compared to young mice [36]. It has been suggested that aging promotes a transition to a Th17 phenotype upon exposure to environmental antigens. This is mainly due to the increase in Th17 promoting factors, such as IL-6 or TGFβ, and a decrease in Th17 regulatory factors, such as IL-2 [9]. A study done in humans has shown decreased generation of IL-17 by T cells in aged individuals compared to young ones. The decrease in IL-17 production after stimulation was restricted to old men [2]. More recently, it has been described that healthy subjects >65 years old had a decreased frequency of IL-17-producing cells compared to healthy young subjects, with no changes in IFNγ-producing cells [37]. Our results also show a decrease of circulating IL-17 with age. Although no correlation was found between IL-23 and age, a similar trend was also seen for this Th17 growth cytokine. Despite the decrease of circulating

IL-17 with age, no correlation between the percentage of circulating IL17+ IFN γ – or IL17+ CCR6+ cells was found. The discrepancies between the age-related increase in the Th17 promoting factors, such as IL-6, and the decrease in circulating IL-17 during normal aging may be secondary to known defects of senescent T cells, including the increase in Treg population, the decrease of T cell subsets to antigen stimulation responsiveness or an increased susceptibility to activation-induced apoptosis [2]. However, it still remains to clearly establish the role of Th17 cells in the aging process.

It has been also suggested that other factors different from the aging process itself may play a role in controlling cytokine production [2,38,39]. Gender has been shown to determine the cytokine profile [2]. For particular cytokines such as IFN γ and IL-10 in T cells, or IL-6 and TNF α in monocytes, alterations induced by aging are described as gender specific [38]. Here, and in agreement with previous results, we have also found some differences in cytokine production according to gender. These differences were restricted to some pro-inflammatory cytokines such as TNF α . For IL-6 and IL-10 these differences were only marginal. Furthermore, and in agreement with previous results [14], we have found no differences according to gender for the majority of the cytokines studied.

The present study has several limitations that should be acknowledged. The first one is related to the number of subjects included in the report. Although the number is reasonably high, not all the cytokines and techniques were determined in all the subjects. Furthermore, and although we did not find significant differences between genders, there is also a predominance of females in our study. The most relevant limitation could be related to the levels of cytokines in apparently healthy controls, and the sensitivity of the techniques used to detect them. In this respect, the threshold of several cytokines was below the sensitivity for IL-1 β , TNF α , and IL-10. Despite this, the results suggesting that pro-inflammatory cytokines correlate with the aging process are rather consistent, based on the IL-6 levels and the determination of intracellular monocyte-derived cytokines. Furthermore, IL-1 β and TNF α are also difficult to detect in healthy subjects, and also in patients with inflammatory conditions [2]. A different issue accounts for IL-10, and therefore the results for this cytokine should be taken with caution.

5. Conclusions

Immunosenescence is characterized by decreases in protective immune responses and increases in inflammation and autoimmunity. The data presented in the present work provided further evidence for cytokine dysregulation during aging in healthy individuals. The relevance of these findings for healthy aging or for the development of age-restricted diseases remains to be elucidated. However, manipulation of age-associated changes in cytokine patterns might provide a clue in improving the aging process.

Acknowledgments

This work was supported by Grants from Fundación Marqués de Valdecilla and Fondo de Investigación Sanitaria (PI080098). Lorena Alvarez was supported by a Grant for Research Aid from Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV. We are especially grateful to Iñaki Beares (supported by a Grant from Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV), Marta Gonzalez (supported by Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV) and Carolina Santa Cruz (supported by a grant for Research Aid from Schering-Plough, Spain) for their helpful technical assistance. We would like to thank all the controls included in the present study.

References

- [1] C. Caruso, G. Candore, D. Cigna, G. Di Lorenzo, G. Sireci, F. Dieli, et al., Cytokine production pathway in the elderly, *Immunol. Res.* 15 (1996) 84–90.
- [2] E.J. Goetzl, M.C. Huang, J. Kon, K. Patel, J.B. Schwartz, K. Fast, et al., Gender specificity of altered human immune cytokine profiles in aging, *FASEB J.* 24 (2010) 3580–3589.
- [3] V. Martínez-Taboada, M.J. Bartolomé, J.A. Amado, R. Blanco, M.T. García-Unzueta, V. Rodríguez-Valverde, et al., Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in elderly subjects are associated with an impaired function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Mech. Ageing Dev.* 123 (2002) 1477–1486.
- [4] D. Posnett, R. Sinha, S. Kabak, C. Russo, Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to “benign monoclonal gammopathy”, *J. Exp. Med.* 179 (1994) 609–618.
- [5] I. Rea, M. Stewart, P. Campbell, H.D. Alexander, A.D. Crockard, T.C. Morris, Changes in lymphocyte subsets, interleukin, and soluble interleukin 2 receptor in old and very old age, *Gerontology* 42 (1996) 69–78.
- [6] C.T. Weaver, R.D. Hatton, P.R. Mangan, L.E. Harington, IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages, *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007) 821–852.
- [7] R.J. Noelle, E.C. Nowak, Cellular sources and immune functions of interleukin-9, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 683–687.
- [8] F. Annunziato, S. Romagnani, Heterogeneity of human effector CD4+ T cells, *Arthritis Res. Ther.* 11 (2009) 257.
- [9] L. Haynes, A.C. Maué, Effects of aging on T cell function, *Curr. Opin. Immunol.* 21 (2009) 414–417.
- [10] A. Fietta, C. Merlini, C. Dos Santos, S. Rovida, C. Grassi, Influence of aging on some specific and nonspecific mechanisms of the host defense system in 146 healthy subjects, *Gerontology* 40 (1994) 237–245.
- [11] D.R. Davila, C.K. Edwards 3rd, S. Arkins, J. Simon, K.W. Kelley, Interferon-gamma-induced priming for secretion of superoxide anion and tumor necrosis factor- α declines in macrophages from aged rats, *FASEB J.* 4 (1990) 2906–2911.
- [12] S. Alberti, E. Cevenini, R. Ostan, M. Capri, S. Salvioli, L. Bucci, et al., Age-dependent modifications of type 1 and type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans, *Mech. Ageing Dev.* 127 (2006) 560–566.
- [13] L. ÓMahony, J. Holland, J. Jackson, C. Feighery, T.P.J. Hennessy, K. Mealy, Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production, *Clin. Exp. Immunol.* 113 (1998) 213–219.
- [14] R.J. Forsey, J.M. Thompson, J. Ernerudh, T.L. Hurst, J. Strindhall, B. Johansson, et al., Plasma cytokine profiles in elderly humans, *Mech. Ageing Dev.* 124 (2003) 487–493.
- [15] A. Wikby, B.O. Nilsson, R. Forsey, J. Thompson, J. Strindhall, S. Löfgren, et al., The immune risk phenotype is associated with IL-6 in the terminal decline stage: findings from the Swedish Nona immune longitudinal study of very late life functioning, *Mech. Ageing Dev.* 127 (2006) 695–704.
- [16] W.B. Ershler, E.T. Keller, Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty, *Annu. Rev. Med.* 51 (2000) 245–270.
- [17] N. Giuliani, P. Sansoni, G. Girasole, R. Vescovini, G. Passeri, M. Passeri, et al., Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130 exhibit different patterns of age- and menopause-related changes, *Exp. Gerontol.* 36 (2001) 547–557.
- [18] A.A. Beharka, M. Meydani, D. Wu, L.S. Leka, A. Meydani, S.N. Meydani, Interleukin-6 production does not increase with age, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 56 (2001) B81–B88.
- [19] U. Fagiolo, A. Cossarizza, S. Santacaterina, C. Ortolani, D. Monti, R. Paganelli, et al., Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people, *Eur. J. Immunol.* 23 (1993) 2375–2378.
- [20] E.A. Rich, M.A. Mincek, K.B. Armitage, E.G. Duffy, D.C. Owen, J.D. Fayen, et al., Accessory function and properties of monocytes from healthy elderly humans for T lymphocyte responses to mitogen and antigen, *Gerontology* 39 (1993) 93–108.
- [21] J.A. Riancho, M.T. Zarrabeitia, J.A. Amado, J.M. Olmos, J. González-Macías, Age-related differences in cytokine secretion, *Gerontology* 40 (1994) 8–12.
- [22] M. Molteni, S. Della Bella, B. Mascagni, C. Coppola, V. De Micheli, C. Zulian, et al., Secretion of cytokines upon allogenic stimulation: effect of ageing, *J. Biol. Reg. Homeo. Agents* 8 (1994) 41–47.
- [23] T.P. Plackett, E.D. Boehmer, D.E. Faunce, E.J. Kovacs, Aging and innate immune system, *J. Leukoc. Biol.* 76 (2004) 291–299.
- [24] C. Franceschi, M. Capri, D. Monti, S. Giunta, F. Olivieri, F. Sevini, et al., Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans, *Mech. Ageing Dev.* 128 (2007) 92–105.
- [25] L. Ferrucci, A. Corsi, F. Lauretani, S. Bandinelli, B. Bartali, D.D. Taub, et al., The origins of age-related proinflammatory state, *Blood* 105 (2005) 2294–2299.
- [26] C. Caruso, D. Lio, L. Cavallone, C. Franceschi, Aging, longevity, inflammation, and cancer, *Ann. NY Acad. Sci.* 1028 (2004) 1–13.
- [27] G.M. Shearer, Th1/Th2 changes in aging, *Mech. Ageing Dev.* 94 (1997) 1–5.
- [28] S. Sakata-Kaneko, Y. Wakatsuki, Y. Matsunaga, T. Usui, T. Kita, Altered Th1/Th2 commitment in human CD4+ T cells with ageing, *Clin. Exp. Immunol.* 120 (2000) 267–273.
- [29] C.I. Karanfilov, B. Liu, C.C. Fox, R.R. Lakshmanan, R.L. Whisler, Age-related defects in Th1 and Th2 cytokine production by human T cells can be

- dissociated from altered frequencies of CD45RA⁺ and CD45RO⁺ T cell subsets, *Mech. Ageing Dev.* 109 (1999) 97–112.
- [30] J. Chipeta, Y. Komada, X.L. Zhang, T. Deguchi, K. Sugiyama, E. Azuma, et al., CD4⁺ and CD8⁺ cell cytokine profiles in neonates, older children, and adults: increasing T helper type 1 and T cytotoxic type 1 cell populations with age, *Cell. Immunol.* 183 (1998) 149–156.
- [31] P. Uciechowski, L. Kahmann, B. Plümäkers, M. Malavolta, E. Mocchegiani, G. Dedoussis, et al., TH1 and TH2 cell polarization increases with aging and is modulated by zinc supplementation, *Exp. Gerontol.* 43 (2008) 493–498.
- [32] D.W. Hosmer, S. Lemeshow, *Applied logistic regression*, second ed., Wiley, New York, 2000.
- [33] S. Menard, 2001. *Applied logistic regression analysis*. (Sage University Paper Series on Quantitative Applications in the Social Sciences, 07–106). Sage, Thousand Oaks.
- [34] N.J.D. Nagelkerke, A note on general definition of the coefficient of determination, *Biometrika* 78 (1991) 691–692.
- [35] L. Álvarez Rodríguez, M. López-Hoyos, C. Mata, A. Fontalba, J. Calvo-Alen, M.J. Marín, et al., Expression and function of toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arthritis, *Ann. Rheum. Dis.* 70 (2011) 1677–1683.
- [36] M.C. Huang, J.J. Liao, S. Bonasera, D.L. Longo, E.J. Goetzl, Nuclear factor- κ B-dependent reversal of aging-induced alterations in T cell cytokines, *FASEB J.* 22 (2008) 2142–2150.
- [37] J.S. Lee, W.W. Lee, S.H. Kim, Y. Kang, N. Lee, M.S. Shin, et al., Age-associated alteration in naive and memory Th17 cell response in humans, *Clin. Immunol.* 140 (2011) 84–91.
- [38] P. Pietschmann, E. Gollob, S. Brosch, P. Hahn, S. Kudlacek, M. Willheim, et al., The effect of age and gender on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells and markers of bone metabolism, *Exp. Gerontol.* 38 (2003) 1119–1127.
- [39] R. Jankord, B. Jemiole, Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men, *Med. Sci. Sports Exerc.* 36 (2004) 960–964.

Age and low levels of circulating vitamin D are associated with impaired innate immune function

Lorena Alvarez-Rodriguez,^{*} Marcos Lopez-Hoyos,[†] Maite Garcia-Unzueta,[‡]
Jose Antonio Amado,^{§,||} Pedro Muñoz Cacho,^{||} and Victor Manuel Martinez-Taboada^{*,||,†}

Divisions of ^{*}Rheumatology, [†]Immunology, [‡]Biochemistry, and [§]Endocrinology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla–Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, Santander, Spain; and ^{||}Gerencia Atención Primaria, Servicio Cantabro de Salud, and Facultad de Medicina, Universidad de Santander, Spain

RECEIVED OCTOBER 24, 2011; REVISED JANUARY 12, 2012; ACCEPTED JANUARY 28, 2012. DOI: 10.1189/jlb.1011523

ABSTRACT

This study investigated *in vivo* the influence of age and vitamin D status on innate immune function in HC. Serum 25OHD was measured in 71 HC. TLR expression on various subpopulations of PBMCs, as well as TLR function by stimulating PBMCs with specific ligands, was assessed by flow cytometry. Circulating cathelicidin levels were determined by ELISA. Serum 25OHD levels decreased with age, and there was a significant inverse correlation between 25OHD levels and age. There was a negative correlation between serum 25OHD levels and MFI expression of TLR7 on B cells, T cells, and monocytes. TLR7 function, addressed by *in vitro* stimulation with a specific agonist, was significantly correlated with serum 25OHD levels, and this was especially a result of the results in HC older than 60 years. MFI expression of TLR5 on T cells and TLR2 on monocytes was also negatively correlated with serum 25OHD levels. TLR1 (monocytes) and TLR2 (monocytes) expression was positively correlated with age. Furthermore, TLR4 and TLR8 function was negatively correlated with age. Circulating cathelicidin levels decreased with age and were positively correlated with 25OHD levels. Aging is accompanied by changes in expression and function of several TLRs. Serum 25OHD levels decrease with age and are also associated with a change in expression and defective function of certain TLRs, especially those involved in viral response. *J. Leukoc. Biol.* 91: 829–838; 2012.

Introduction

Vitamin D is known primarily for its role in calcium homeostasis and bone health [1]. However, more recently, an interest

in the nonskeletal functions of this steroid hormone is growing rapidly. This interest is mainly a result of the role of vitamin D on the immune system and its possible role in susceptibility to various infectious and autoimmune conditions [2–4].

The evidence linking vitamin D status as a potential environmental factor affecting autoimmune disease prevalence continues to accumulate [5, 6]. This hypothesis is based on several facts. First, certain autoimmune disorders, such as multiple sclerosis or inflammatory bowel disease, are more frequent in the Northern hemisphere, and this location clearly receives less sunlight [7–9], a key factor in vitamin D production. Second, the severity of some autoimmune disorders may also fluctuate seasonally, with exacerbations occurring after the winter period, when vitamin D levels are especially low [10]. Finally, it has also been suggested that vitamin D treatment may augment the immune response in immunocompromised patients [11] and may be therapeutically beneficial in certain Th1-mediated autoimmune disorders [6, 12, 13].

Circulating vitamin D levels clearly decline with age [14], and if a possible relationship between vitamin D and autoimmunity exists, vitamin D deficiency could be an easily treatable factor, which might explain the appearance of some age-restricted conditions. The impact of adequate vitamin D status is not only important in bone homeostasis or in the prevention and treatment of infectious and autoimmune conditions, but also, a recent result of a meta-analysis of randomized, controlled trials suggested that supplemental cholecalciferol (vitamin D) significantly reduces all-cause mortality [15].

Vitamin D has a profound impact on the immune system, acting as an immune modulator, preventing excessive expression of proinflammatory cytokines, and increasing the oxidative burst potential of macrophages [16, 17]. Furthermore, it stimulates the expression of potent antimicrobial peptides on different immune cell subtypes protecting the host from infec-

Abbreviations: 25OHD=25-hydroxy vitamin D, HC=healthy individuals, IFIMAV=Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, MFI=mean fluorescence intensity, PTH=parathyroid hormone, *r*=Spearman correlation coefficient

The online version of this paper, found at www.jleukbio.org, includes supplemental information.

1. Correspondence: Rheumatology Division, Hospital Universitario “Marqués de Valdecilla”, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Avda. Valdecilla s/n, 39008, Santander, Spain. E-mail: vmartinez@medynet.com

tions [18, 19]. Most of this information comes from studies done in animal models; in vivo human data are scarce.

Proinflammatory cytokine responses are mostly mediated through TLR activation. A total of 11 human TLRs has been described, although only the function of TLR1–9 has been characterized [20], and TLRs are expressed on a great variety of cells, particularly those of the innate immune system but also on T and B cells [21]. Thus, TLR2, TLR3, TLR5, and TLR9 act as costimulatory receptors of TCR-stimulated T lymphocytes [22]. Besides, TLR2, TLR4, TLR5, and TLR8 modulate the suppressive activity of regulatory T cells [23]. TLR1 has been described to be a ubiquitously expressed receptor, including B cells [24]. In addition, expression of TLR6, TLR7, TLR9, and TLR10 on B cells has been demonstrated as especially sensitive to the activation through the specific TLR9 ligand CpG oligodeoxynucleotides [25].

Besides the proinflammatory cytokines released after TLR activation, there are many other products with antimicrobial capacity, such as cathelicidins, which are widely conserved antimicrobial peptides produced by all mammalian species as part of the innate immune system. They have a broad activity against bacteria but also, are able to neutralize LPS, stimulate leukocyte chemotaxis, and promote angiogenesis [26]. Human cathelicidin is found in leukocyte and epithelial cell populations and also circulates in plasma [27]. The importance of these antimicrobial peptides comes from the fact that impairment of cathelicidin has been linked to increased susceptibility to and severity of infection [28, 29]. A key role of vitamin D in innate immunity is to maintain localized production of antibacterial cathelicidin following TLR activation of monocytes [18]. Furthermore, TLR activation of human macrophages up-regulates expression of the vitamin D receptor and the vitamin D-1-hydroxylase genes, leading to induction of the antimicrobial peptide cathelicidin and killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* [30].

Herein, we investigate in vivo the influence of age and vitamin D status on innate immune function in a large group of HC. Serum 25OHD levels decrease with age and are accompanied by a change in expression and defective function of certain TLRs, especially those involved in viral responses. Aging is also accompanied by less-specific modifications in innate immune function.

MATERIALS AND METHODS

Study subjects

The study included 71 HC without a previous history of chronic infectious, neoplastic, or autoimmune disease. HC were divided into three different groups according to age: 27 young (≤ 30 years, 26.8 ± 2.5), 23 middle age (31–59 years, 44.1 ± 7.9), and 21 elderly (≥ 60 years, 70.6 ± 8.4). All of the HC gave written, informed consent, and the study was approved by the regional Ethics Committee.

Determination of circulating 25OHD

More than three-fourths of the individuals was studied during the interval between April and September, and the distribution of study individuals during the year was very similar in the different study groups (85% of young HC, 81.8% of the middle age, and 78.9% of the elderly HC). Fasting

venous blood samples, for general biochemical analysis and specific determinations, were obtained after 30 min of supine rest from an antecubital vein. Samples were centrifuged immediately, and serum was stored at -80°C until assayed. Total intact PTH was measured by a immunochemiluminometric automated assay (Liaison, DiaSorin, Stillwater, MN, USA). The sensitivity of the PTH assay is 1 pg/ml. Intra- and interassay coefficients of variation are 2.6% and 5.8%, respectively. Normal values are <65 pg/ml. 25OHD was measured by radioimmunoassay after extraction (DiaSorin). Minimum detectable concentration is estimated to be 1.5 ng/ml. Intra- and interassay precisions are 9.4% and 10.8%, respectively. Normal reference range levels for 25OHD are 20–60 ng/ml.

TLR protein expression in PBMCs

The cell-surface expression of TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, and TLR6 and the intracellular expression of TLR3, TLR7, TLR8, and TLR9 were assessed on distinct PBMC subpopulations (T cells, B cells, and monocytes) by flow cytometry. Cells collected into sodium heparin tubes were incubated with FITC- or PE-conjugated anti-human CD19, PercP-conjugated anti-human CD3, and allophycocyanin-conjugated anti-human CD14 to identify B cells, T cells, and monocytes, respectively, and with FITC- or PE-conjugated anti-human TLR (TLR1, TLR2, TLR4; eBioscience, San Diego, CA, USA) or FITC or PE mouse IgG2a isotype control for 20 min in the dark. Then, the red blood cells were lysed with FACS lysing solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) for 10 min. After washing, the cells were resuspended in 1% paraformaldehyde. Staining for TLR5 and TLR9 expression (Acris Antibodies, Germany; and eBioscience, respectively) was performed by permeabilizing with FACS permeabilizing solution (BD Biosciences) and staining with fluorochrome-conjugated anti-human TLR or mouse IgG2a isotype control. To determine intracellular expression of TLR3, TLR6, TLR7, and TLR8 (Acris Antibodies) after lysing, blocking with 2% human-pooled serum for 20 min at 4°C in the dark, and washing, supplemented with 0.5% BSA, cells were permeabilized and intracellularly stained with primary antibodies for 30 min, followed by FITC-conjugated secondary antibodies for another 30 min. Expression of TLRs was gated and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences) as MFI using CellQuest Pro software. Data were presented as relative MFI (MFI of TLR/MFI of isotype control).

TLR function assessment in circulating monocytes

Cells collected in sodium heparin tubes were polyclonally stimulated for 18 h with different agonists for human TLR1–9 (InvivoGen, San Diego, CA, USA) in the presence or absence of Brefeldine A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in polypropylene tubes. As a negative control, cells were incubated in identical medium without stimulus. After culture, cells were stained with FITC-conjugated anti-human CD14 (BD Biosciences) to identify the monocyte population for 20 min in the dark. Then, the red blood cells were lysed with FACS lysing solution (BD Biosciences) for 10 min. After washing, cells were permeabilized with FACS permeabilizing solution (BD Biosciences) and intracellularly stained with PE-labeled mAb against cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6; BD Biosciences) and analyzed by flow cytometry. Percentage of intracellular cytokine-producing monocytes was analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences).

Determination of circulating LL-37 (cathelicidin)

Human LL-37 was measured by ELISA based on the sandwich principle (Hycult Biotech, The Netherlands). Sensitivity was 0.1 ng/ml. Intra- and interassay precision was 6% and 6.2%, respectively.

Statistical analysis

All of the statistical analysis of data was carried out using SPSS 15.0 software (Chicago, IL, USA). The statistical comparisons of data between different age groups were performed using the Mann-Whitney U test. Relationship among the different variables of the study was determined by calculating the Spearman correlation coefficient. Because the values of most dependent numerical variables were non-normally distributed, and log

transformation also did not result in normal distributions, we dichotomize all of these variables ($\leq$ median=0; $>$ median=1) for the multivariate analyses. As the response variables (TLR expression and cytokine levels) were dichotomous, and there is more than one independent variable (covariates), a multivariate analysis should be used [31, 32]. Thus, we used unconditional logistic regression to estimate odds ratios and 95% confidence intervals associated to aging (in years) and levels of 25OHD (ng/ml), controlling for gender (women reference group) and seasonality (April–September reference group). Both methods were used in all cases. To determine which independent variables in the model were significantly related to the outcome variables (TLR expression and cytokine levels), we used the Wald test. Such a test can be useful to fit a reduced model containing only variables thought to be significant. To know how effective the model was, we described the outcome variable. This is referred to as its goodness-of-fit, and we used the Hosmer-Lemeshow test [31] and R^2 index defined by Nagelkerke [33]. Differences were considered significant when P values were <0.05 .

RESULTS

Circulating 25OHD levels correlate with age and are in the lower range of normality in most healthy subjects

As shown in **Fig. 1A**, 25OHD levels had a significant inverse correlation with age, whereas circulating PTH levels showed a significant positive correlation with age in the whole group of HC. Besides, serum levels of PTH and 25OHD showed a significant negative correlation ($r = -0.340$; $P < 0.007$). Levels of 25OHD were decreased significantly in middle age and aged HC compared with the younger group (**Fig. 1B**). Overall, 5% of the young (age range: 20–30 years), 21.7% of the middle age (age range: 31–59), and 31.6% of the elderly (age range: 60–86) HC had 25OHD levels lower than 20 ng/ml, which is considered the normal value at our center.

Despite the fact that the study was done in a southern European country, middle age and aged HC did not show significant differences in 25OHD levels, according to the season of the year. Only young HC had a significant variation in circulat-

ing 25OHD levels that were significantly higher during the sunny season (Supplemental Fig. 1).

Age is associated with a defective function of several TLRs

TLR expression was assessed on subpopulations of PBMCs by flow cytometry (Supplemental Fig. 2). Age showed a significant positive correlation with MFI expression of TLR1 on T cells ($r = 0.318$; $P = 0.040$) and monocytes ($r = 0.398$; $P = 0.009$), which remained significant in the regression model only for monocytes. Multivariate regression analysis also showed a positive correlation of age with MFI expression of TLR2 ($P = 0.002$) on monocytes (Supplemental Table 1).

TLR function was assessed by stimulating PBMCs with specific ligands [34] and measuring the production of intracellular cytokines by flow cytometry (Supplemental Fig. 3). As shown in **Table 1**, age showed a significant negative correlation with the production of proinflammatory cytokines, mainly TNF- α and IL-6, after specific activation of several TLRs. In the multivariate regression analysis, these results were confirmed for TLR4 and TLR8 (Supplemental Table 2).

Circulating 25OHD levels are associated with TLR7 expression and function

As shown in **Fig. 2A**, 25OHD levels showed a significant negative correlation with MFI expression of TLR7 in B cells ($r = -0.395$; $P = 0.023$) and monocytes ($r = -0.429$; $P = 0.013$) and also a clear tendency in T cells ($r = -0.350$; $P = 0.054$). A significant negative correlation with MFI expression was also found for TLR5 expression on T cells ($r = -0.339$; $P = 0.037$) and TLR8 expression in monocytes ($r = -0.365$; $P = 0.037$). 25OHD levels showed a significant positive correlation with the production of the three proinflammatory cytokines after specific activation of TLR7 with imiquimod (**Fig. 2B**). No significant correlation was found for any of the other TLRs. The association of 25OHD levels with TLR7 expression and func-

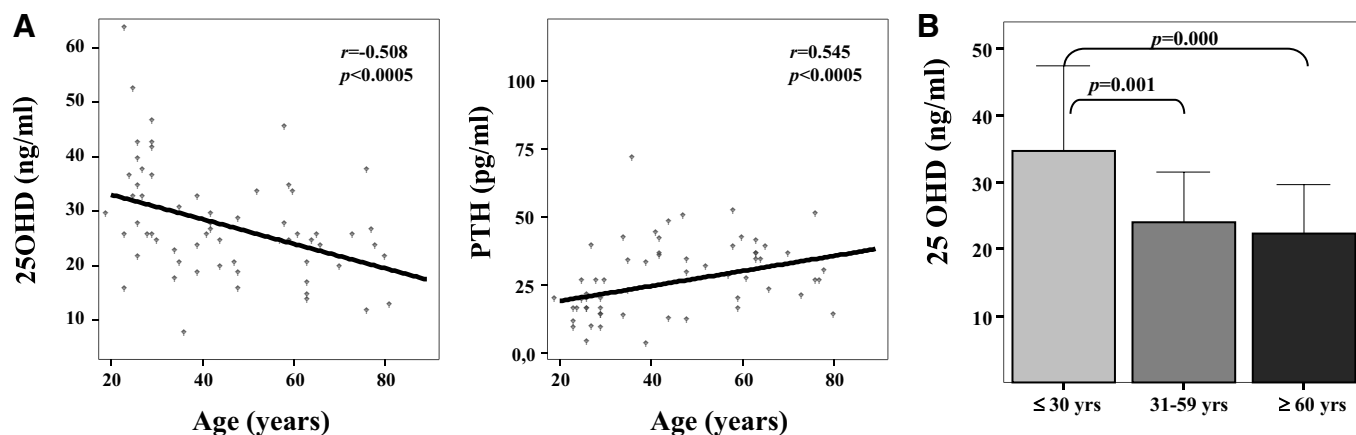


Figure 1. Influence of age on 25OHD and PTH levels in HC. (A) Correlation between circulating 25OHD and PTH levels with age. Dot plots of correlation between 25OHD and age (left) and between PTH and age (right) are shown. The Spearman correlation coefficient and the level of significance are shown in the upper-right corner of each plot. The fit line is also displayed. (B) Circulating 25OHD levels in HC within the three groups of age, considered in the present study: young (age range: 20–30), middle (age range: 31–59), and elderly (age range: 60–86).

TABLE 1. Correlation between Age and TLR Function in Healthy Subjects

	Δ IL-1 β		Δ TNF- α		Δ IL-6	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
TLR1	−0.239	0.128	−0.231	0.146	−0.283	0.069
TLR2	−0.320	0.127	−0.515	0.010	−0.425	0.039
TLR3	0.136	0.442	−0.250	0.155	−0.008	0.965
TLR4	−0.221	0.170	−0.403	0.010	−0.270	0.092
TLR5	−0.379	0.062	−0.517	0.008	−0.368	0.070
TLR6	−0.240	0.130	−0.041	0.799	−0.385	0.013
TLR7	−0.200	0.203	−0.113	0.478	−0.194	0.219
TLR8	−0.170	0.288	−0.327	0.037	−0.179	0.263

r, Spearman ρ ; *P*, significance level.

tion was confirmed in the multivariate regression analysis (Table 2). As shown in this table, all Hosmer-Lemeshow tests [31] were not significant, suggesting that the models fit well to the data. Besides, R^2 , defined by Nagelkerke [34], ranged from 0.4 to 0.6, indicating that the percentage of the variation in the dependent variable, which could be explained by the predictors in the models, was 40–80%. Finally, the accuracy of predictions was high, with 70–80% of correct classification.

As the most consistent results in expression and function were found for TLR7, the results were analyzed in the different age groups, according to the sunny season distribution. No significant differences on MFI expression in the different PBMC types were found (Fig. 3A). However, and despite a lack of significant differences in 25OHD levels (Supplemental Fig. 1), aged, HC showed a significant decrease in TLR7 function during the dark season (Fig. 3B).

Circulating levels of cathelicidin decrease with age and correlate with circulating 25OHD levels

As shown in Fig. 4A, cathelicidin levels decreased with age and also showed a positive correlation with circulating 25OHD levels (Fig. 4B). Circulating cathelicidin levels were negatively correlated with the expression of several TLRs in different PBMC subpopulations (Table 3). However, no correlation with TLR function was observed (data not shown).

DISCUSSION

Although the role of the physiologic aging process and vitamin D status on innate immunity has emerged as a main focus of interest, little information is available about this topic, especially in humans [35–37]. In the present work, we investigate in vivo the influence of age and vitamin D status on innate immune function in a relatively large group of HC. The aging process in HC is accompanied by changes in the expression and function of certain TLRs. Furthermore, serum 25OHD levels decrease with age and are accompanied by a change in expression and defective function of certain TLRs, especially those involved in viral response.

Our results confirmed previous information and showed that HC usually have circulating levels of 25OHD in the lower

limit of normality [38]. Young HC had higher levels of circulating vitamin D, and as expected [39], vitamin D levels were higher during the sunny season compared with the dark season. However, these differences were only significant for the young, healthy population.

The effects of aging on innate immune responses remain incompletely understood, particularly in humans [40–43]. Aging affects every innate immune cell, including changes in cell numbers and function. Defects in the function of some cells are intrinsic, whereas for other cells, defects are extrinsic from the interactions with other cell types or environmental factors, which are altered in aging [41, 42]. Abnormal function contributes to worsened outcomes after injury or infection and leads to some diseases observed in the elderly [44]. Most studies done on innate immunity during the aging process have been done in animal models [45]. In these models, aging was associated with dysregulation in DC activation and subset differentiation and may represent one of the factors contributing to the decline in immune function with age [46, 47]. It has been suggested that the differential age-related changes in the expression of certain TLRs on leukocyte populations from long-lived and younger mice could contribute to a different age-related immune remodeling [48]. In this regard, aged mice and potentially, elderly humans are more susceptible to infections because of a priming effect of chronic inflammation and TLR dysfunction [45, 49]. However, most of the studies on TLR expression and function in aged humans are mainly focused on LPS stimuli through TLR4 and with contradictory results [50].

In the present study, we demonstrate that the aging process in HC is accompanied by changes in the expression and function of certain TLRs. Although the expression of certain TLRs, mainly 1, 2, and 5, was positively correlated with age, a more interesting finding is the negative correlation of age with function, in agreement with previous data [43]. Such a finding was also found by other authors for TLR1, but not TLR2 [51]. Pro-inflammatory cytokine response after specific stimuli was clearly decreased in aged, HC for TLRs involved in bacterial defense but also for intracellular TLR8. We found no significant changes for TLR9 expression or function as compared with others [52]. Whether this decrease in TLR function is a result of the aging process itself or other factors, such as ge-

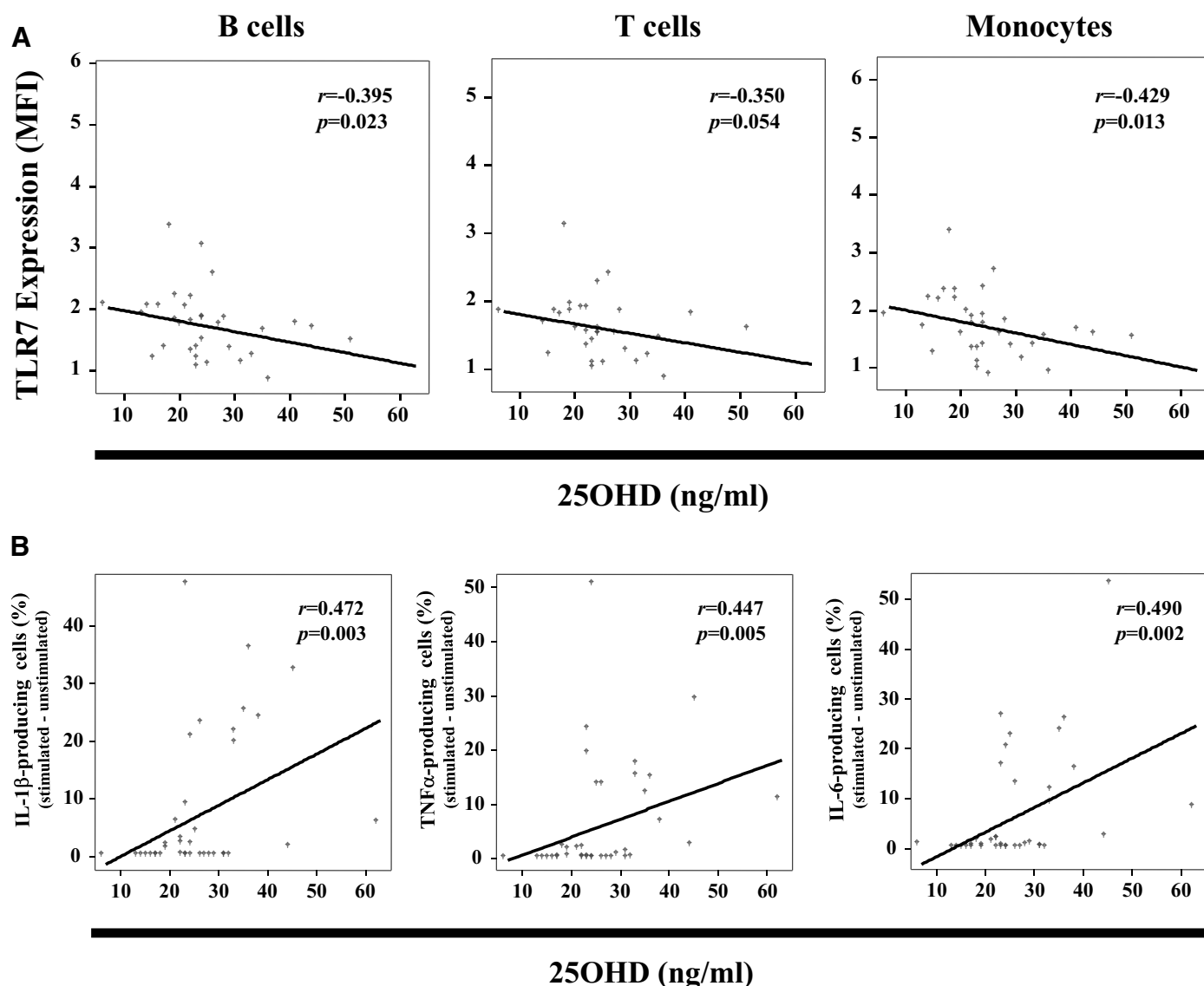


Figure 2. Correlation between circulating 25OHD levels and TLR expression and function in HC. (A) Dot plots showing the correlation between TLR expression on subpopulations of PBMCs (B cells, T cells, and monocytes) and 25OHD in the whole population of HC. TLR expression was assessed by flow cytometry and expressed as MFI. The Spearman correlation coefficient and the level of significance are shown in the upper-right corner of each plot. The fit line is also displayed. (B) Correlation between circulating 25OHD levels and TLR7 response to specific agonist on circulating monocytes. The TLR7 response was determined by the production of intracellular proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) by flow cytometry. Such a production was measured as the difference of the percentage of cells expressing the cytokine after in vitro stimulus minus those without stimulus.

netics, gender, neuroendocrines, or environmental factors, remains to be investigated and should be confirmed in further studies. Furthermore, the impact of these findings on susceptibility or severity of the aged population to infectious, autoimmune, or neoplastic disorders should also be assessed in the future. However, it is logical to anticipate that as a consequence of impaired TLR function in the aging immune system, the mechanisms of defense of aged subjects would also be impaired [53].

One of the most striking findings of the present study was the significant association of 25OHD levels with TLR7 expres-

sion and function. On one side, circulating 25OHD showed a negative correlation with MFI expression of TLR7 in different PBMC subpopulations. More importantly, 25OHD levels showed a significant positive correlation with the production of proinflammatory cytokines after activation of TLR7 with a specific agonist. The association of 25OHD levels with TLR7 expression and function was robust and confirmed in the multivariate regression analysis. Interestingly enough, aged, HC showed a significant decrease in TLR7 function during the dark season, and this fact may have clear epidemiologic and clinical consequences.

TABLE 2. Multivariate Regression Analysis of Relationships among Age, 25OHD Levels, Gender, and TLR7 Expression and Function

TLR 7 Function		β	SE	Sig.	OR	C.I. 95.0%
Δ IL-1 β	Age	0.015	0.033	0.944	1.015	0.951–1.083
	Vit. D	0.156	0.074	0.020	1.169	1.012–1.350
	Gender	0.578	0.947	0.256	1.782	0.278–11.401
	Season	–21.713	14,485.7	0.999	0.000	–
	Constant	–4.560	2.457	0.061	0.010	
Model evaluation: –2LL: 29.745 R^2 : 0.572 HL: 6.897 ($P=0.440$) %CC: 80.6						
		β	SE	Sig.	OR	C.I. 95.0%
Δ TNF- α	Age	0.045	0.038	0.234	1.046	0.971–1.126
	Vit. D	0.188	0.083	0.024	1.207	1.025–1.421
	Gender	–0.495	0.990	0.617	0.610	0.088–4.234
	Season	–22.176	13,876.9	0.999	0.000	–
	Constant	–6.031	2.800	0.031	0.002	
Model evaluation: –2LL: 27.55 R^2 : 0.617 HL: 8.897 ($P=0.260$) %CC: 72.2						
		β	SE	Sig.	OR	C.I. 95.0%
Δ IL-6	Age	0.039	0.033	0.236	1.040	0.975–1.110
	Vit. D	0.123	0.060	0.041	1.130	1.005–1.271
	Gender	–0.424	0.853	0.619	0.655	0.123–3.484
	Season	–2.702	1.310	0.039	0.067	0.005–0.874
	Constant	–4.009	2.279	0.079	0.018	
Model evaluation: –2LL: 35.722 R^2 : 0.425 HL: 6.218 ($P=0.515$) %CC: 77.8						
TLR 7 Expression		β	SE	Sig.	OR	C.I. 95.0%
B cells	Age	0.045	0.029	0.119	0.956	0.903–1.012
	Vit. D	–0.167	0.073	0.023	0.846	0.733–0.977
	Gender	1.457	1.101	0.186	4.293	0.496–37.139
	Season	–1.785	1.289	0.166	0.168	0.013–2.097
	Constant	5.792	2.495	0.020	327.632	
Model evaluation: –2LL: 31.351 R^2 : 0.382 HL: 7.391 ($P=0.495$) %CC: 73.3						
		β	SE	Sig.	OR	C.I. 95.0%
T cells	Age	–0.076	0.035	0.029	0.927	0.866–0.992
	Vit. D	–0.092	0.056	0.101	0.912	0.817–1.018
	Gender	0.623	1.012	0.538	1.865	0.256–13.565
	Season	–2.185	1.507	0.147	0.112	0.006–2.157
	Constant	5.797	2.435	0.017	329.344	
Model evaluation: –2LL: 33.104 R^2 : 0.392 HL: 10.499 ($P=0.232$) %CC: 81.3						
		β	SE	Sig.	OR	C.I. 95.0%
Monocytes	Age	–0.051	0.032	0.111	0.951	0.893–1.012
	Vit. D	–0.219	0.094	0.020	0.803	0.668–0.965
	Gender	0.651	1.177	0.580	1.917	0.191–19.268
	Season	–3.092	1.548	0.046	0.045	0.002–0.944
	Constant	7.952	3.079	0.010	2840.700	
Model evaluation: –2LL: 28.739 R^2 : 0.515 HL: 6.920 ($P=0.545$) %CC: 81.3						

Sig., Significance; OR, odds ratio; C.I., confidence interval; –2LL, –2-log likelihood; R^2 , as defined by Nagelkerke [33]; HL, Hosmer-Lemeshow test [31]; P, p value; %CC, percent of correct classification.

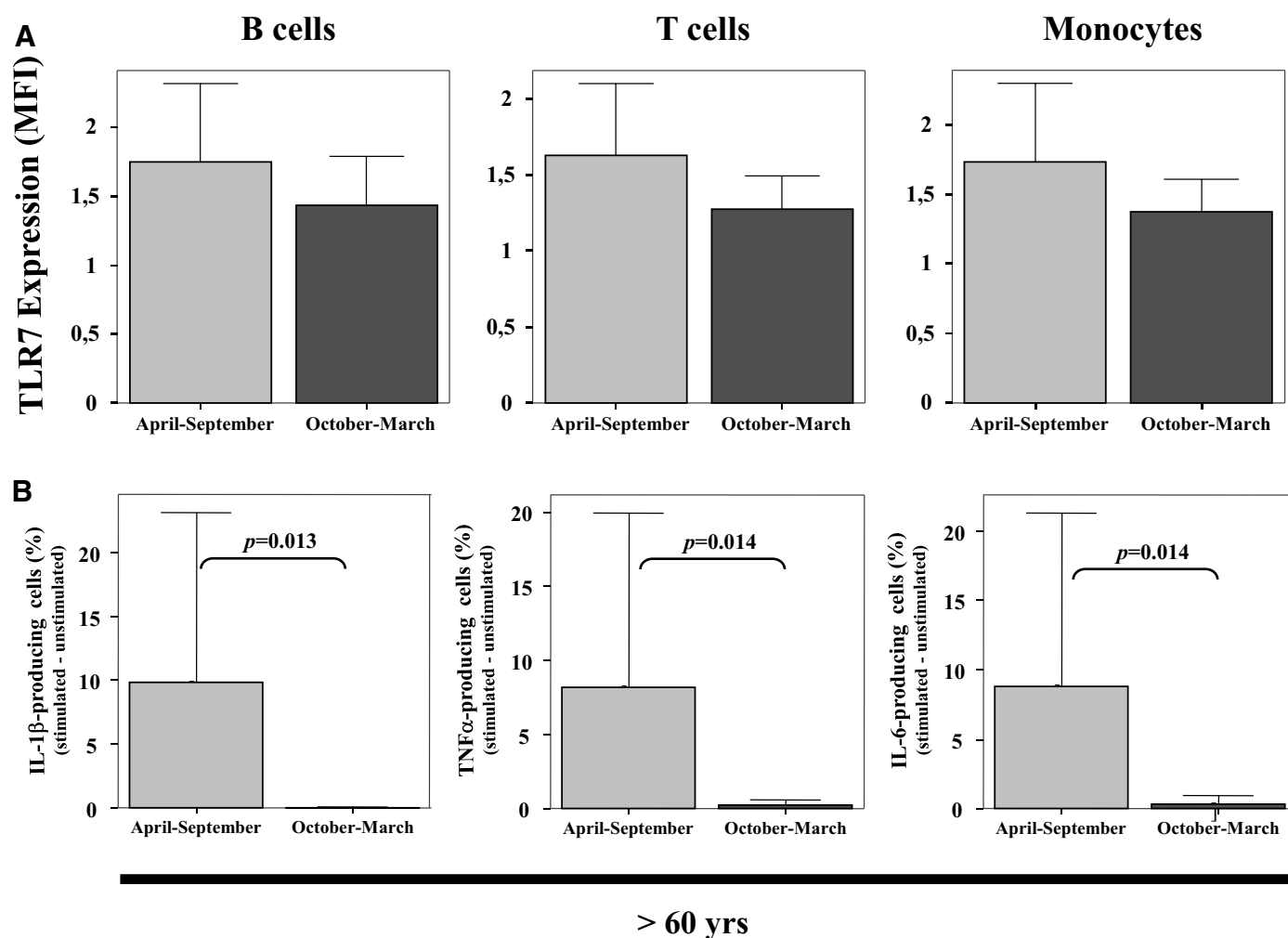


Figure 3. TLR7 expression and function according to the sunny seasons in HC. (A) TLR7 expression in the different PBMC subsets, according to the sunny seasons in all of the HC included in the study. The period of time considered sunny was from April to September, whereas the dark season was from October to March. TLR expression was assessed by flow cytometry and expressed as MFI. (B) TLR7 function in aged HC, according to the sunny seasons. The TLR7 response was determined by the production of intracellular, proinflammatory cytokines (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) by flow cytometry. Such a production was measured as the difference of the percentage of cells expressing the cytokine after in vitro stimulus minus those without stimulus.

The effect of vitamin D status on innate immune function has been studied more in detail for antibacterial components of the immune system [54]. TLR activation of human macrophages up-regulated expression of vitamin D receptor and vitamin D-hydroxylase genes, leading to the induction of cathelicidin and killing of intracellular mycobacteria [52]. In contrast to the stimulation of antibacterial responses by vitamin D, its impact on viral infection is much less known [55]. However the ability of viruses to activate TLR-induced pathways similar to those activated by mycobacteria and bacteria suggests that induction of intracrine immune responses to vitamin D may also promote antiviral activity [55].

Ultraviolet exposure determines the production of vitamin D and varies through the different seasons of the year. If vitamin D status affects the innate immune system, this fact might explain why some diseases are clearly season-related. It has

been demonstrated recently that the prevalence of upper-respiratory tract infections increased significantly, regardless of season of the year, as the serum 25OHD dropped. Furthermore, the prevalence of upper-respiratory tract infections was significantly greatest during the winter months, when 25OHD were at their lowest [56]. As TLR7 is essential for influenza viral recognition and inflammatory cytokine response by innate immune cells [57], the results presented here fit with the hypothesis that vitamin D insufficiency might be a key factor to explain the epidemiology of some viral infections such as influenza [58]. In fact, treatment with vitamin D supplements prevents the development of colds or flu [58, 59]. In the present study, circulating 25OHD levels were positively correlated with the function of TLR7. These findings may explain why certain viral infections are less likely to occur during the summer months. Furthermore, as we reported recently, TLR7 dysfunc-

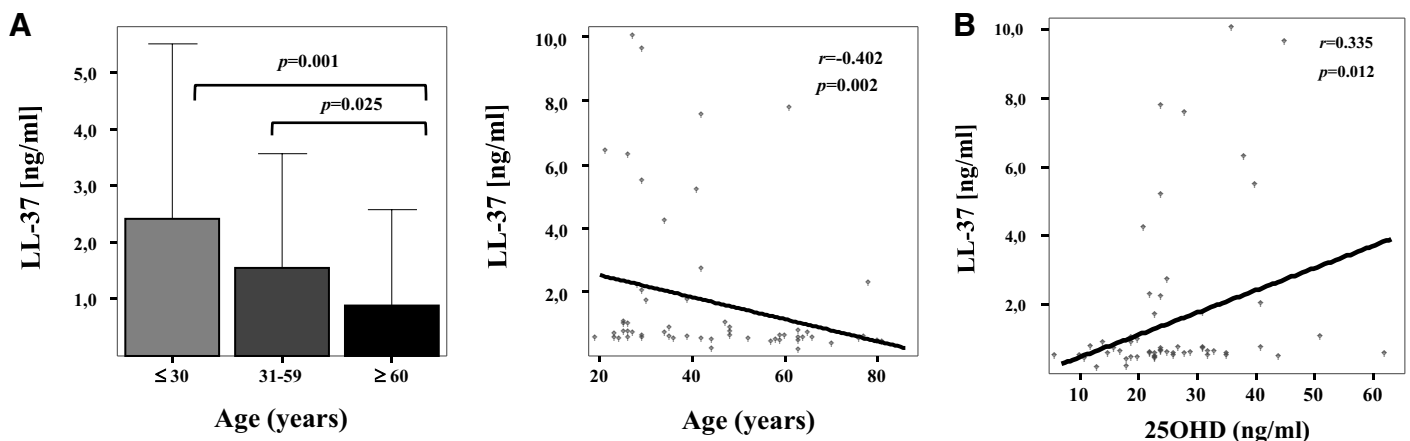


Figure 4. Circulating cathelicidin (LL-37) levels in HC. (A) Circulating cathelicidin levels decrease with age. Levels were significantly higher in young, HC than in middle age and aged subjects (left). As a consequence, there was a significant negative correlation coefficient between circulating levels of cathelicidin and age (right). (B) Dot plot showing the correlation between circulating cathelicidin levels and 25OHD levels in HC. The Spearman coefficient correlation and the level of significance are shown in the upper-right corner.

tion may also be a factor that is predisposed to or the consequence of some age-restricted inflammatory conditions [34].

It has been shown that vitamin D down-regulates monocytes TLR2 and TLR4 expression [60, 61]. These in vitro results have also been confirmed for some intracellular TLRs, such as TLR9 [61]. More recently, it has been shown that higher levels of vitamin D during summer are also associated with down-regulation of the cytokine response through diminished surface expression of some PRRs, such as TLR2 and TLR4 [62]. In the present study and although we did find a decrease in the expression of certain TLRs, circulating 25OHD levels were positively correlated with the function of TLR7. However, the methodology and therefore, the results of the present study cannot be compared with other ones.

Among the different bactericidal mediators released through TLR activation, cathelicidins are the best studied. Although cathelicidin gene expression is vitamin D receptor-dependent [30], little is known about the association of vitamin D status and plasma cathelicidin levels in HC. In this regard, a recent, prospective study [37] has shown a correlation between 25OHD levels and plasma cathelicidin in HC and changes in cathelicidin levels after high-dose ergocalciferol supplementa-

tion. However, another study by Adams et al. [18] did not show such a correlation, although this analysis was limited to elderly patients with established bone disease. In the present study, we confirm the correlation of circulating cathelicidin levels with 25OHD levels, and more importantly, we show for the first time that plasma cathelicidin decreases with age in HC. Furthermore, we found a negative correlation with the expression of several TLRs, mainly involved in antibacterial defense. The effects of appropriate vitamin D supplementation on TLR expression and function, as well as in other components of the innate and adaptive immune system, should be addressed in HC and also in patients with different conditions.

The importance of studies such as ours comes from the fact that vitamin D insufficiency is a clinical problem of global proportions, and this vitamin D insufficiency has been linked, not only to an increase in susceptibility and severity of infectious, neoplastic, and autoimmune disorders but also to an increase in overall mortality [6, 63, 64]. Here, we have shown that age and vitamin D status have a clear impact in innate immune system functioning. In contrast with age, which is not a modifiable factor, vitamin D status is a simple and safe factor that we can modify with an easy and cheap intervention. Theoretically,

TABLE 3. Correlation between Circulating Cathelicidin Levels and TLR Expression in Healthy Subjects

	B cells		T cells		Monocytes	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
TLR1	-0.539	0.001	-0.456	0.006	-0.267	0.122
TLR2	-0.270	0.117	-0.163	0.349	-0.321	0.018
TLR3	-0.305	0.096	-0.257	0.178	-0.442	0.013
TLR4	-0.516	0.001	-0.299	0.081	-0.148	0.285
TLR5	-0.006	0.974	0.028	0.874	-0.170	0.338
TLR6	-0.383	0.033	-0.304	0.109	-0.491	0.005
TLR7	0.091	0.625	0.198	0.303	0.160	0.391
TLR8	-0.130	0.487	-0.211	0.349	-0.097	0.605

pharmacologic doses of vitamin D may produce enough impact in the immune system functioning to prevent or to treat some infectious, autoimmune, or neoplastic disorders, but such a theory waits for further investigations.

AUTHORSHIP

L.A-R. contributed to sample collection and preparation, flow cytometry and culture studies, data and bioinformatics analyses, and manuscript preparation. M.L-H. contributed to study design, laboratory experiments, data analyses, and manuscript preparation and editing. M.G-U. contributed to vitamin D and cathelicidin measurements and manuscript editing. J.A.A. participated in the design of the study, analysis and discussion of results, and editing of the manuscript. P.M.C. participated in the design of the study and in the statistical analysis and discussion of results. V.M.M-T. contributed to study design, patient recruitment, clinical assessments, data analysis, and manuscript writing and editing. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundación Marqués de Valdecilla- IFIMAV, Fondo de Investigación Sanitaria (PI050475 and PI080098), and Fundación Mutua Madrileña. L.A-R. was supported by a grant for Research Aid from Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV. We are especially grateful to Iñaki Beares and Marta Gonzalez (both supported by a grant from Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV) and Carolina Santa Cruz (supported by a grant for Research Aid from Schering-Plough, Spain) for their helpful technical assistance. We thank all of the controls included in the present study.

REFERENCES

- Holick, M. F. (2004) Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **80** (Suppl.), 1678S–1688S.
- Yamshchikov, A. V., Desai, N. S., Blumberg, H. M., Ziegler, T. R., Tangpricha, V. (2009) Vitamin D for treatment and prevention of infectious diseases: a systematic review of randomized controlled trials. *Endocr. Pract.* **2**, 1–29.
- Mora, J. R., Iwata, M., von Andrian, U. H. (2008) Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 685–698.
- Cutolo, M., Plebani, M., Shoenfeld, Y., Adorini, L., Tincani, A. (2011) Vitamin D endocrine system and the immune response in rheumatic diseases. *Vitam. Horm.* **86**, 327–351.
- Cantorna, M. T., Mahon, B. D. (2004) Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp. Biol. Med.* **229**, 1136–1142.
- Arnson, Y., Amital, H., Shoenfeld, Y. (2007) Vitamin D and autoimmunity: new aetiological and therapeutic considerations. *Ann. Rheum. Dis.* **66**, 1137–1142.
- Shapira, Y., Agmon-Levin, N., Shoenfeld, Y. (2010) Geoepidemiology of autoimmune rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **6**, 468–476.
- Raghuwanshi, A., Joshi, S. S., Christakos, S. (2008) Vitamin D and multiple sclerosis. *J. Cell. Biochem.* **105**, 338–343.
- Vagianos, K., Bector, S., McConnell, J., Bernstein, C. N. (2007) Nutrition assessment of patients with inflammatory bowel disease. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* **31**, 311–319.
- Shoenfeld, N., Amital, H., Shoenfeld, Y. (2009) The effect of melanism and vitamin D synthesis on the incidence of autoimmune disease. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **5**, 99–105.
- Antonen, J. A., Hannula, P. M., Pyhälä, R., Saha, H. H., Ala-Houhala, I. O., Pasternack, A. I. (2000) Adequate seroresponse to influenza vaccination in dialysis patients. *Nephron* **86**, 56–61.
- Agmon-Levin, N., Blank, M., Zandman-Goddard, G., Orbach, H., Meroni, P. L., Tincani, A., Doria, A., Cervera, R., Miesbach, W., Stojanovich, L., Barak, V., Porat-Katz, B. S., Amital, H., Shoenfeld, Y. (2011) Vitamin D: an instrumental factor in the anti-phospholipid syndrome by inhibition of tissue factor expression. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 145–150.
- Souberbielle J. C., Body J. J., Lappe J. M., Plebani M., Shoenfeld Y., Wang T. J., Bischoff-Ferrari H. A., Cavalier E., Ebeling P. R., Fardellone P., Gandini S., Gruson D., Guérin A. P., Heickendorff L., Hollis B. W., Ish-Shalom S., Jean G., von Landenberg P., Largura A., Olsson T., Pierrot-Deseilligny C., Pilz S., Tincani A., Valcour A., Zittermann A. (2010) Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: recommendations for clinical practice. *Autoimmun. Rev.* **9**, 709–715.
- Pérez-López, F. R., Chedraui, P., Fernández-Alonso, A. M. (2011) Vitamin D and aging: beyond calcium and bone metabolism. *Maturitas* **69**, 27–36.
- Autier, P., Gandini, S. (2007) Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch. Intern. Med.* **167**, 1730–1737.
- Cannell, J. J., Vieth, R., Umhau, J. C., Holick, M. F., Grant, W. B., Madronich, S., Garland, C. F., Giovannucci, E. (2006) Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol. Infect.* **134**, 1129–1140.
- Von Essen, M. R., Kongsbak, M., Schjerling, P., Olgaard, K., Odum, N., Geisler, C. (2010) Vitamin D controls T cell antigen receptor signaling and activation of human T cells. *Nat. Immunol.* **11**, 344–349.
- Adams J. S., Ren S., Liu P. T., Chun R. F., Lagishetty V., Gombart A. F., Borregaard N., Modlin R. L., Hewison M. (2009) Vitamin D-directed rheostatic regulation of monocyte antibacterial responses. *J. Immunol.* **182**, 4289–4295.
- Yamshchikov, A. V., Kurbatova, E. V., Kumari, M., Blumberg, H. M., Ziegler, T. R., Ray, S. M., Tangpricha, V. (2010) Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis. *Am. J. Clin. Nutr.* **92**, 603–611.
- Kawai, T., Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384.
- Kabelitz, D. (2007) Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 39–45.
- Xu, D., Komai-Koma, M., Liew, F. Y. (2005) Expression and function of Toll-like receptor on T cells. *Cell. Immunol.* **233**, 85–89.
- Sutmoller R, Garritsen A, Adema, G. J. (2007) Regulatory T cells and Toll-like receptors: regulating the regulators. *Ann. Rheum. Dis.* **66** (Suppl. 3), iii91–5.
- Muzio, M., Polentarutti, N., Bosisio, D., Prahlanad, M. K., Mantovani, A. (2000) Toll-like receptors: a growing family of immune receptors that are differentially expressed and regulated by different leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 450–456.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, H., Hartmann, G. (2002) Quantitative expression of Toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **168**, 4531–4537.
- Adams, J. S., Hewison, M. (2010) Update in vitamin D. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 471–478.
- Sørensen, O., Cowland, J. B., Askaa, J., Borregaard, N. (1997) An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *J. Immunol. Methods* **206**, 53–59.
- Bals, R., Weiner, D. J., Mosconi, A. D., Meegalla, R. L., Wilson, J. M. (1999) Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect. Immun.* **67**, 6084–6089.
- Jeng, L., Yamshchikov, A. V., Judd, S. E., Blumberg, H. M., Martin, G. S., Ziegler, T. R., Tangpricha, V. (2009) Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J. Transl. Med.* **7**, 28.
- Liu P. T., Stenger S., Li H., Wenzel L., Tan B. H., Krutzik S. R., Ochoa M. T., Schaubert J., Wu K., Meinken C., Kamen D. L., Wagner M., Bals R., Steinmeyer A., Zügel U., Gallo R. L., Eisenberg D., Hewison M., Hollis B. W., Adams J. S., Bloom B. R., Modlin R. L. (2006) Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **311**, 1770–1773.
- Hosmer, D. W., Lemeshow, S. (2000) *Applied Logistic Regression*, 2nd ed., Wiley, New York, NY, USA.
- Menard, S. (2001) *Applied logistic regression analysis. Sage University Paper Series on Quantitative Applications in the Social Sciences*, 07–106. Sage, Thousand Oaks, CA, USA.
- Nagelkerke, N. J. D. (1991) A note on general definition of the coefficient of determination. *Biometrika* **78**, 691–692.
- Álvarez Rodríguez L., López-Hoyos M., Mata C., Fontalba A., Calvo Alen J., Marín M. J., Fernández-Luna J. L., Agüero Balbín J., Aranzamendi Zalduende M., Blanco R., Martínez-Taboada V. M. (2011) Expression and function of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1677–1683.

35. Walker, V. P., Zhang, X., Rastegar, I., Liu, P. T., Hollis, B. W., Adams, J. S., Modlin, R. L. (2011) Cord blood vitamin D status impacts innate immune responses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 1835–1843.
36. Hertting O., Holm Å., Luthje P., Brauner H., Dyrda R., Jonasson A. F., Wiklund P., Chromek M., Brauner A. (2010) Vitamin D induction of the human antimicrobial peptide cathelicidin in the urinary bladder. *PLoS One* **5**, e15580.
37. Bhan, I., Camargo Jr., C. A., Wenger, J., Ricciardi, C., Ye, J., Borregaard, N., Thadhani, R. (2011) Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and human cathelicidin in healthy adults. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 1302–1304.
38. Mata-Granados, J. M., Luque de Castro, M. D., Quesada Gomez, J. M. (2008) Inappropriate serum levels of retinol, α -tocopherol, 25 hydroxyvitamin D3 and 24,25 dihydroxyvitamin D3 levels in healthy Spanish adults: simultaneous assessment by HPLC. *Clin. Biochem.* **41**, 676–680.
39. Rodríguez Sangrador, M., Beltrán de Miguel, B., Cuadrado Vives, C., Moreiras Tuny, O. (2010) Influence of sun exposure and diet to the nutritional status of vitamin D in adolescent Spanish women: the five countries study (OPTIFORD Project). *Nutr. Hosp.* **25**, 755–762.
40. Shaw, A. C., Panda, A., Joshi, S. R., Qian, F., Allore, H. G., Montgomery, R. R. (2011) Dysregulation of human Toll-like receptor function in aging. *Ageing Res. Rev.* **10**, 346–353.
41. Agarwal, S., Busse, P. J. (2010) Innate and adaptive immunosenescence. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **104**, 183–190.
42. Weiskopf, D., Weinberger, B., Grubeck-Loebenstein, B. (2009) The aging of the immune system. *Transpl. Int.* **22**, 1041–1050.
43. Panda, A., Arjona, A., Sapey, E., Bai, F., Fikrig, E., Montgomery, R. R., Lord, J. M., Shaw, A. C. (2009) Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. *Trends Immunol.* **30**, 325–333.
44. Kovacs, E. J., Palmer, J. L., Fortin, C. F., Fülöp Jr., T., Goldstein, D. R., Linton, P. J. (2009) Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol.* **30**, 319–324.
45. Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J., Sambhara, S. (2002) Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging. *J. Immunol.* **169**, 4697–4701.
46. Wong, C. P., Magnusson, K. R., Ho, E. (2010) Aging is associated with altered dendritic cells subset distribution and impaired proinflammatory cytokine production. *Exp. Gerontol.* **45**, 163–169.
47. Stout-Delgado, H. W., Yang, X., Walker, W. E., Tesar, B. M., Goldstein, D. R. (2008) Aging impairs IFN regulatory factor 7 up-regulation in plasmacytoid dendritic cells during TLR9 activation. *J. Immunol.* **181**, 6747–6756.
48. Arranz, L., De Castro, N. M., Baeza, I., De la Fuente, M. (2010) Differential expression of Toll-like receptor 2 and 4 on peritoneal leukocyte populations from long-lived and non-selected old female mice. *Biogerontology* **11**, 475–482.
49. Hinojosa, E., Boyd, A. R., Orihuela, C. J. (2009) Age-associated inflammation and Toll-like receptor dysfunction prime the lungs for pneumococcal pneumonia. *J. Infect. Dis.* **200**, 546–554.
50. Van Duin, D., Shaw, A. C. (2007) Toll-like receptors in older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* **5**, 1438–1444.
51. Van Duin D., Mohanty S., Thomas V., Ginter S., Montgomery R. R., Fikrig E., Allore H. G., Medzhitov R., Shaw A. C. (2007) Age-associated defect in human TLR-1/2 function. *J. Immunol.* **178**, 970–975.
52. Agrawal, A., Tay, J., Ton, S., Agrawal, S., Gupta, S. (2009) Increased reactivity of dendritic cells from aged subjects to self-antigen, the human DNA. *J. Immunol.* **182**, 1138–1145.
53. Panda A., Qian F., Mohanty S., van Duin D., Newman F. K., Zhang L., Chen S., Towle V., Belshe R. B., Fikrig E., Allore H. G., Montgomery R. R., Shaw A. C. (2010) Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J. Immunol.* **184**, 2518–2527.
54. Krutzik, S. R., Hewison, M., Liu, P. T., Robles, J. A., Stenger, S., Adams, J. S., Modlin, R. L. (2008) IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to the vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J. Immunol.* **181**, 7115–7120.
55. Adams, J. S., Hewison, M. (2008) Unexpected actions of vitamin D: new perspectives on the regulation of innate and adaptive immunity. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* **4**, 80–90.
56. Ginde, A. A., Mansbach, J. M., Camargo Jr., C. A. (2009) Association between serum 25-hydroxyvitamin D level and upper respiratory tract infection in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arch. Intern. Med.* **169**, 384–390.
57. Wang, J. P., Bowen, G. N., Padden, C., Cerny, A., Finberg, R. W., Newburger, P. E., Kurt-Jones, E. A. (2008) Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus. *Blood* **112**, 2028–2034.
58. Cannell, J. J., Zaslav, M., Garland, C. F., Scragg, R., Giovannucci, E. (2008) On the epidemiology of influenza. *Virol. J.* **5**, 29.
59. Aloia, J. F., Li-Ng, M. (2007) Re: epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol. Infect.* **135**, 1095–1096.
60. Sadeghi K., Wessner B., Laggner U., Ploder M., Tamandl D., Friedl J., Zügel U., Steinmeyer A., Pollak A., Roth E., Boltz-Nitulescu G., Spittler A. (2006) Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. *Eur. J. Immunol.* **36**, 361–370.
61. Dickie, L. J., Church, L. D., Coulthard, L. R., Mathews, R. J., Emery, P., McDermott, M. F. (2010) Vitamin D3 down-regulates intracellular Toll-like receptor 9 expression and Toll-like receptor 9-induced IL-6 production in human monocytes. *Rheumatology (Oxford)* **49**, 1466–1471.
62. Khoo, A. L., Chai, L. Y., Koenen, H. J., Sweep, F. C., Joosten, I., Netea, M. G., van der Ven, A. J. (2011) Regulation of cytokine responses by seasonality of vitamin D status in healthy individuals. *Clin. Exp. Immunol.* **164**, 72–79.
63. Timonen, T., N  h  , S., Koskela, T., Pukkala, E. (2007) Are sunlight deprivation and influenza epidemics associated with the onset of acute leukemia? *Haematologica* **92**, 1553–1556.
64. Laaksi, I., Ruohola, J. P., Tuohimaa, P., Auvinen, A., Haataja, R., Pihlajam  ki, H., Yikomi, T. (2007) An association of serum vitamin D concentrations < 40 nmol/L with acute respiratory tract infection in young Finnish men. *Am. J. Clin. Nutr.* **86**, 714–717.

KEY WORDS:

aging · cathelicidin · innate immunity · Toll-like receptor · vitamin D

LETTER

Toll-like receptor 9 gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis

L Álvarez-Rodríguez¹, M López-Hoyos², I Beares², J Calvo-Alén³, T Ruiz³, I Villa³, VM Martínez-Taboada¹

Divisions of ¹Rheumatology and ²Immunology, Marqués de Valdecilla University Hospital, IFIMAV, Faculty of Medicine, University of Cantabria, Santander and ³Divisions of Section of Reumatology, Hospital Sierrallana, Torrelavega, Cantabria, Spain

Ageing is accompanied by qualitative and quantitative changes in the immune system, which are grouped by the term immunosenescence (1) and by the appearance of age-restricted disorders, such as polymyalgia rheumatica (PMR) and giant cell arteritis (GCA). The pathogenesis of both conditions remains unknown, but recent evidence supports the involvement of innate immunity (2, 3).

There are several factors that support the study of Toll-like receptor 9 (TLR9) in PMR and GCA. First, an increased expression of TLR9 in circulating B cells in GCA patients with active disease was found (2). Second, it has been hypothesized that the initial events in the vessel wall of patients with GCA are mediated by the transition of immature adventitial dendritic cells (DCs) to the mature state through TLR activation (3). Third, functional defects in the TLR9 pathway have been implicated in chronic granulomatous conditions (3). Furthermore, some *TLR9* polymorphisms are functionally relevant and related to the development of other chronic inflammatory conditions (4, 5).

Our aim was to determine whether two polymorphisms in *TLR9* (T-1486C and T-1237C) are associated with susceptibility and clinical features in PMR and GCA and to search for the functional consequences of these polymorphisms.

The present study included 268 PMR patients, 97 GCA patients, and 128 age-matched healthy controls (HC) (Table 1) who all provided signed informed consent. The regional ethics committee approved the study. Genotyping of the *TLR9* [–1486 T > C (rs187084) and –1237 T > C (rs5743836)] polymorphisms was performed using polymerase chain reaction (PCR) restriction fragment length polymorphism (RFLP) as described previously (6). Intracellular expression of TLR9 was assessed on T cells, B cells, and monocytes by flow cytometry as described previously (2).

The study population was found to be in Hardy–Weinberg equilibrium for both *TLR9* gene polymorphisms. The allele, genotype, and haplotype analysis of *TLR9* T-1486C and T-1237C revealed that neither of them were significantly associated with disease susceptibility (Supplementary Tables 1–3). We observed no significant difference between PMR and GCA patients (Supplementary Table 4).

Furthermore, no significant association between the *TLR9* gene polymorphisms and the intensity of the acute phase response or the presence of ischaemic manifestations and polymyalgic syndrome was seen. No significant association between the *TLR9* gene polymorphisms and the presence of at least one relapse/recurrence, number of

Table 1. Demographic data and main clinical features of patients with polymyalgia rheumatica (PMR) and giant cell arteritis (GCA).

	Controls	PMR	GCA
Number of patients	128	268	97
Age (years), mean $\pm$ SD	74.2 $\pm$ 10.8	72.6 $\pm$ 7.5	74.0 $\pm$ 7.5
Gender (% females)	67.4	62.5	63.2
Time to diagnosis (months)	–	3.2 $\pm$ 2.5	2.9 $\pm$ 2.5
PMR symptoms (%)	–	100	45.1
Ischaemic symptoms (%)	–	0	51.6
TAB (positive/total number)	–	0/73	76/91
Pretreatment ESR (mm/1 h)	–	59.2 $\pm$ 30.5	88.4 $\pm$ 32.1
Pretreatment CRP (mg/dL)	0.3 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 5.4	9.1 $\pm$ 5.6

SD, Standard deviation; TAB, temporal artery biopsy; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein.

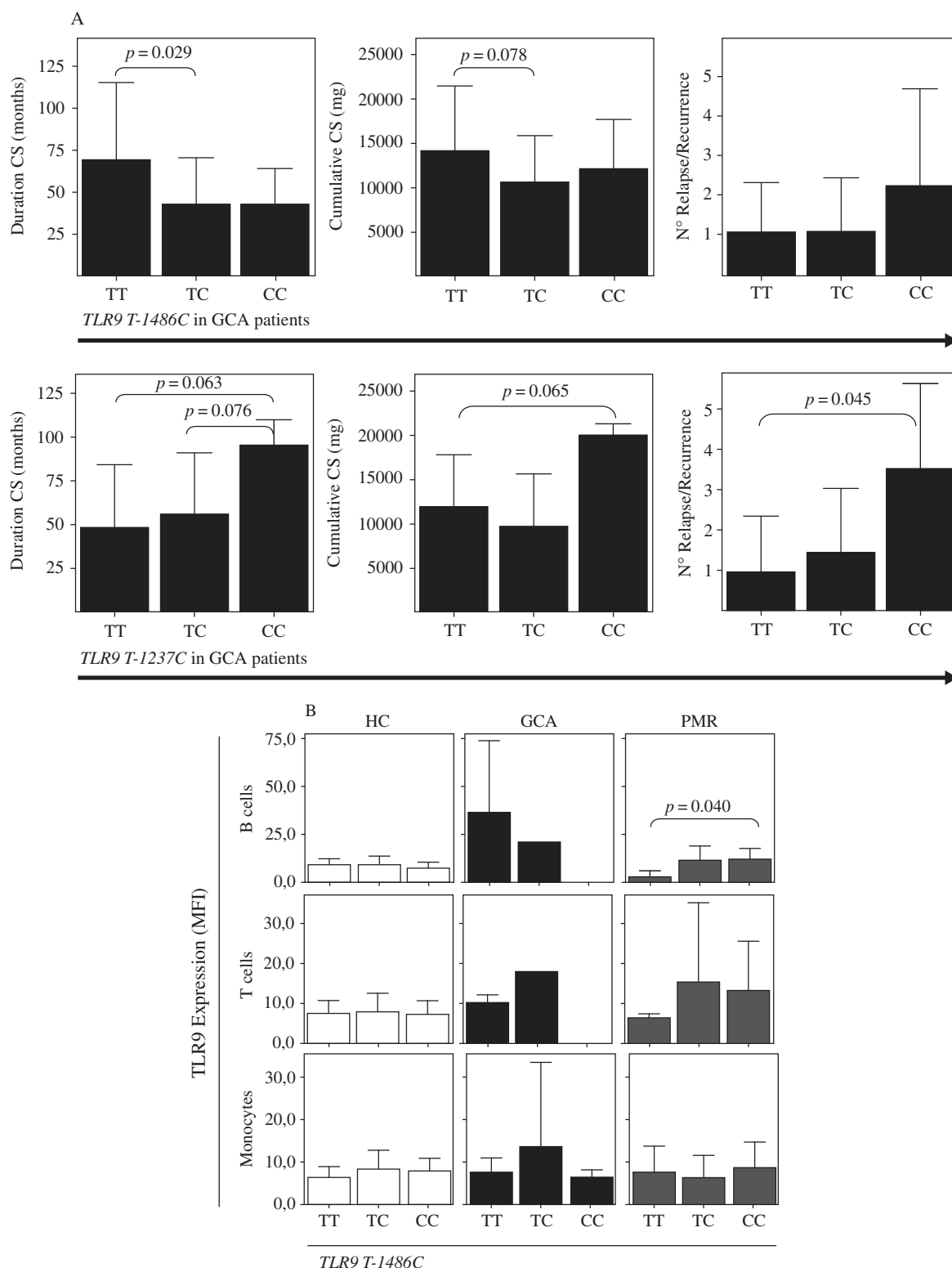


Figure 1. (A) Disease prognosis in patients with giant cell arteritis (GCA) according to Toll-like receptor 9 (*TLR9*) genotypes T-1486C and T-1237C. Duration of corticosteroid (CS) treatment in months, cumulative dose of CS in mg, and number of relapses/recurrences are shown according to *TLR9* genotypes. Data are presented for patients with at least 2 years of follow-up ($n = 56$). P-values of differences between groups calculated by the Mann–Whitney test are expressed when significant. (B) *TLR9* expression on subpopulations of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) according to *TLR9* genotypes at disease onset in patients with polymyalgia rheumatica (PMR), GCA, and healthy controls (HC). Mean fluorescence intensity (MFI) expression of *TLR9* in PBMCs of patients with PMR, GCA, and age-matched HC are shown according to *TLR9* T-1486C genotypes. P-values of differences between groups calculated by the Mann–Whitney test are expressed when significant.

relapses, duration of corticosteroid (CS) treatment or cumulative prednisone dose was found for PMR patients (Supplementary Figure 1). However, GCA patients carrying the TC genotype of the *TLR9* T-1486C polymorphism had a shorter duration of CS therapy and those carrying the CC genotype of the *TLR9* T-1237C polymorphism had a higher number of relapses/recurrences (Figure 1A).

In PMR patients, the CC genotype of the *TLR9* T-1486C polymorphism was associated with an increased *TLR9* expression on circulating B cells (Figure 1B and Supplementary Figure 2).

TLR9 is an important pathogen recognition receptor that is expressed in different cell subtypes and recognizes bacterial unmethylated cytosine–guanine dinucleotide (CpG) motifs and also viral antigens (7). *TLR9* activation mediates between innate and adaptive immune responses, skewing it towards the T-helper 1 (Th1) pathway (8), but also to the induction of regulatory responses (5).

Here, we expanded the study of *TLR9* gene polymorphisms to PMR and GCA, two inflammatory syndromes that affect exclusively elderly individuals. No significant differences in allele frequencies or genotypes between patients with elderly-onset inflammatory conditions and controls were observed in this study. To the best of our knowledge, no previous studies of *TLR9* polymorphisms in these two disorders have been reported.

The reasoning behind the proposed involvement of *TLR9* gene polymorphisms is that they may influence in vivo receptor expression and function (5, 9). However, little is known about the genetic variation of the *TLR9* gene and the functional implications of common *TLR9* gene variants (9). Although limited by the sample size, in PMR patients, the CC genotype of the *TLR9* T-1486C polymorphism was associated with increased *TLR9* expression on circulating B cells. The relevance of this finding and the impact on *TLR9* function is currently under investigation. In addition, other *TLR9* gene variants described in other diseases have not been addressed here (10, 11) and could also be involved.

Our results do not support the association of these *TLR9* gene variants with susceptibility to PMR and GCA, but their role in the prognosis of GCA should be confirmed in other populations.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

S1 Figure 1 No significant association between the *TLR9* gene polymorphisms and the presence of at least one relapse/recurrence, number of relapses, duration of corticosteroid (CS) treatment or cumulative prednisone dose was found for PMR patients

S2 Figure 2 The CC genotype of the *TLR9* T-1486C polymorphism was associated with an increased *TLR9* expression on circulating B cells in PMR patients.

S3 Tables 1–4 The allele, genotype, and haplotype analysis of *TLR9* T-1486C and T-1237C.

Please note: The editors are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries should be directed to the corresponding author for the article.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the ‘Marqués de Valdecilla’ Public Hospital and Health Care Foundation (PI080098) and the Mutua Madrileña Foundation. L. Álvarez-Rodríguez and I. Beares were supported by a grant for Research Aid from the ‘Marqués de Valdecilla’ Foundation-IFIMAV.

References

1. Pawelec G, Solana R. Immunosenescence. *Immunol Today* 1997;18:514–16.
2. Alvarez-Rodríguez L, Lopez-Hoyos M, Mata C, Fontalba A, Calvo-Alen J, Marin MJ, et al. Expression and function of toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1677–83.
3. Ma-Krupa W, Kwan M, Goronzy JJ, Weyand CM. Toll-like receptors in giant cell arteritis. *Clin Immunol* 2005;115:38–46.
4. Veltkamp M, Van Moersel CH, Rijkers GT, Ruven HJ, Van Den Bosch JM, Grutters JC. Toll-like receptor (TLR)-9 genetics and function in sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 2010;162:68–74.
5. Ng MT, Van't Hof R, Crockett JC, Berry S, Thomson J, McLean MH, et al. Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 –1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori*-induced gastric disease. *Infect Immun* 2010;78:1345–52.
6. Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. TLR2, TLR4 and TLR9 polymorphisms and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:1760–6.
7. Hamann L, Hamprecht A, Gomma A, Schumann RR. Rapid and inexpensive real-time PCR for genotyping functional polymorphisms within the Toll-like receptor-2, -4, and -9 genes. *J Immunol Methods* 2004;285:281–91.
8. Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev* 2007;220:251–69.
9. Heeg K, Zimmermann S. CpG DNA as a Th1 trigger. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;121:87–97.
10. Berghofer B, Frommer T, König IR, Ziegler A, Chakraborty T, Bein G, et al. Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy* 2005;35:1147–54.
11. Torok HP, Glas J, Endres I, Tonenchi L, Teshome MY, Wetzke M, et al. Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1723.

Víctor M Martínez-Taboada, Rheumatology Division, Marqués de Valdecilla University Hospital, Faculty of Medicine, University of Cantabria, Avda Valdecilla s/n 39008, Santander, Spain.

E-mail: vmartinez@medynet.com

Accepted 15 June 2012

Anexo II:
Otras Publicaciones
del periodo predoctoral

Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: Role of cytokines in the pathogenesis and implications for treatment

Victor Manuel Martinez-Taboada, Lorena Alvarez, Maria Ruiz-Soto, Maria Jose Marin-Vidalled, Marcos Lopez-Hoyos

Cytokine Volume 44, Issue 2, November 2008, Pages 207–220

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2008.09.004>

Circulating cytokines in active polymyalgia rheumatic

L Alvarez-Rodríguez, M Lopez-Hoyos, C Mata, M Jose Marín, J Calvo-Alen, R Blanco, E Aurrecoechea, M Ruiz-Soto, V M Martínez-Taboada

Ann Rheum Dis 2010; 69:263–269.

[doi:10.1136/ard.2008.103663](http://dx.doi.org/10.1136/ard.2008.103663)

*Interleukin-1RN gene polymorphisms in elderly patients with rheumatic inflammatory chronic conditions: Association of IL-1RN*2/2 Genotype with polymyalgia rheumatica*

Lorena Alvarez-Rodriguez , Eugenio Carrasco-Marin , Marcos Lopez-Hoyos , Cristina Mata , Lorena Fernandez-Prieto , Maria Ruiz-Soto , Jaime Calvo, Vicente Rodriguez-Valverde , Teresa Ruiz, Ricardo Blanco, Alfonso Corrales, Victor Manuel Martinez-Taboada

Human Immunology Volume 70, Issue 1, January 2009, Pages 49–54

<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2008.10.011>

Interleukin-12 gene polymorphisms in patients with giant cell arteritis, polymyalgia rheumatica and elderly-onset rheumatoid arthritis

L. Alvarez-Rodriguez¹, V.M. Martinez-Taboada¹, M. López-Hoyos², C. Mata³, L. Fernandez Prieto², M. Agudo-Bilbao¹, J. Calvo³, M. Ruiz Soto¹, V. Rodriguez-Valverde¹, T. Ruiz³, R. Blanco¹, A. Corrales⁴, E. Carrasco²

Clinical and Experimental Rheumatology 2009 Jan-Feb; 27 (1Suppl 52), Pages 14-18

Análisis del polimorfismo rs20541 (R130Q) del gen de la IL-13 en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento

Lorena Álvarez-Rodríguez, Marcos López-Hoyos, Eugenio Carrasco-Marín, Cristina Mata, Jaime Calvo-Alén, Elena Aurrecoechea, Ricardo Blanco, Teresa Ruiz, Pedro Muñoz Cacho, Ignacio Villa y Víctor Manuel Martínez-Taboada

Reumatología Clínica Volume 8, Issue 6, November–December 2012, Pages 321–327

<http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2012.04.006>



Review Article

Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: Role of cytokines in the pathogenesis and implications for treatment

Victor Manuel Martinez-Taboada^{a,*}, Lorena Alvarez^a, Maria RuizSoto^a, Maria Jose Marin-Vidalled^b, Marcos Lopez-Hoyos^b

^aDivisions of Rheumatology Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV. Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Avda. Valdecilla s/n 39008, Spain

^bImmunology Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV. Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2008

Received in revised form 22 September 2008

Accepted 30 September 2008

Keywords:

Giant cell arteritis
Polymyalgia rheumatica
Cytokines
Pathogenesis
Therapy

ABSTRACT

Objective: To summarize the contribution of cytokines to pathogenesis, clinical manifestations and prognosis of polymyalgia rheumatica (PMR) and giant cell arteritis (GCA).

Methods: MEDLINE database search for studies published between 1980 and April 2008.

Results: PMR and GCA are characterized by a hyperproduction of IL-6. The role of other circulating cytokines in their pathogenesis remains unclear. Cytokine mRNA in the arterial wall of GCA can distinguish different clinical subgroups of patients. The profile of T cell-derived cytokines in GCA suggests that it is a Th1-driven disease. The scarce number of studies makes difficult to evaluate the exact contribution of cytokine polymorphisms to their pathogenesis. Small studies have suggested the utility of TNF antagonists in patients with refractory PMR and GCA. However, these data have not been confirmed in controlled studies in patients with recent onset disease.

Conclusion: Further studies are needed to evaluate the role of circulating cytokines in PMR and GCA. The study of tissue cytokines has provided important insights into the mechanisms implicated in the local inflammatory response that occurs in GCA. The important advance in the knowledge of the role of cytokines in PMR and GCA will have clear implications for treatment.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polymyalgia rheumatica (PMR)¹ and giant cell arteritis (GCA) are chronic inflammatory disorders of unknown etiology that affect elderly people [1]. GCA is a chronic granulomatous vasculitis preferentially targeting large and medium-sized arteries. The clinical manifestations range from the classic symptoms resulting from the involvement of the carotid artery branches such as headache, jaw claudication, scalp tenderness, visual involvement or stroke, to aortic arch syndrome or less specific manifestations such as fever, malaise, weight loss, or a polymyalgic syndrome [2–6]. PMR is characterized by pain and stiffness in the neck, shoulder and pelvic girdles [7,8]. Around 50% of the patients with GCA have polymyalgic symptoms and it has been reported that 15% of PMR patients without cranial symptoms of the disease have an underlying GCA [2,4,9]. PMR and

GCA, in addition to the clear predilection for the elderly, also present an excellent and characteristic response to corticosteroid (CS) therapy. Whereas GCA usually needs treatment with high-dose CS to prevent ischemic complications, PMR has an almost diagnostic response to low-dose CS therapy [4,7,10]. Despite the similarities regarding age distribution, some clinical manifestations, laboratory abnormalities and the excellent response to CS therapy, the relationship between GCA and PMR is still not clearly established. In fact, it is not understood why some patients with PMR develop a systemic vasculitis and why the disease process remains limited to the musculoskeletal system in others.

Cytokines are involved in the pathogenesis of most inflammatory diseases and since 1993 an increasing number of studies have addressed the role of cytokines in the pathogenesis of PMR and GCA. Such studies have been complicated by the number of new cytokines that are continuously being described. As the peripheral compartment is more accessible, the majority studies have searched for differences in the circulating cytokine profile, and also for the utility of monitoring cytokine levels in the clinical management and prognosis of PMR and GCA. Many studies have been conducted to investigate whether a genetic basis for these diseases may be found in polymorphisms of cytokine genes. The reasoning behind the proposed involvement of cytokine gene polymorphisms

* Corresponding author. Fax: +34 942 324641.

E-mail address: vmartinez@medynet.com (V.M. Martinez-Taboada).

¹ Abbreviations used: CRP: C-reactive protein; CS: corticosteroids; ESR: erythrocyte sedimentation rate; GCA: giant cell arteritis; IL-1 β : interleukin-1 beta; IL-2: interleukin-2; IL-4: interleukin-4; IL-6: interleukin-6; IL-10: interleukin-10; IL-12: interleukin-12; IFN- γ : interferon gamma; LIF: Leukemia inhibitory factor; PBMC: peripheral blood mononuclear cells; PMR: polymyalgia rheumatica; TAB: temporal arteritis biopsy; VNTR: variable number of tandem repeats.

in susceptibility or disease severity is that they may influence *in vivo* cytokine levels [11]. And finally, several key studies have addressed the cytokine profile in the inflamed vessels. On the other hand, the importance of clarifying the role of cytokines in PMR and GCA comes from the implications for treatment, as we now have available an increasing number of effective biologic agents directed against cytokines that could be used in these patients.

The objective of this review is to summarize the contribution of cytokines to the pathogenesis and their possible relationships with the clinical manifestations and prognosis of GCA and PMR. Furthermore, the possible implications for treatment are also discussed.

2. Methods

2.1. Review of the literature

We searched the MEDLINE database for studies published between 1980 and April 2008. Paired medical subject headings (MeSH) used for keyword and text word searching included *giant cell arteritis*, *temporal arteritis*, *polymyalgia rheumatica*, *cytokines*, *lymphokines*, *genes*, and *polymorphisms*. We also reviewed the reference lists of all articles obtained to identify additional articles of interest. We reviewed only English language articles and when possible, the following aspects of each article were recorded: number of patients and controls, number of patients with biopsy-proven GCA, type of cytokine assessed and study methods, as well as the main results, including the influence of treatment as well as the influence of genetic polymorphisms in disease susceptibility and severity.

3. Results

3.1. Circulating cytokines

3.1.1. Interleukin-6 (IL-6)

Several reports have suggested that increased serum levels of IL-6 can be detected in patients with PMR and GCA (Table 1). Three major messages might be extracted from these studies. First, the majority of the studies have found a significant increased of circulating IL-6 in patients with active disease [12–21]. Second, most of the studies have also shown a significant decrease of circulating IL-6 levels that correlate with remission of clinical symptoms after CS therapy [12–16,18,19,21]. And third, certain controversy exists regarding the correlation of circulating IL-6 levels with those parameters that reflect acute-phase response such as ESR, CRP or platelets [12,14–16,18,20–23].

Despite the decrease of IL-6 levels after CS therapy, it does not correct the underlying mechanisms that lead to IL-6 production, as documented by the rapid recurrence of increased plasma IL-6 levels following short-term withdrawal of CS therapy [14]. Furthermore, immediately before the next dose of prednisone, plasma IL-6 levels were again within the pathologic range [14]. The finding that CS-induced suppression of circulating IL-6 levels is short lived and that continuous CS therapy is required for the suppressive effect has also been suggested in other studies [15,16,24]. Although there are scarce data, it has been suggested that among PBMC, IL-6 and also IL-1 β production is restricted to monocytes [14,25].

Another common finding is that circulating IL-6 levels were quite variable between patients. Hernandez-Rodriguez et al. [20] showed that the increase in IL-6 circulating levels in patients with active GCA was especially seen in patients with a strong inflammatory response. In this study, remarkable differences in the concentration of IL-6 and also TNF α were observed between patients with a strong and a weak inflammatory reaction, indicating that both cytokines may participate in the development of the acute-phase response in GCA [20]. Furthermore, the presence of a strong

inflammatory response was associated with the prognosis of GCA. Thus, patients with a strong inflammatory response required more intensive CS therapy, had more flares, and had a more chronic course compared with those with a weak inflammatory response [20]. Another study from the same group showed that IL-6 expression in TAB infiltrates and circulating levels of IL-6 were significantly reduced in patients with ischemic complications [26].

The close correlation between serum levels of IL-6 and disease symptoms has led to the suggestion that estimation of IL-6 may be useful in monitoring of patients with PMR and GCA [27]. However, only a few studies have addressed the utility of monitoring circulating IL-6 as a marker of disease activity in these disorders [24,28,29]. In the study by Weyand et al. [29], pre-treatment ESR and the response of plasma IL-6 concentrations during CS treatment were identified as parameters that helped to separate patients with PMR into categories with different prognosis. As shown in Table 2, patients displayed a marked heterogeneity in their early and late treatment responses, suggesting that the diagnostic category of PMR includes several distinct variants of the disease. Pre-treatment ESR was helpful in identifying patients who required low doses of CS therapy for less than 1 year, and the response patterns of IL-6 to CS therapy identified patients with a chronic relapsing course, and those who were insufficiently treated by an initial dose of 20 mg/day of prednisone [29]. The question arises if patients in the group C have a pure PMR with a more severe course and refractory to CS therapy, or whether this subgroup of patients has other disease with a polymyalgic onset (Table 2). In another study, plasma IL-6 levels indicated ongoing up-regulated acute-phase responses in GCA patients [24]. In this study, CRP levels appeared to follow changes in IL-6 levels more closely than in ESR. However, CRP appeared to be less sensitive than IL-6 in predicting disease activity. In the majority of patients, IL-6 levels did not return to the normal range even in the absence of clinical disease activity [24].

3.1.2. Other cytokines

3.1.2.1. Tumor necrosis factor alpha (TNF α). There are some discrepancies regarding circulating levels of TNF α in patients with PMR and GCA (Table 1). Whereas some studies have been able to detect circulating TNF α [19,20], other studies were not able to detect or to find significant increase of this cytokine in these patients [14,21,22,30]. One possible explanation for this discrepancy is the difficulty to detect circulating TNF α . It is possible, that differences in sensitivity of the different assays used might account for such discrepancy.

3.1.2.2. Interleukin (IL)-1 and IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) family. In general, studies on IL-1 β have failed to detect circulating levels of this cytokine in PMR and GCA patients [16,20,21,31]. Only in the study by Pountain et al. [32], a slight, but significant increase of IL-1 β in active patients compared to controls was detected. Furthermore, during relapses, plasma IL-1 β was more likely to be raised than ESR or CRP [32]. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) is a member of the IL-1 family that binds to the IL-1 receptor, but does not induce any intracellular response and thus acts as an inhibitor of IL-1 activity [33]. Circulating levels of IL-1ra have been studied in only a few reports with conflicting results [16,19,21,31].

3.1.2.3. Leukemia inhibitory factor (LIF). LIF is a multifactorial cytokine initially described for its growth and differentiation activities on hematopoietic cells [34]. LIF has also been implicated as a potent inflammatory mediator that plays an important role during the acute phase response [35]. As described for other cytokines, LIF displays some redundancy with other related cytokines such as IL-6, oncostatin M, ciliary neurotrophic factor and IL-11. This functional redundancy is thought to be related to the fact that

Table 1

Studies on circulating cytokines in patients with giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica.

Reference	Patients and controls	Determinations	Comments
Lecron et al. [13]	GCA (<i>n</i> = 20); HC (<i>n</i> = 16); Alzheimer's (<i>n</i> = 40); LAS (<i>n</i> = 25); PA (<i>n</i> = 6); Septic shock (<i>n</i> = 8); CML (<i>n</i> = 8)	-LIF: ELISA (home made); SL 10 pg/ml -IL-6: ELISA (Medgenix, Brussels, Belgium); SL: 3 pg/ml	-LIF: 55% of GCA patients had high levels No correlation with clinical manifestations No modification with CS -IL-6: increased in GCA compared to HC (54 ± 9.6 vs 3.3 ± 0.9 pg/ml) Significant decrease after CS
Roche et al. [14]	GCA (<i>n</i> = 19) PMR (<i>n</i> = 13) HC (<i>n</i> = 20)	-IL-6, TNF α : ELISA (Biosource International, Camarillo, CA) -PCR	-Significantly high concentrations of IL-6 in active GCA and PMR* -No correlation of IL-6 with ESR or platelets -Significant decrease of IL-6 after CS -CD14+ cells are the exclusive source of IL-6 -Rapid recurrence of increased IL-6 after stopping CS -No significant increase of TNF α
Emilie et al. [12]	GCA (<i>n</i> = 7) HC (ND)	-IL-6: ELISA (Immunotech, Marseille, France) -IL-6: B9 bioassay	-Significant increase of IL-6 levels in active disease (43 ± 13 vs. <10 pg/ml in HC) -The results in serum were confirmed by using a functional assay -Rapid and significant response to CS therapy except in the two patients with ocular symptoms -No correlation of IL-6 with acute phase proteins
Roblot et al. [21]	GCA (<i>n</i> = 20) HC (<i>n</i> = 20) Bacterial pneumonia (<i>n</i> = 7)	-IL-2: ELISA; SL: 10 pg/ml -IL-1 α , IL-1 α , sIL-2R: ELISA (Immunotech); SL: 3 pg/ml, 10 pg/ml, 5 pM -TNF α : ELISA (Medgenix); SL: 10 pg/ml -IL-6, sIL-6r, IL-10, IFN- γ : ELISA (Innotest, Besancon, France); SL: 3, 30, 10, and 15 pg/ml, respectively	-Significant increase of IL-6 levels in active disease. Rapid response to CS therapy. Correlation with CRP on day 0. -Increase of sIL-6R after starting CS -Increase of sIL-2R on day 0 and decrease with CS -No significant differences in IL-1 α , IL-1 α , and TNF -No detectable levels: IL-2, IL-10, and IFN γ (only 1 patient)
Tellus et al. [30]	PMR (<i>n</i> = 44); HC (<i>n</i> = 4)	-IL-6, IL-8, TNF: ELISA	-No significant increase of IL-6, IL-8 or TNF α
Caplanne et al. [28]	PMR (<i>n</i> = 17) GCA (<i>n</i> = 3)	-IL-6 γ : radioimmunoassay (Medgenix)	-Significant increase of IL-6, during clinical relapses -No modification of classic markers such as ESR or CRP
Corrigal et al. [15]	PMR (<i>n</i> = 54) HC (<i>n</i> = ND)	-IL-6: ELISA (R&D Systems, Abingdon); SL: 3 pg/ml	-IL-6: significantly increased in active PMR compared to HC (50.3 ± 13.8 vs. 3 ± 1 pg/ml) -Significant correlation of IL-6 with ESR only before CS -Significant decrease after CS, but with fluctuations on follow-up
Uddhammar et al. [16]	PMR (<i>n</i> = 15) HC (<i>n</i> = ND)	-IL-1 β , TNF α , IL-6: ELISA (Medgenix); SL: 2, 3, and 2 pg/ml, respectively. -IL-1 β , IL-1ra, sIL-6r, sICAM-1, sE- selectin: ELISA (R&D Systems Inc, MN, USA); SL: 0.06, 22, 140, 7, and 2 pg/ ml, respectively	-IL-6 and IL-1ra: significantly increased in active PMR -No correlation of IL-6 with ESR or CRP -Significant decrease of IL-6 after CS, but without complete normalization after 3 months -Persistence of increase in IL-1ra after CS -sICAM-1 levels were increased in active PMR and did not decrease with CS
Pountain et al. [32]	PMR/GCA (<i>n</i> = 41) RA (<i>n</i> = 12); Trauma (<i>n</i> = 8); Febrile syndrome (<i>n</i> = 12); HC (<i>n</i> = ND)	-IL-1 β , IL-6, sIL-2r: ELISA	-Slight, but significant increase of IL-1 β in active patients compared to controls (4 vs. 0 pg/ml). Significant reduction of IL-1 β with CS. Significant increase of IL-1 β in relapses -IL-6: no significant increase in active disease or relapses -sIL-2r: Significant increase in active disease but not in relapses
Straub et al. [31]	PMR (<i>n</i> = 102) HC (<i>n</i> = 31)	-IL-10: ELISA (PerSeptive Diagnostics, Framingham, MA, USA); SL 1 pg/ml -IL-1 β : ELISA (R&D Systems); SL: 0.2 pg/ml -IL-1ra: ELISA (R&D); SL: 25 pg/ml -TNF α : ELISA (R&D); SL: 0.2 pg/ml	-Significant increase of IL-10 regardless of the CS treatment. Association between high levels of IL-10 and lower symptoms scores -No increase of IL-1 β -Significant increase of IL-1ra, regardless of CS treatment -Significant increase of TNF α in active untreated PMR (no significant in references 17 and 37)
Straub et al. [17]		-IL-6: ELISA (R&D); -Adrenal hormones	-Significant increase in IL-6 levels in patients with PMR compared to controls. No differences between patients with and without CS -Positive correlation between IL-6 and TNF α with adrenal hormones

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Reference	Patients and controls	Determinations	Comments
Straub et al. [38]		-IL-2: ELISA (R&D); SL: 7 pg/ml -sVCAM: ELISA (R&D); SL: 5 pg/ml	-Significant increase of IL-2, sIL-2r and sVCAM in PMR patients irrespective of prior prednisolone treatment -No correlation between prolactin and serum markers of inflammation
Blain et al. [22]	GCA (<i>n</i> = 7) TAB + Controls (<i>n</i> = 15) TAB – with infections and neoplasias	-ELISA (Immunotech). IL-2, IL-6, IFN- γ , IL-1 β , TNF α ; SL: 5 pg/ml. sIL-2R; SL: 5 pM. sIL-6r; SL: 10 pg/ml	-No HC group -As compared with non-healthy controls, GCA patients had lower plasma TNF α and sIL-6R -IL-1 β was undetectable in all patients and controls -No correlation of circulating cytokines with acute phase proteins
Hernandez-Rodriguez et al. [20]	GCA (<i>n</i> = 62)	-IL-1 β , IL-6: ELISA (Genzyme, Minneapolis, MN, USA) -TNF α : ELISA (Medgenix)	-Significant increase of IL-6 in active patients compared to controls (21.4 ± 16 vs. 5 ± 11 pg/ml). Correlation of IL-6 with CRP -Significant increase of TNF α in active patients compared to controls (26.4 ± 13.7 vs. 16 ± 9.5 pg/ml). Correlation of TNF α with ESR -IL-1 β was below the detection threshold in most patients and controls -Patients with a strong inflammatory response have more prolonged CS treatment and more relapses
Cutolo et al. [18]	PMR (<i>n</i> = 41) HC (<i>n</i> = 19)	-IL-6: ELISA (DuoSet ELISA kit, R&D Systems); SL: 0.2–0.4 pg/ml -Hormones	-Significant increase of IL-6 in active PMR compared to controls (25.9 ± 4.6 vs. 1.4 ± 0.9 pg/ml) -Significant correlation of IL-6 with ESR or CRP -Significant decrease of IL-6 after CS
Hernandez-Rodriguez et al. [26]	GCA (<i>n</i> = 80)	-TNF α : ELISA (Medgenix) -IL-1 β , IL-6: ELISA (R&D)	-Circulating levels of IL-6 were significantly lower in patients with ischemic events -No differences in IL-1 β or TNF α
Cutolo et al. [19]	PMR (<i>n</i> = 14) EORA/PMR (<i>n</i> = 14) EORA (<i>n</i> = 15) HC (<i>n</i> = 15)	-IL-6, TNF α : ELISA (Cayman, Ann Arbor, MI, USA); SL: 2, 1.5 pg/ml, respectively -IL-1ra: ELISA (Beckman Coulter, Marseille, France) [†] ; SL: 30 pg/ml -Hormones	-Significant increase of IL-6 in the 3 groups of patients, but especially in patients with PMR symptoms. Significant decrease of IL-6 after CS -Significant increase of TNF α in the 3 groups. Significant decrease of TNF α after CS -Significant increase of IL-1ra in EORA. Significant increase of IL-1ra after CS in patients with PMR symptoms

GCA, Giant cell arteritis; PMR, polymyalgia rheumatica; HC, healthy controls; LAS, Lateral amyotrophic sclerosis; PAN, Polyarteritis nodosa; CML, Chronic myeloid leukemia; ND, no data; LIF, leukemia inhibitory factor; SL, sensitivity limit; IL-6, interleukin 6; CS, corticosteroids; TNF α , tumor necrosis factor alpha; PCR, polymerase chain reaction; ESR, erythrocyte sedimentation rate; IL-1ra, interleukin 1 receptor antagonist; RA, rheumatoid arthritis; CRP, C-reactive protein; TAB, temporal artery biopsy.

Table 2

Polymyalgia rheumatica subsets based on the response to initial corticosteroid dose and the duration of therapy (28).

	Group A	Group B	Group C
N° (%) of patients	8 (30%)	12 (44%)	7 (26%)
Duration of treatment	<1 year	>1 year	>1 year
Response to 20 mg/day of prednisone	+	+	(Need 30 mg/d)
N° flares /patient	1	7	6
Time to flare (days)	125	103	9
Cumulative CS dose	Low	High	Very high
Pre-treatment ESR	Low	High	High
Pre-treatment IL-6	Low	High	High
ESR response	+	+	+
IL-6 response	+	+	—
Short term prognosis	Excellent	Poor	Poor
Long-term prognosis	Excellent	Good	?
GCA on follow-up	0	1 (8.3%)	2 (28.5%)

GCA, Giant cell arteritis; PMR, polymyalgia rheumatica; CS, corticosteroids; ESR, erythrocyte sedimentation rate; IL-6, interleukin 6.

some of the components of the LIF receptor structure share a high homology with these cytokines [36,37]. In the study by Lecron et al. [13], they measured the levels of circulating LIF with a home-made ELISA. They also included several control groups including healthy volunteers and patients with degenerative and inflammatory conditions. They found high levels of circulating LIF in 11 of 20 patients with GCA and only low levels in some patients with septic shock and chronic myeloid leukemia. There were no correlations between the LIF levels and the clinical manifestations of the disease, and interestingly enough, LIF levels did not

change during CS therapy despite a clinical remission and a normalization of IL-6 levels and CRP [13].

3.1.2.4. Interleukin (IL)-10. There is only one study investigating the role of IL-10 in PMR. In this study [31], PMR patients with elevated IL-10 serum levels had significantly fewer symptoms. This was particularly true in patients with recent onset PMR without CS therapy. These findings raise important questions, although the results are limited by the study design [31]. The authors claimed that all the patients had pure PMR, but it is possible that there was a mixture of PMR and GCA as reflected by the presence of headache and visual symptoms in a significant proportion of patients. Despite duration of disease of 2.6 ± 0.3 years, 53% of the patients were on prednisone alone (mean dose 29 ± 4.8 mg/day), and 15.6% were on prednisone plus immunosuppressive agents. Furthermore, no differences in the symptoms score between active untreated PMR and follow-up patients were found. No definite conclusions can be drawn from this study and the results should be confirmed in properly designed studies that include a well-defined population of patients with PMR and also GCA. On the other hand, only one study has measured circulating IL-10 in a well-defined population of 20 patients with GCA, in which IL-10 concentration was below the detection limit in all patients and controls [21].

3.1.2.5. Interleukin (IL)-2 and interferon (IFN) gamma. Only a few studies have measured these cytokines in patients with PMR and GCA and no definite conclusions can be drawn. In general, IL-2 and IFN- γ were not detectable in the serum of these patients [21,22,38].

3.2. Tissue cytokines

The study of cytokines in the arterial wall situation is likely to provide insights into the pathogenic mechanisms capable of driving the inflammatory response that occurs in the vessel of GCA patients (Table 3 and Fig. 1). The first attempt to study this issue was made by Weyand and co-workers at the Mayo Clinic [39]. Using a PCR-based technique, they looked for mRNA of several cytokines in temporal artery biopsy (TAB) sections of patients with GCA, PMR and controls without GCA/PMR final diagnosis. To increase the sensitivity, the initial PCR (30 cycles) was reamplified for another 30 cycles. Although the results of this study are somewhat limited by the study design, several important messages can be obtained. As shown in Fig. 2, the local inflammatory response in GCA consists of activated macrophages producing pro-inflammatory cytokines, and also consists of activated T cells that produce IL-2 and IFN- γ [39]. These results have been confirmed using *in situ* hybridization and immunohistochemistry techniques, showing that CD68+ cells produce IL-1 β , IL-6 and TGF- β [12,25,40]. The study also showed that cytokine mRNA can be detected in TAB specimens from patients with isolated PMR, indicating that at least a subgroup of these patients have a subclinical vasculitis [39]. In contrast with these results, no differences in cytokine mRNA was found between samples from PMR patients compared with specimens from patients with other diagnoses [41]. In summary, the profile of T cell-derived cytokines in GCA suggests that GCA is a Th1-driven disease, in which local IFN- γ plays a critical role in the development of a complete vasculitis (Fig. 2).

Another finding derived from TAB specimen studies is that tissue-infiltrating macrophages in active GCA showed a functional heterogeneity (Fig. 1). Macrophages localized at the adventitia and along the medial–adventitial junction produce pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) and TGF β 1 [24,40]. Macrophages localized at the intimal-medial junction produce type IV collagenase and iNOS, implying a role of these products in tissue destruction. Intimal proliferation was consistently associated with TGF β 1-producing cells suggesting a role of this cytokine in the proliferative reaction of intimal cell populations [40].

Another important aspect that may lead to a better understanding of the role of cytokines in the pathogenesis of GCA is to determine if the tissue–cytokine profile may help to distinguish different clinical patterns, especially to identify patients that are at high risk of developing ischemic complications. Weyand and co-workers showed that different profiles of tissue cytokines correlated with the disease phenotype in GCA [42]. As shown in Table 4, tissue cytokine profiles in patients with ischemic complications were characterized by a significantly higher production of IFN- γ and IL-1 β transcripts. Patients that did not present with fever had also increased levels of IFN- γ . The transcription of IL-2 was increased in patients who had a polymyalgic syndrome and large-vessel involvement [6,42]. Hernández-Rodríguez et al. [26] showed that patients with disease-related ischemic events had significantly lower IL-6 mRNA concentrations in their lesions than those with no ischemic complications (Table 4). These authors showed that IL-6 was able to induce a functional program related to angiogenesis in endothelial cells and that IL-6 induced angiogenesis in *ex vivo* and *in vivo* models. The results were in agreement with previous studies from the same group that showed that inflammation-induced angiogenesis might be a compensatory mechanism for ischemia in GCA [43].

Another key element that arises from tissue studies is the characterization of the cellular population that produces the main cytokines involved in the disease process. Studies done also at the Mayo Clinic have shown that more than 90% of the IFN- γ -producing cells are CD4+ T cells that express a memory phenotype. These IFN- γ producing CD4+ T cells represent a minority of the tissue-

infiltrating T cells and have a distinct distribution in the artery, being almost exclusively retained in the adventitial layer [44,45]. Interestingly enough, formation of multinucleated giant cells in the lesions also correlated with the synthesis of IFN- γ mRNA [40]. Most of the IL-6 producing cells displayed a morphology characteristic of macrophages (CD68+ cells), and to a lesser extent, fibroblast-like cells also produced IL-6 [12,25,41]. However, IL-6 was not detected in endothelial cells or within the giant cells [12].

3.3. Cytokines polymorphisms

During the last few years, several approaches have been taken to study the role of cytokine gene polymorphisms in patients with PMR and GCA (Table 5). As both disorders are characterized by a strong acute phase systemic response, one approach has been to study the genes of proinflammatory cytokines that might be involved in this phenomenon such as IL-6, IL-1 β , or TNF α [49–53]. Based on the tissue cytokines studies, a second approach is to study the cytokine genes that might be directly involved in the pathogenesis of the disease, such as IFN- γ [54,55]. And finally, the inflammatory response is regulated by a delicate balance between pro- and anti-inflammatory cytokines. Therefore, a third approach might be to study those genes involved in the suppression of the Th-1 response seen in GCA, such as IL-4 or IL-10 [54,56,57].

3.3.1. Interleukin-6 (IL-6) gene

A biallelic polymorphism, localized at position –174 of the promoter region of the IL-6 gene has been reported as functionally important, since it appears to influence the transcription rate of the gene and the plasma concentrations of IL-6. In this regard, and although there are conflicting results, previous studies have suggested that the IL-6 –174C allele is associated with lower levels of IL-6 expression [58]. Therefore, it seems logical to study this polymorphism in these patients. In two recent studies (Table 5), the Italian group did not detect an association between –174 G/C promoter polymorphism of IL-6 and PMR [49] or GCA [49]. These results are also in agreement with the results of a Spanish group [48]. However, in the later study [48], the authors observed that the presence of such a polymorphism may be a marker for PMR in biopsy-proven GCA, especially in the subgroup of HLA-DRB1*04-negative patients. The clinical implications of this finding remain to be elucidated, as this polymorphism has no apparent association with isolated PMR or with disease severity. Although no implication in susceptibility or prognosis was found in the study by Boiardi et al. [50], they found that patients homozygous for the C allele had significantly higher levels of IL-6 than patients carrying GC or GG genotypes. Furthermore, CC homozygosity was significantly more frequent in patients with persistently elevated IL-6. The influence of the genetic polymorphism in serum IL-6 levels was also confirmed in healthy controls [50].

3.3.2. Interleukin-1 (IL-1) cluster genes

The IL-1RN gene (which encodes IL-1Ra) is located in chromosome 2, in close proximity to the genes coding for IL-1 α (IL-1A) and IL-1 β (IL-1B) [59]. Several polymorphic sites have been described in the IL-1RN gene, including a variable number of tandem repeats (VNTR) within its second intron [60,61]. Allele 2 of this polymorphism was associated with the increased production of IL-1Ra by monocytes in response to GM-CSF and with higher plasma levels [62]. In a study by Boiardi et al. [51], PMR patients tend to have a higher frequency of the IL-1RN*2 allele compared with controls. IL-1RN*2 homozygosity was significantly higher in PMR patients than in controls (Table 5). In this study [51], the polymorphisms of the IL-1A and B genes did not reveal any association with PMR, and none of the genes analyzed were associated with disease severity. The same IL-1 cluster gene polymorphisms were analyzed

Table 3
Studies on tissue cytokines in patients with giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica.

Reference	Patients and controls	Determinations	Comments
Weyand et al. [39]	GCA with TAB + (<i>n</i> = 15)	-PCR (Ten 5–10 microns thick section): 30 PCR cycles ×2 times	-The local inflammatory response in GCA consists of activated macrophages (producing pro-inflammatory cytokines) and activated T cells (producing IL-2 and IFN- γ)
	PMR with TAB – (<i>n</i> = 9)		-Cytokine mRNA can be detected in TAB specimens from patients with PMR, indicating that at least some of these patients have subclinical vasculitis
	Controls with TAB – (<i>n</i> = 10)		-The profile of tissue T-cell cytokines suggests that GCA is a Th1-driven disease
Wagner et al. [25]	-GCA with TAB+ (<i>n</i> = 10)	-Immunohistochemistry: anti-CD68, anti-IL-6, anti-IL-1 β , Anti-72 KD type IV collagenase	-Tissue-infiltrating macrophages in active GCA showed a functional heterogeneity. Whereas some of them produce pro-inflammatory cytokines, others are specialized in producing type IV collagenase
	-PBMC (12 GCA, 7 PMR, 9 seropositive RA, 14 HC)	-In situ hybridization: IL-6 specific riboprobe	-PMR and GCA share the systemic component of the disease. A substantial proportion of circulating macrophages produced high amounts of IL-6 and IL-1 β mRNA
Emilie et al. [12]	GCA with TAB + (<i>n</i> = 9). 6 patients before CS Controls with TAB – (<i>n</i> = 3)	-RT-PCR: semiquantification of IL-6 and IL-1 β mRNA in PBMC	-IL-6 expression, both at mRNA and protein levels, was observed in tissue from GCA patients but not in controls -IL-6 producing cells were observed through the three tunics of the artery, but especially in contact with the IEL -Most of IL-6 producing cells have macrophage morphology. To a lesser extent, fibroblast-like cells also produced IL-6 -No IL-6 was detected in endothelial or giant cells -Tissue-infiltrating macrophages in active GCA showed a functional heterogeneity
		-Immunohistochemistry: anti-IL-6	
		-In situ hybridization: IL-6 specific riboprobe	
Weyand et al. [40]	-GCA with TAB + (<i>n</i> = 27)	-Immunohistochemistry: anti-CD68, anti-IL-6, anti-IL-1 β , Anti-72 KD type IV collagenase, anti-TGF β , anti-iNOS, anti-human α -smooth muscle actin -In situ hybridization: TGF β 1 specific riboprobe	-Macrophages localized at the adventitia produce pro-inflammatory cytokines and TGF β 1 -Macrophages localized at the intimal-medial junction produce type IV collagenase and iNOS
Weyand et al. [42]	GCA with TAB + (<i>n</i> = 23)	-PCR: semiquantification of cytokine mRNA	-The patterns of cytokine mRNA expression in TAB specimens of patients with GCA correlate with the different clinical manifestations.
Field et al. [47]	GCA with TAB + (<i>n</i> = 6) Controls with TAB – (<i>n</i> = 6)	-Oligonucleotide hybridization with cytokine-specific probes	-TNF α -containing cells were detected in all samples of the GCA patients, especially in areas characterized by the presence of giant cells around the intima and media -TNF α was mainly detected in macrophages near the IEL -No differences in the expression of p55 or p75 TNF α receptor
		-Immunohistochemistry: anti-CD68, anti-CD3, anti-TNF β , Anti-TNF β receptor (p55 and p75)	
Brack et al. [6]	GCA with TAB + (<i>n</i> = 11)	-PCR: semiquantification of cytokine mRNA	-Large-vessel GCA is characterized by increased IL-2 mRNA expression in TAB specimens.
	-Cranial GCA (<i>n</i> = 8)	-Oligonucleotide hybridization with cytokine-specific probes	
Cid et al. [43]	-Large-vessel GCA (<i>n</i> = 3)	-Immunohistochemical study: semi-quantitative score for angiogenesis by staining endothelial cells with <i>Ulex europaeus</i> lectin	-Patients without disease-related ischemic events had higher tissue angiogenic scores -Angiogenesis was more prominent in patients with a strong inflammatory response -Sera from patients without ischemia are more active in stimulating angiogenesis - Evaluation of TAB tissue cultures as a tool to study the pathogenesis of GCA -Limited number of patients and controls to draw definite conclusions
	GCA with TAB + (<i>n</i> = 31). Control patients with TAB – (<i>n</i> = 10), including 2 with PMR		
Blain et al. [22]	GCA (<i>n</i> = 7) TAB + Control patients (<i>n</i> = 15) TAB – with infections and neoplasias	-Culture of 3 mm TAB fragments with different concentrations of LPS -ELISA (Immunotech, Marseille, France) for cytokines in the supernatant	-Patients with disease-related ischemic events had significantly lower IL-6 mRNA concentrations and IL-6 protein expression -No significant differences for IL-1 β or TNF α
Hernandez-Rodriguez et al. [26]	GCA with TAB + (<i>n</i> = 66)	-RT-quantitative PCR for IL-1 β , IL-6, and TNF α (<i>n</i> = 31)	
		-Immunohistochemical study for IL-1 β , IL-6, and TNF α (<i>n</i> = 66)	
Wagner et al. [46]	GCA with TAB + (<i>n</i> = 14). Control patients with TAB – (<i>n</i> = 10), including 3 with PMR	-Immunohistochemistry: anti-CD68, anti-TNF α , anti-S-100, Anti-Talin, anti-TGF α , anti-TLR4, etc	-Co-localization of dendritic cells and activated T cells
		-In situ hybridization: TNF α specific riboprobe, etc	-TNF α is expressed at high levels in the granulomatous infiltrates -TLR4 is expressed by the same cell types that produce TNF α in the adventitia

Table 3 (continued)

Reference	Patients and controls	Determinations	Comments
Hernandez-Rodriguez et al. [41]	GCA with TAB+ (n = 74). Control patients with TAB – (n = 15), including 5 with PMR. 22% had received CS	-RT-quantitative PCR for IL-1 β , IL-6, and TNF α (n = 36 GCA; n = 11 controls) -Immunohistochemical study for IL-1 β , IL-6, and TNF α (n = 66)	-IL-1 β and IL-6 transcripts were higher in patients with a strong inflammatory response -Immunohistochemical scores for IL-1 β , TNF α and IL-6 were higher in patients with a strong inflammatory response -Significant correlation between tissue TNF α mRNA and CS requirements

GCA, Giant cell arteritis; PMR, polymyalgia rheumatica; HC, healthy controls; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; RA, rheumatoid arthritis; RT-quantitative PCR, real-time quantitative polymerase chain reaction; TAB, temporal artery biopsy; CS, corticosteroids; IEL, internal elastic laminae.

in a cohort of Spanish patients with GCA and no significant association with susceptibility or disease severity was found [52].

3.3.3. Tumor necrosis factor alpha (TNF α) gene

It has been reported that the polymorphism at position –308 of the TNF α promoter directly affects TNF α expression and production *in vitro* and *in vivo* [63]. A weak association between PMR and the TNF2 allele of this –308 promoter polymorphism was found by Boiardi et al. [51]. However, another study did not find any association with susceptibility or disease severity in patients with GCA [52]. In a different study [53], GCA was found to be strongly associated with the TNF α 2 microsatellite allele, and this association was found to be independent of the HLA-DRB1 alleles. Patients with isolated PMR were associated with TNF α 3 microsatellite polymorphisms, and also independent of HLA-DRB1 alleles. Patients with isolated PMR and those with GCA without polymyalgic symptoms could be differentiated by the frequency of the TNF α 10 allele (Table 5). It has been shown that HLA-DR3 haplotypes carrying TNF α 2 allele are associated with TNF α production by LPS-stimulated peripheral blood monocytes [64]. However, there is no data on the correlation between circulating levels of TNF α and the genetic polymorphisms in PMR and GCA.

3.3.4. Interferon-gamma (IFN- γ) and interleukin-4 (IL-4) genes

IFN- γ is a prototypic Th1 cytokine involved in host defense against intracellular microorganisms with a relevant role in the development of several inflammatory conditions. On the other hand, interleukin-4 is a prototypic Th2 cytokine involved in antibody responses in host defense and mediation of allergic reaction [65]. Functional polymorphisms resulting in high levels of IFN- γ production could change the Th1/Th2 balance, favoring the probability of developing Th1 disorders and decreasing the probability of a Th2-driven process. IL-4 has the inverse effect on the Th1/Th2 balance towards Th2 cytokine [64]. As stated above, GCA is considered as a prototypic Th1 disease, with IFN- γ playing a crucial role in the pathogenesis of this vasculitis [45]. Consistent with these findings, an association has been demonstrated between the 126-bp allele 3 of the IFN- γ gene, which causes the production of high levels of IFN- γ , and visual ischemic complications in Spanish patients with GCA [55]. However, in a similar study from the same group but analyzing 3 different SNPs within the intron 3 of the IFN- γ gene, no association with disease susceptibility or severity in patients with GCA was demonstrated. In this study a marginally significant association between GCA and some IL-4 SNPs was observed [54]. However, these results were more significant when the HLA-DRB1*04 status was considered. These data suggest an interaction between HLA-DRB1 and IL-4 that contributes to increasing disease susceptibility. Furthermore, the strong linkage disequilibrium among the IL-4 SNPs studied and the increased frequency for the T-T-C-A-C IL-4 haplotype found in HLA-DRB1*04-negative GCA patients suggests the presence of a functional haplotype in IL-4 that is implicated in GCA susceptibility in association with the HLA-DRB1 genes [54].

3.3.5. Interleukin-10 (IL-10) gene

Since IL-10 is a potent suppressor of the Th-1 response [66], its role in the immunopathogenesis of GCA may be of relevance. Recently, two studies done in Southern Europe showed diverging results on the influence in susceptibility of the IL-10 gene promoter in GCA patients [56,57]. The Italian study [55] found that GCA was significantly associated with a higher frequency of the A592 allele, especially in the homozygous state (Table 5). By contrast, the distribution of allele and genotype frequencies of the –1082 G/A polymorphisms did not differ significantly between GCA patients and controls. In the haplotype analysis, the frequency of the ATA haplotype was significantly higher in GCA, whereas the frequencies of the ACC and GTA haplotypes were significantly lower in GCA. No significant associations were found with the clinical features. *In vitro* studies of human PBMC have revealed a genetic component in the large interindividual differences in the production of IL-10 [11,67]. More specifically, the A592 allele has been found to correlate with low levels of LPS-stimulated IL-10 production. The same is true for the A allele of the –1082 G/A polymorphism and for the ATA haplotype [11]. Therefore, these data suggest that a genetically determined down-regulation of the IL-10 synthesis may be implicated in the pathogenesis of GCA. However, the Spanish study found an opposite result [57]. As shown in Table 5, these authors found no significant differences in the –592 C/A genotype and a decreased number of the –1082 A/A genotype in GCA. The frequency of the GTA haplotype was found to be significantly increased in GCA. The lack of agreement between these two well-designed studies [56,57] suggests that the exact role of IL-10 promoter polymorphisms in GCA is still unclear, and underscores the necessity to carry out more studies in different populations to clarify the role of these genetic variants in the pathogenesis of GCA.

3.4. Anti-cytokine therapy

CS are the drugs of choice in treating PMR and GCA. Although one of the most frequent side effects of CS therapy is osteoporosis, these drugs might also have a beneficial effect on bone turnover because of the control of the inflammatory process. As shown by Dolan et al. [68] in untreated PMR patients, IL-6 correlated with bone resorption markers that clearly improved after CS therapy.

However, CS-side effects are frequently observed and are clearly related with the cumulative CS dose [69,70]. Furthermore, there is also a significant proportion of patients with refractory disease that need continuous CS therapy during prolonged periods of time [71]. Due to these considerations, different therapeutic alternatives are needed in these patients. In this regard, methotrexate, the most frequently used drug in rheumatic disorders, has yielded conflicting results [72–77].

The recent availability of biological therapies with remarkable efficacy for other inflammatory conditions has open new expectations in the field of vasculitis. Several small series of patients and

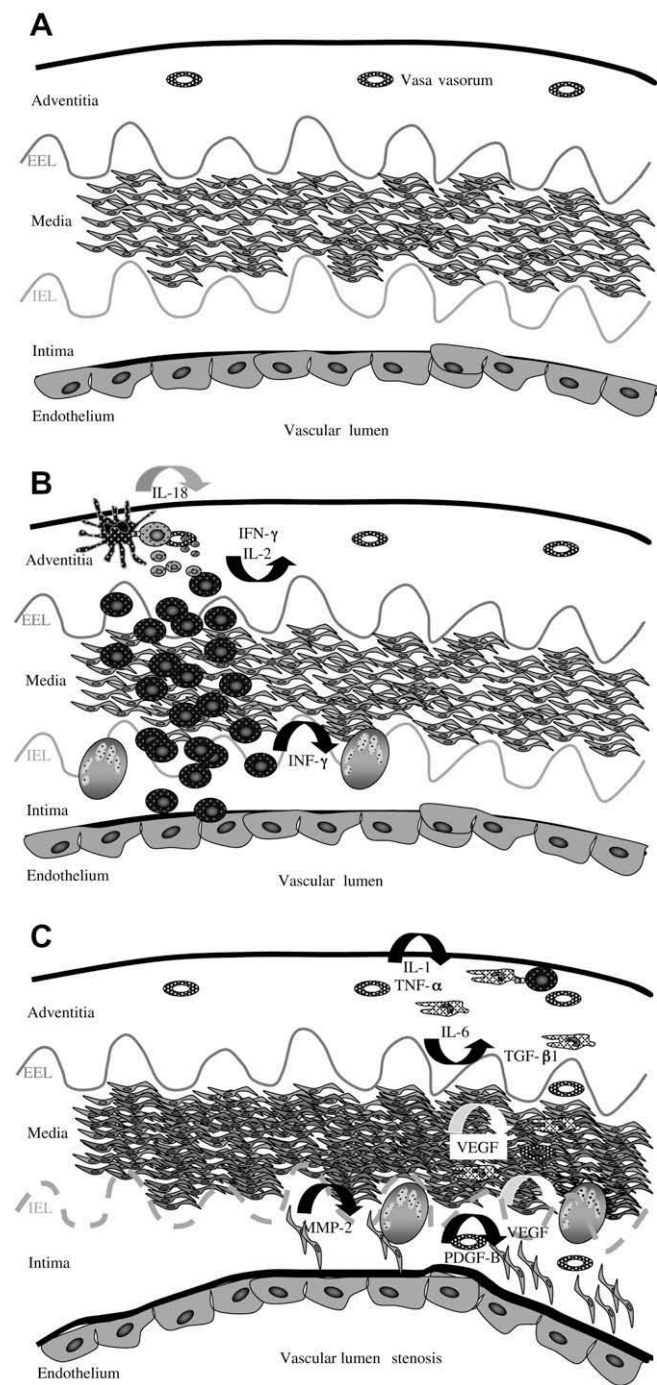


Fig. 1. Role of tissue cytokines in the pathogenesis of giant cell arteritis (GCA). (A) Temporal artery biopsy specimen: normal artery. (B) T cell-derived cytokines in temporal artery biopsy specimens. Activated dendritic cells in the adventitia recruit and present the antigen(s) to CD4+ T cells that became activated, undergo clonal expansion and produced cytokines, especially interleukin-2 (IL-2) and interferon-gamma (IFN-γ). IFN-γ is a key cytokine that regulates the differentiation and function of macrophages, and also correlates with the formation of giant cells. (C) Macrophage-derived cytokines in temporal artery biopsy specimens. Macrophages are also recruited to the artery wall through the vasa vasorum and differentiate in distinct subsets depending on their location in the arterial wall. Macrophages localized at the adventitia and along the medial-adventitial junction produce pro-inflammatory cytokines (IL-1β and IL-6) and transforming growth factor (TGF)-β 1. Macrophages localized at the intimal-medial junction produce type IV collagenase and reactive oxygen intermediates (ROI), implying a role of these products in tissue destruction. Macrophages and also giant cells produce growth factors and angiogenic factors that are responsible of the neoangiogenesis and intimal hyperplasia (VEGF: vascular endothelial growth factor; PDGF: platelet-derived growth factor).

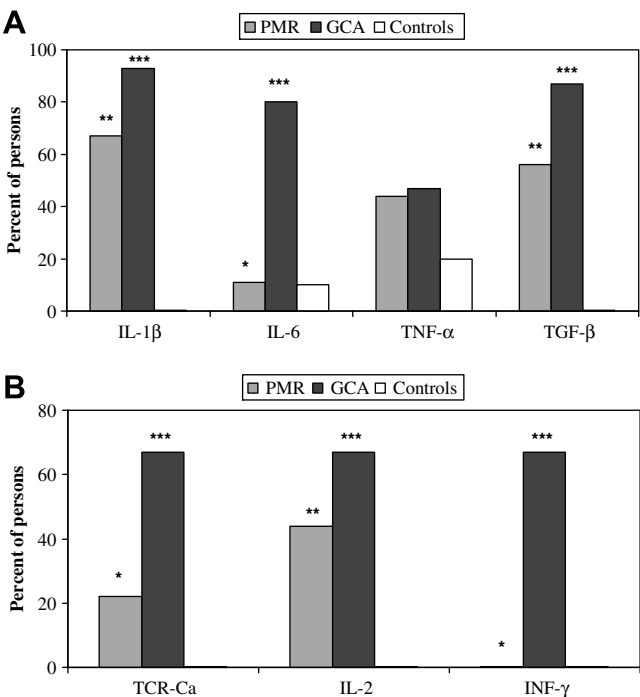


Fig. 2. Tissue cytokine profiles in patients with polymyalgia rheumatica (PMR) and giant cell arteritis (GCA). (A) Macrophage-derived cytokines in temporal artery biopsy specimens. (B) T cell-derived cytokines in temporal artery biopsy specimens. **p* < 0.05 PMR vs. GCA; ***p* < 0.05 PMR vs. controls; ****p* < 0.05 GCA vs. controls.

Table 4
Cytokines profile and clinical correlation in patients with giant cell arteritis (GCA)^c.

	TAB tissue					Circulating levels
Disease phenotype	IL-2	INF-γ	IL-1β	IL-6	TNFα	IL-6
PMR syndrome	++	–	+			
Ischemic manifestations ^a	+	+++	+++	+		+
Systemic manifestations ^b	++	+	+	+++		+++
Large vessel involvement	++	+	+			
Longer CS requirements			+/-	–	+++	

TAB, temporal artery biopsy; PMR, polymyalgia rheumatica.
^a Ischemic manifestation: visual symptoms, jaw claudication.
^b Systemic manifestation: fever, anorexia, weight loss.
^c Authors' conclusions are based on summary of the reports.

case reports have suggested the possible utility of TNF antagonists in patients with PMR [78–80] and GCA refractory to CS therapy [82–86]. Although these uncontrolled studies have shown remarkable efficacy and safety in this population, these data have not been confirmed in prospective controlled studies in patients with recent onset GCA or PMR treated with infliximab [87,88]. Infliximab has also been explored as monotherapy in patients with GCA [89]. However, and although the patients had a clear initial response, this was not followed by a sustained improvement. The authors suggested that infliximab should be used in GCA only for patients who are unresponsive to, or intolerant to CS [89].

4. Discussion

4.1. Circulating cytokines

As chronic inflammatory diseases, PMR and GCA represent a model for studying an imbalance in cytokine production and their kinetics during treatment. The study of circulating cytokines in these two conditions may be relevant in several aspects. First of all, as PMR and GCA are closely related syndromes, the circulating

Table 5

Studies on cytokines gene polymorphisms in patients with giant cell arteritis (GCA) and polymyalgia rheumatica (PMR).

Reference	Patients and controls	Genotyping technique	Gene polymorphisms analyzed	Comments
Gonzalez-Gay et al. [48]	GCA (n = 62) TAB + PMR (n = 84) HC (n = 124)	-PCR amplification -RFLP (NlaIII)	IL-6 promoter: –174 G/C	-GCA patients with PMR symptoms have an increased frequency of allele C (p = 0.03) and CC genotype (p = 0.008). The increased frequency in this group was mainly due to the subgroup of HLA-DRB1*04 negative patients -No significant associations with clinical features or prognosis
Salvarani et al. [49]	GCA (n = 126) TAB + HC (n = 112)	-PCR amplification -RFLP (NlaIII)	IL-6 promoter: –174 G/C	-No implication in susceptibility (even in GCA patients with PMR symptoms) -No significant associations with clinical features or prognosis
Boiardi et al. [50]	PMR (n = 120) HC (n = 112)	-PCR amplification -RFLP (NlaIII)	IL-6 promoter: –174 G/C	-No implication in susceptibility -No significant associations with relapses/recurrences -Patients homozygous for the C allele had significantly higher values of IL-6 -CC homozygosity was significantly more frequent in patients with persistently elevated IL-6 -CC homozygosity in HC was associated with higher levels of IL-6
Boiardi et al. [51]	PMR (n = 92) TAB + in 6 HC (n = 79)	-PCR amplification	IL-1A (+4845) IL-1B (+3954; –511) IL-1RN intron 2 VNTR TNFα (–308)	-No implication of IL-1A or IL-1B genes in susceptibility -Significant association of IL-1RN*2 in the homozygous state with PMR (OR: 8.46; 95%CI: 1.05–68.31) -Weak association between the TNF2 allele with PMR (OR: 2.09; 95%CI: 1.0–4.17) -None of the genes were associated with disease severity
Gonzalez-Gay et al. [52]	GCA (n = 57) TAB + HC (n = 128)	-Taqman 5' allelic discrimination assay	IL-1A (+4845) IL-1B (+3954; –511) IL-1RN intron 2 VNTR TNFα (–308)	-No association with disease susceptibility or severity
Mattey et al. [53]	GCA (n = 62) TAB + PMR (n = 74) HC (n = 147)	-PCR amplification -Applied Biosystems automated DNA sequencer	TNF microsatellite markers (a,b,c,d)	-TNFa2 was significantly increased in GCA+PMR-compared to controls (OR: 2.5; 95%CI: 1.3–4.8) -TNFa10 was significantly decreased in GCA+PMR-compared to controls (OR: 0.3; 95%CI: 0.1–0.8) -TNFb3 was significantly increased in PMR + GCA-compared to controls (OR: 4.0; 95%CI: 2.0–8.7) -TNFa10 was significantly decreased in GCA+PMR-compared to PMR + GCA – (OR: 0.28; 95%CI: 0.06–0.93) -No associations with clinical manifestations
Gonzalez-Gay et al. [55]	GCA (n = 59) TAB + PMR (n = 74) HC (n = 129)	-PCR amplification -Applied Biosystems automated DNA sequencer	INF-γ microsatellite dinucleotide CA repeat (alleles 1 to 7), intron 1	-No differences of this INF-γ polymorphism between PMR/GCA patients and controls -The frequency of INF-γ*4 allele was reduced in GCA compared to PMR -GCA patients with visual ischemic manifestations showed a reduced frequency of INF-γ*4 allele (OR: 0.36; 95%CI: 0.13–1.0) and an increased frequency of *3 allele (OR: 3.3; 95%CI: 1.27–7.68) compared to patients without visual symptoms
Amoli et al. [54]	GCA (n = 82) TAB + HC (n = 102)	Taqman System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)	-INF-γ: Intron 3: SNP1 (rs1861494), SNP2 (rs1861493), SNP3 (rs2069718) -IL-4*: Exon 1: SNP1 (rs2070874), Intron 2: SNP2 (rs2227284), SNP3 (rs2227282), SNP4 (rs2243266), SNP5 (rs2243267)	-No influence of INF-gene polymorphism in disease susceptibility -Significant increase in the carriage of IL-4 SNP3* C allele in GCA (OR: 1.8; 95%CI: 0.9–3.5). Significant differences in allele and genotype frequencies for the IL-4 SNPs tested between HLA-DRB1*04 negative patients and controls. Significant risk of developing GCA in HLA-DRB1*04 negative patients that carriage the IL-4 SNP2*T allele (OR: 4.2; 95%CI: 1.1–15.6). Significant increase in the frequency of T–T–C–A–C IL-4 haplotype in HLA-DRB1*04 negative GCA (OR: 2.0; 95%CI: 1.0–3.9)
Boiardi et al. [56]	GCA (n = 140) TAB + HC (n = 200)	-PCR amplification -RFLP (Rsa I, ECO NI)	IL-10 promoter: –592 C/A –1082 G/A	-Significant association of the A592 allele with GCA, specially in homozygous for the A allele -No association with –1082 G/A -Higher frequency of ATA haplotype in GCA, and lower frequency of ACC and GTA -No significant associations with clinical features

(continued on next page)

Table 5 (continued)

Reference	Patients and controls	Genotyping technique	Gene polymorphisms analyzed	Comments
Rueda et al. [57]	GCA (n = 103) TAB + HC (n = 226)	-Taqman 5' allelic discrimination assay	IL-10 promoter: –592 C/A –1082 G/A	-Significant reduction of A/A –1082 genotype in GCA -No association with –592 C/A -Decrease frequency of ATA haplotype in GCA, and increase of a rare GTA haplotype in GCA -No significant associations with clinical features

GCA, Giant cell arteritis; PMR, polymyalgia rheumatica; HC, healthy controls; RFLP, restriction fragment length polymorphisms; TAB, temporal artery biopsy; PCR, polymerase chain reaction; IL, interleukin; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; INF- γ , interferon gamma.

cytokine profile may help to distinguish both conditions, and also to predict which patients are at high risk of developing ischemic complications. Secondly, nowadays there is a lack of clinical and laboratory markers that can predict the clinical course of the disease, especially the diagnosis of relapse and the identification of subgroups of patients with a more chronic disease. The identification of a cytokine profile that can help to identify subgroups of patients with a worse prognosis may contribute to better and more individualized management of these patients. And finally, the identification of a characteristic or predominant cytokine profile in these syndromes may also help to treat these patients with more specific anti-cytokine therapies.

The major limitations of the studies done up to now in PMR and GCA come from the designs of the studies in general. Most of them include a limited number of patients [12,14,16,19,22,28], and in some of them the diagnosis of both syndromes is not clearly established [17,19,31,38]. Furthermore, some studies include a mixture of patients with active disease and patients on CS therapy [17,31,38]. Other difficulties in interpreting the results of the different studies come from differences in the kits used for cytokine measurements. And finally, circulating cytokine studies are influenced by half-life and stability of the cytokine, and also by the presence of inhibitors [21].

Although there is information on multiple circulating cytokines, only IL-6 has shown consistent results within multiple studies [12–21]. PMR and GCA are characterized by a hyperproduction of IL-6, and CS therapy is followed by a significant decrease of IL-6 levels. From clinical experience it can be assumed that partial suppression of IL-6 is sufficient to control the systemic manifestations of these syndromes and to prevent most vascular complications in GCA. However, there are at least two observations that suggest that CS therapy does not affect the underlying disease mechanisms in these syndromes. First, and although clinical symptoms are rapidly improved by CS therapy and acute phase proteins decrease, in many patients IL-6 levels do not return to normal values [15,16,24,29]. And second, in patients with PMR in apparent complete clinical remission with CS, withdrawal of therapy results in relapse of disease within 48 h [14]. Several lines of evidence have supported the concept that CS do not eradicate vasculitis, but only transiently down-regulate pro-inflammatory cytokines. Treatment of human TAB-SCID mice chimeras with high dose CS, led to inhibition of the production of several pro-inflammatory cytokines but no others, and the vascular lesions remained intact. In fact, in the TAB-SCID chimera model, doses equivalent to 30 mg/kg/day of prednisone in humans were required for complete suppression of IL-6 in the tissue [90]. These findings are also consistent with anecdotal clinical findings such as persistent arteritis in patients with long lasting and CS treated GCA [3]. Furthermore, the increased risk of developing thoracic aortic aneurysms, despite long-term CS treatment, also rises the question of whether CS therapy is as effective in preventing long-term complications [91,92].

From a practical point of view, the utility of cytokine determination in the initial diagnosis of PMR and GCA seems to be minimal. There is also certain disagreement in the different studies between the correlation of the circulating IL-6 levels and the parameters that reflect the acute phase reaction. However, the close correlation between serum levels of IL-6 and disease symptoms has led to the suggestion that estimation of IL-6 may be useful in monitoring patients with PMR and GCA [27]. Unlike the ESR, IL-6 protein levels are not subjected to interference from factors such as anemia, red cell morphology, or concentration of plasma proteins [24]. However, as IL-6 is a non-specific marker of inflammation, intercurrent diseases and/or subclinical infections might affect the circulating levels of this cytokine. Although IL-6 appears to be a candidate indicator to assess disease activity and prognosis in PMR and GCA, the determination of circulating IL-6 levels in clinical practice, needs well-designed prospective trials to clearly show its utility [27]. Furthermore, the use of recently described clinical tools for monitoring disease activity in PMR patients may also help to assess the utility of new biomarkers such as IL-6 [93–95].

A crucial issue in the management of patients with GCA is to identify a cytokine profile that can help to predict which patients are at high risk of developing ischemic complications. In this regard, Cid and co-workers [26] identified IL-6, both in serum and in the tissue, as the unique pro-inflammatory cytokine significantly reduced in patients with ischemic events. These investigators hypothesized that IL-6 might have direct effects on vascular components that may help to prevent vessel occlusion or compensate ischemia [26]. Patients who do not develop ischemic complications, besides having a more remarkable acute-phase response, have more prominent neovascularization in lesions and stronger angiogenic activity [43]. Furthermore, *in vitro* experiments demonstrated that recombinant IL-6 had stimulated endothelial growth in a dose-dependent manner and the morphological differentiation of cultured endothelial cells into capillary-like structures. Both effects were abrogated by the addition of recombinant sIL-6r [26]. Neovascularization is also more remarkable in patients with a strong systemic acute-phase response and who are also stronger producers of IL-6. Therefore, the angiogenic activity of IL-6 might be an important compensatory mechanism for ischemia in GCA [43].

Recently, the scenario of CD4⁺ T cells has been enriched by the definition of new T cell subsets. Among them, the Th17 cells have been described and have gained relevance in the pathogenesis of autoimmune and inflammatory disorders [96]. These cells are characterized by the production of IL-17. IL-23 and IL-6 are the two most important cytokines responsible for the induction of IL-17 secreting cells [96]. Data from our laboratory have showed an increased serum concentration of IL-17 in GCA patients with active disease compared to PMR, and a correlation of IL-17 levels with the clinical manifestations of GCA (Alvarez Rodriguez L et al, manuscript submitted). Whether Th17 induction is a key element in the pathogenesis of GCA should be confirmed in a larger number of patients

and the presence of Th17 cells should also be addressed in TAB specimens from GCA patients.

Whereas IL-6 concentrations were significantly higher in untreated patients than in normal subjects, this was not the case for TNF α or IL-1 β [14]. Although IL-1 β can be detected in TAB lesions from patients with GCA, serum levels of IL-1 β are below the detection threshold in most patients, and suggest a less relevant participation of IL-1 β in the systemic inflammatory response in GCA [20]. The fact that IL-1 β and TNF α serum levels are not raised would suggest that the source of the IL-6 may be activated endothelial cells rather than circulating monocytes from which concomitant release of TNF α and IL-1 β would be expected [14]. An alternative explanation for this finding is that monocyte-derived cytokines appear with a particular pattern bias in the plasma of untreated patients. Therefore, the selective induction of IL-6, but not IL-1 β and TNF α , raises the possibility of there being an IL-6 specific inducer mechanism [14]. Finally, the detection of these proinflammatory cytokines could be conditioned by technical problems. Nevertheless, the apparent dominant role of circulating IL-6 over the other cytokines points to a clear target for the treatment of these two disorders. However, the positive influence of IL-6 on the compensatory angiogenesis in these patients should be also taken into consideration.

Nowadays, there is evidence that the net effect of IL-10 is to suppress inflammation in a variety of diseases that are characterized by a prevalent Th-1 response [66,97]. In PMR, overexpression of IL-10 may be a positive circumstance that may ameliorate the disease. With respect to possible common pathogenic mechanisms in PMR and GCA, one might speculate that patients with PMR may have an increased tissue IL-10 expression compared to patients with GCA, which may protect them from overt arteritis [31]. This hypothesis is also consistent with the results of Boiardi and co-workers [56] that suggest that a genetically determined down-regulation of the IL-10 synthesis may be implicated in the pathogenesis of GCA and a relative impairment of IL-10 synthesis could favor the development of a full-blown Th-1 response, leading to the classic histological and clinical features of GCA [11]. This important issue should be addressed in a large and well-defined population of PMR patients.

4.2. Tissue cytokines

The study of the role of tissue cytokines has provided important insights into the pathogenic mechanisms implicated in the local inflammatory response that occurs in GCA (Fig. 1). The initial works showed that activated macrophages and activated T cells characterized the inflammatory lesions in patients with GCA [39,98–100]. In patients with PMR, cytokine mRNA can be detected in TAB specimens despite the lack of microscopic evidence of tissue infiltrating cells. More importantly, IFN- γ was not found at all in the tissue samples from patients with PMR. Thus, the local secretion of IFN- γ may represent an important amplification loop leading to overt arteritis in patients with GCA [39]. In particular, a small proportion of CD4+/IFN- γ secreting cells directs the differentiation and activation of tissue macrophages and the formation of the granulomatous infiltrate [45]. In addition, the presence of IFN- γ mRNA in the tissue specimens of GCA patients is associated with the development of the classic ischemic complications of GCA [42]. Furthermore, an association has been demonstrated between the 126-bp allele 3, which causes the production of high levels of IFN- γ , and visual ischemic complications in GCA patients [55]. Cytokine studies done in TAB tissue have shown synthesis of macrophage-derived and T cell-derived cytokine mRNA in the inflamed arterial wall of all GCA patients [39,42]. However, the profile of cytokine mRNA was quite dis-

tinct and showed a correlation with clinical presentation. As shown in Table 4, patients with ischemic manifestations were characterized by the increased expression of IL-1 β and IFN- γ transcripts [42]. Furthermore, it has been shown that ischemic events occurred more frequently in patients who developed a relatively weak systemic acute phase response [26]. In fact, IL-6 expression in TAB specimens and circulating levels of IL-6 were significantly reduced in patients with ischemic complications. It has been hypothesized that IL-6 might have direct effects on vascular components that may help to prevent vessel occlusion or compensate ischemia [26].

4.3. Cytokines polymorphisms

PMR and GCA are multifactorial diseases, with both environmental and genetic factors contributing to susceptibility and severity. During the last two decades there have been a number of studies reporting genetic associations with genes that lie within the HLA-complex [101–106]. As these two disorders are characterized by an increased acute –phase response, additional genes, particularly those involved in the inflammatory process, probably predispose patients to the development of PMR and GCA. The reasoning behind the proposed involvement of cytokine gene polymorphisms in susceptibility or disease severity is that they may influence *in vivo* cytokine levels [11]. This presumption is based on the observation that individuals differ with respect to the level of cytokine production *in vivo* or after *in vitro* culture of their cells, and that differences may be attributed partly to single-nucleotide polymorphisms of their cytokine genes. However, a detailed review of the literature usually shows contradictory results [11]. These findings may be explained by differences in the methodology or patient selection.

As shown in Table 5, all the studies on cytokine gene polymorphisms have been done in two well-characterized series of patients with PMR/GCA from Southern Europe. The scarce number of studies, the fact that all of them are restricted to two selected geographic areas, and that in some cases these studies showed conflicting results, makes it difficult to evaluate the exact contribution of cytokine gene polymorphisms to the pathogenesis of PMR and GCA. The finding that genetic studies usually yield different results cannot be explained by the study design in this case. The study designs are similar in that both are population-based. Furthermore, the clinical spectrum of GCA in these two Southern European regions is similar [107]. Thus, allelic variations existing between these ethnic groups and possibly modulation by other genetic or environmental factors that vary between the populations studied may contribute to explain the discordant results of the two studies. Furthermore, regional differences in several polymorphisms have been reported, and that might be the case among some regions of Spain and Italy [53,101,108–110]. Finally, since PMR and GCA develop only in aged individuals, it is possible that susceptibility of PMR/GCA may also occur because of an age-related deregulation of cytokine production. In order to conclusively settle the question of whether there is a significant association between a genetic polymorphism, further adequately sized studies in various populations are required. This fact might be crucial in diseases with a relatively low prevalence, and multicentre collaborative studies will be of special importance.

4.4. Implications for treatment

Although the initial clinical response of PMR and GCA to CS is certainly impressive, the long-term consequences of CS therapy are far from optimal in this aged population. It seems prudent as well to consider the possibility that persistent sub-clinical inflam-

Table 6

Possible therapeutic targets in patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis.

Target	Agent	Comments
TNF	-Infliximab -Etanercept -Adalimumab	-No benefit in recent onset PMR and GCA. Possible utility in refractory cases? -Possible utility in refractory cases? -Possible utility in refractory cases?
IL-6	-Tocilizumab	-No clinical experience
IL-1 β	-IL-1ra -IL-1-trap	-No clinical experience -Under investigation
INF- γ	Anti-INF- γ mAb	No clinical experience
IL-10	rh IL-10	No clinical experience
APC-T cell interaction	CTLA4-Ig	No clinical experience

TNF, tumor necrosis factor; IL, interleukin; IL-1ra, interleukin 1 receptor antagonist; INF- γ , interferon gamma; APC, antigen presenting cell; rh, recombinant human.

mation could enhance the risk of vascular disease in patients with PMR, and especially GCA. Unfortunately, classic CS-sparing regimens have been used with limited success in both conditions. There are also conflicting results regarding the utility of TNF antagonists in PMR and GCA [78–89,111,112]. Whereas there are some encouraging results in patients with refractory disease or with significant CS-related toxicity [78–86], these favorable observations have not been confirmed in prospective controlled studies with infliximab in patients with recent onset GCA or PMR [87,88]. The reported efficacy and safety of TNF antagonists in patients with refractory disease or significant CS side should be confirmed in prospective controlled study trials in patients with refractory PMR and GCA that include an appropriate number of patients and also a sufficient follow-up. It is reasonable to assume that in conditions like PMR or GCA in which the response to CS is a hallmark of the disease, it will be difficult to obtain a significant advantage for any initial treatment, especially in trials with a short-term follow-up. It seems logical to try new, potentially effective, but also expensive and dangerous, therapies in patients that can benefit most. That means patients with refractory disease or with a significant risk of toxicity secondary to CS therapy. Afterwards, and in the case of proven efficacy in these high-risk populations, these new agents could be reasonably used in patients with recent onset disease.

The important advance in the knowledge of the role of cytokines in the pathogenesis of PMR and GCA have clear implications for treatment, as we now have available an increasing number of effective biologic agents directed against cytokines that can be used in these disorders (Table 6). Another key element derived from the recognition of the fine elements that control cytokines in PMR and GCA, is the identification of the subgroup of patients with refractory disease that might help to select patients that can benefit from steroid-sparing agents, including biologicals. In this regard, B or T cell depletion could even be useful as adjunct therapy in these disorders as some letters have suggested [113]. However, it is not clear how depletion therapies could help in the management of PMR and GCA. Furthermore, there is some controversy on the contribution of T cell numbers disturbances to the disease pathogenesis [114–116].

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundación Marqués de Valdecilla, Fundación Mutua Madrileña, and Fondo de Investigación Sanitaria (PI050475). Lorena Alvarez was supported by a grant for Research Aid from Wyeth Pharma.

References

- [1] Martínez-Taboada VM, Goronzy JJ, Weyand CM. Conceptos actuales sobre la patogenia de la arteritis de células gigantes. *Rev Esp Reumatol* 1994;2:293–9.
- [2] Armona J, Rodríguez Valverde V, González-Gay MA, Figueroa M, Fernández-Suerio JL, Blanco R, et al. Arteritis de células gigantes. Estudio de 191 pacientes. *Med Clin (Barc)* 1995;105:734–7.
- [3] Martínez-Taboada V, Blanco R, Rodríguez-Valverde V. Arteritis de células gigantes. *Seminarios de Reumatología* 2000;1:141–57.
- [4] Huston KA, Hunder GG, Lie JT, Kennedy KH, Elveback LR. Temporal arteritis. A 25-year epidemiological, clinical and pathologic study. *Ann Intern Med* 1978;88:162–7.
- [5] González-Gay MA, Blanco R, Rodríguez-Valverde V, Martínez-Taboada VM, Delgado-Rodríguez M, Figueroa M, et al. Permanent visual loss and cerebrovascular accidents in giant cell arteritis. Predictors and response to treatment. *Arthritis Rheum* 1998;41:1497–504.
- [6] Brack A, Martínez-Taboada VM, Stanson A, Goronzy JJ, Weyand CM. Disease pattern in cranial and large-vessel giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:311–7.
- [7] Chuang TY, Hunder GG, Ilstrup DM, Kurland LT. Polymyalgia rheumatica: a 10-year epidemiologic and clinical study. *Ann Intern Med* 1982;97:672–80.
- [8] González-Gay MA, Rodríguez-Valverde V, Blanco R, Fernández-Sueiro JL, Armona J, Figueroa M, et al. Polymyalgia rheumatica without significantly increased ESR: a more benign syndrome. *Arch Intern Med* 1997;157:317–20.
- [9] Rodríguez-Valverde V, Sarabia JM, González-Gay MA, Figueroa M, Armona J, Blanco R, et al. Risk factors and predictive models of giant cell arteritis in polymyalgia rheumatica. *Am J Med* 1997;102:331–6.
- [10] Hunder GG, Sheps SG, Allen GL, Joyce JW. Daily and alternate-day corticosteroid regimens in treatment of giant cell arteritis: comparison in a prospective study. *Ann Intern Med* 1975;82:613–8.
- [11] Warlé MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WC, Perrey C, Zondervan PE, et al. Are cytokine polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles? *Liver Transpl* 2003;9:170–81.
- [12] Emilie D, Liozon E, Crevon MC, Lavignac C, Portier A, Liozon F, et al. Production of interleukin 6 by granulomas of giant cell arteritis. *Hum Immunol* 1994;39:17–24.
- [13] Lecron JC, Roblot P, Chevalier S, Morel F, Alderman E, Gombert J, et al. High circulating leukaemia inhibitory factor in patients with giant cell arteritis: independent regulation of LIF and IL-6 under corticosteroid therapy. *Clin Exp Immunol* 1993;92:23–6.
- [14] Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1286–94.
- [15] Corrigan VM, Dolan AL, Dasgupta B, Panayi GS. The sequential analysis of T lymphocyte subsets and interleukin-6 in polymyalgia rheumatica patients as predictors of disease remission and steroid withdrawal. *Br J Rheumatol* 1997;36:976–80.
- [16] Uddhammar A, Sundqvist KG, Ellis B, Rantapää-Dahlqvist S. Cytokines and adhesion molecules in patients with polymyalgia rheumatica. *Br J Rheumatol* 1998;37:766–9.
- [17] Straub RH, Glück T, Cutolo M, Georgi J, Helmke K, Schölermerich J, et al. The adrenal steroid status in relation to inflammatory cytokines (interleukin-6 and tumor necrosis factor) in polymyalgia rheumatica. *Rheumatology* 2000;39:624–31.
- [18] Cutolo M, Straub RH, Foppiani L, Prete C, Pulsatelli L, et al. Adrenal gland hypofunction in active polymyalgia rheumatica Effect of glucocorticoid treatment on adrenal hormones and interleukin 6. *J Rheumatol* 2002;29:748–56.
- [19] Cutolo M, Montecucco CM, Cavagna L, Caporali R, Capellino S, Montagna P, et al. Serum cytokines and steroidal hormones in polymyalgia rheumatica and elderly-onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1438–43.
- [20] Hernández-Rodríguez J, García-Martínez A, Casademont J, Filella X, Esteban MJ, López-Soto A, et al. A strong initial systemic inflammatory response is associated with higher corticosteroid requirements and longer duration of therapy in patients with giant-cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2002;47:29–35.
- [21] Roblot P, Morel F, Lelievre E, Gascan H, Wijdenes J, Lecron JC. Serum cytokine and cytokine receptor levels in patients with giant cell arteritis during corticosteroid therapy. *J Rheumatol* 1996;23:408–10.
- [22] Blain H, Abdelmoutaleb I, Belmin J, Blain A, Floquet J, Guéant JL, et al. Arterial wall production of cytokines in giant cell arteritis: results of a pilot study using human temporal artery cultures. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002;57:M241–5.
- [23] Dasgupta B, Panayi GS. Interleukin-6 in serum of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Br J Rheumatol* 1990;29:456–8.
- [24] Weyand CM, Fulbright JW, Hunder GG, Evans JM, Goronzy JJ. Treatment of giant cell arteritis: interleukin-6 as a biologic marker of disease activity. *Arthritis Rheum* 2000;43:1041–8.
- [25] Wagner AD, Goronzy JJ, Weyand CM. Functional profile of tissue infiltrating and circulating CD68+ cells in giant cell arteritis. Evidence for two components of the disease. *J Clin Invest* 1994;94:1134–40.
- [26] Hernández-Rodríguez J, Segarra M, Vilardell C, Sánchez M, García-Martínez A, et al. Elevated production of interleukin 6 is associated with a lower incidence of disease-related ischemic events in patients with giant-cell

- arteritis. Activity of interleukin 6 as a potential protective mechanism. *Circulation* 2003;107:2428–34.
- [27] Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, Hunder GG. Laboratory investigations useful in giant cell arteritis and Takayasu arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21(Suppl. 32):S23–8.
 - [28] Caplanne D, Le Parc JM, Alexandre JA. Interleukin-6 in clinical relapses of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 1996;55:403–4.
 - [29] Weyand CM, Fulbright JW, Evans JM, Hunder GG, Goronzy JJ. Corticosteroid requirements in polymyalgia rheumatica. *Arch Intern Med* 1999;159:577–84.
 - [30] Tellus M, Byron K, Sachthep S, Ratnaike S, Wicks I. Cytokines in polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum* 1996;39:1264–5.
 - [31] Straub RH, Herfarth HH, Rinkes B, Konecna L, Gluck T, von Landenberg P, et al. Favorable role of interleukin 10 in patients with polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol* 1999;26:1318–25.
 - [32] Pountain G, Hazleman B, Cawston TE. Circulating levels of IL-1beta, IL-6 and soluble IL-2 receptor in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1998;37:797–8.
 - [33] Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005;201:1355–9.
 - [34] Moreau JF, Donaldson DD, Bennett F, Witek-Giannotti J, Clark SC, Wong GG. Leukaemia inhibitory factor is identical to the myeloid growth factor human interleukin for DA cells. *Nature* 1988;336:690–2.
 - [35] Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, et al. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 1992;255:1434–7.
 - [36] Ip NY, Nye SH, Boulton TG, David S, Taga T, Li Y, et al. CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing gp130. *Cell* 1992;69:1121–32.
 - [37] Gearing DP, Thut CJ, VandenBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, et al. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J* 1991;10:2839–48.
 - [38] Straub RH, Georgi J, Helmke K, Vaith P, Lang B. In polymyalgia rheumatica serum prolactin is positively correlated with the number of typical symptoms but not with typical inflammatory markers. *Rheumatology* 2002;41:423–9.
 - [39] Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ, et al. Tissue cytokine patterns distinguish polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Intern Med* 1994;121:484–91.
 - [40] Weyand CM, Wagner AD, Björnsson J, Goronzy JJ. Correlation of the topographical arrangement and the functional pattern of tissue-infiltrating macrophages in giant cell arteritis. Evidence for two components of the disease. *J Clin Invest* 1996;98:1642–9.
 - [41] Hernández-Rodríguez J, Segarra M, Vilardell C, Sánchez M, García-Martínez A, Esteban MJ, et al. Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1b, TNF α and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. *Rheumatology* 2004;43:294–301.
 - [42] Weyand CM, Tetzlaff N, Björnsson J, Brack A, Younge B, Goronzy JJ. Disease patterns and tissue cytokine profiles in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:19–26.
 - [43] Cid MC, Hernández-Rodríguez J, Esteban MJ, Cebrian M, Gho YS, Font C, et al. Tissue and serum angiogenic activity is associated with low prevalence of ischemic complications in patients with giant cell arteritis. *Circulation* 2002;106:1664–71.
 - [44] Goronzy JJ, Weyand CM. Cytokines in giant cell arteritis. *Clev Clin J Med* 2002;69(Suppl):S11–91–4.
 - [45] Wagner AD, Björnsson J, Bartley GB, Goronzy JJ, Weyand CM. Interferon-gamma-producing T cells in giant cell vasculitis represent a minority of tissue-infiltrating cells and are located distant from the site of pathology. *Am J Pathol* 1996;148:1925–33.
 - [46] Wagner AD, Wittkop U, Prahst A, Schmidt WA, Gromnica-Ihle E, Vorpahl K, et al. Dendritic cells co-localize with activated CD4+ T cells in giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2003;21:185–92.
 - [47] Field M, Cook A, Gallagher G. Immuno-localisation of tumour necrosis factor and its receptors in temporal arteritis. *Rheumatol Int* 1997;17:113–8.
 - [48] Gonzalez-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, Garcia-Porrúa C, Matthey DL, Amoli MM, et al. IL-6 promoter polymorphism at position -174 modulates the phenotypic expression of polymyalgia rheumatica in biopsy-proven giant-cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:179–84.
 - [49] Salvarani C, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni P, et al. Interleukin-6 promoter polymorphisms at position -174 in giant-cell arteritis. *J Rheumatol* 2005;32:2173–7.
 - [50] Boiardi L, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Cantini F, et al. Relationship between interleukin-6 promoter polymorphisms at position -174, IL-6 serum levels, and risk of relapse/recurrence in polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol* 2006;33:703–8.
 - [51] Boiardi L, Salvarani C, Timms JM, Silvestri T, Macchioni PL, di Giovine FS. Interleukin-1 cluster and tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:675–81.
 - [52] Gonzalez-Gay MA, di Giovine FS, Silvestri T, Amoli MM, Garcia-Porrúa C, Thomson W, et al. Lack of association between IL-1 cluster and TNF- α gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2002;20:431–2.
 - [53] Matthey DL, Hajeer AH, Dababneh A, Thomson W, Gonzalez-Gay MA, García-Porrúa C, et al. Association of giant-cell arteritis and polymyalgia rheumatica with different tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms. *Arthritis Rheum* 2000;43:1749–55.
 - [54] Amoli MM, González-Gay MA, Zeggini E, Salway F, García-Porrúa C, Ollier WER. Epistatic interactions between HLA-DRB1 and interleukin 4, but not interferon-gamma, increase susceptibility to giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2004;31:2413–7.
 - [55] González-Gay MA, Hajeer AH, Dababneh A, García-Porrúa C, Amoli MM, Llorca J, et al. Interferon-gamma gene microsatellite polymorphisms in patients with biopsy-proven giant cell arteritis and isolated polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol* 2004;22(Suppl. 36):S18–20.
 - [56] Boiardi L, Casali B, Farnetti E, Pipitone N, Nicoli D, Macchioni P, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms in giant-cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:4011–7.
 - [57] Rueda B, Roibas B, Martin J, Gonzalez-Gay MA. Influence of interleukin-10 promoter polymorphisms in susceptibility to giant-cell arteritis in Northwestern Spain. *J Rheumatol* 2007;34:1535–9.
 - [58] Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of a novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998;102:1369–76.
 - [59] Nicklin M, Weith A, Duff G. A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 α , interleukin-1 β and the interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics* 1994;19:382–4.
 - [60] Tarlow JK, Blakemore AL, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993;91:403–4.
 - [61] González-Gay MA. Genetic epidemiology. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica. *Arthritis Res* 2001;3:154–7.
 - [62] Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* 1995;99:303–10.
 - [63] Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lanfontaine N, Roland S, et al. Tumor necrosis factor gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998;113:401–6.
 - [64] Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Mölvig J, Worsaae H, Abbal M, et al. Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF α and TNF β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Immunol* 1993;23:224–31.
 - [65] Toh ML, Miossec P. The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:284–8.
 - [66] Scumpia PO, Moldawer LL. Biology of interleukin-10 and its regulatory roles in sepsis syndromes. *Crit Care Med* 2005;33(Suppl. 12):S468–71.
 - [67] Reuss E, Fimmers R, Kruger A, Becker C, Rittner C, Höhler T. Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors – a twin study. *Genes Immun* 2002;3:407–13.
 - [68] Dolan AL, Moniz C, Dasgupta B, Li F, Mackintosh C, Todd P, Corrigan V, et al. Effects of inflammation and treatment on bone turnover and bone mass in polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum* 1997;40:2022–9.
 - [69] Gabriel SE, Sunk J, Salvarani C, ÓFallon WM, Hunder GG. Adverse outcomes of antiinflammatory therapy among patients with polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum* 1997;40:1873–8.
 - [70] Proven A, Gabriel SE, Orces C, ÓFallon WM, Hunder GG. Glucocorticoid therapy in giant cell arteritis: duration and adverse outcomes. *Arthritis Rheum* 2006;49:703–8.
 - [71] Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *N Engl J Med* 2002;347:261–71.
 - [72] Hernández-García C, Soriano C, Morado C, Ramos P, Fernández-Gutiérrez B, Herrero M, et al. Methotrexate treatment in the management of giant cell arteritis. *Scand J Rheumatol* 1994;23:295–8.
 - [73] Wilke WS, Hoffman GS. Treatment of corticosteroid-resistant giant cell arteritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995;21:59–71.
 - [74] Jover JA, Hernández-García C, Morado IC, Vargas E, Bañares A, Fernández-Gutiérrez B. Combined treatment of giant cell arteritis with methotrexate and prednisone. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2001;134:106–14.
 - [75] Hoffman GS, Cid MC, Hellmann DB, Guillemin L, Stone JH, Schousboe J, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of adjuvant methotrexate treatment for giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1309–18.
 - [76] Van der Veen MJ, Dinant HJ, van Booma-Frankfort C, van Aldaba-Kuipers GA, Bijlsma JW. Can methotrexate be used as a steroid sparing agent in the treatment of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis? *Ann Rheum Dis* 1996;55:218–23.
 - [77] Caporali R, Cimmino MA, Ferraccioli G, Gerli R, Klersy C, Salvarani C, et al. Prednisone plus methotrexate for polymyalgia rheumatica: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 2004;141:493–500.
 - [78] Salvarani C, Cantini F, Niccoli L, Catano MG, Macchioni P, Pulsatelli L, et al. Treatment of refractory polymyalgia rheumatica with infliximab: a pilot study. *J Rheumatol* 2003;30:760–3.
 - [79] Migliore A, Massafra U, Carloni E, Padalino C, Martin Martin S, Lasaracina F, et al. TNF- α blockade induce clinical remission in patients affected by polymyalgia rheumatica associated to diabetes mellitus and/or osteoporosis: a seven cases report. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2005;9:373–8.

- [80] Corrao S, Pistone G, Arnone S, Colomba D, Calvo L, Scaglione R, et al. Significant corticosteroid sparing and fast recovery by etanercept therapy in patients with polymyalgia rheumatica and decompensated diabetes: a pilot study. *Arthritis Rheum* 2006;54(Suppl. 9):S146.
- [81] Catanoso MG, Macchioni PL, Boiardi L, Pipitone N, Salvarani C. Treatment of refractory polymyalgia rheumatica with etanercept: an open pilot study. *Arthritis Rheum* 2007;57:1514–9.
- [82] Cantini F, Niccoli L, Salvarani C, Padula A, Olivieri I. Treatment of longstanding active giant cell arteritis with infliximab: report of four cases. *Arthritis Rheum* 2001;44:2933–5.
- [83] Airò P, Antonioli CM, Vianelli M, Toniati P. Anti-tumour necrosis factor treatment with infliximab in a case of giant cell arteritis resistant to steroid and immunosuppressive drugs. *Rheumatology* 2002;41:347–9.
- [84] Tan AL, Holdsworth J, Pease C, Emery P, McGonagle D. Successful treatment of resistant giant cell arteritis with etanercept. *Ann Rheum Dis* 2003;62:373–4.
- [85] Ahmed MM, Mubashir E, Hayat S, Fowler M, Berney SM. Treatment of refractory temporal arteritis with adalimumab. *Clin Rheumatol* 2007;26:1353–5.
- [86] Martínez-Taboada VM, Rodríguez-Valverde V, Carreño L, López-Longo J, Figueroa M, Belzunegui J, et al. A double-blind placebo controlled trial of etanercept in patients with giant cell arteritis and corticosteroid side effects. *Ann Rheum Dis* 2007;67:625–30.
- [87] Hoffman GS, Cid MC, Rendt-Zagar KE, Merkel PA, Weyand CM, Stone JH, et al. Infliximab for maintenance of glucocorticosteroid-induced remission of giant cell arteritis. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2007;146:621–30.
- [88] Salvarani C, Macchioni PL, Manzini C, Paolazzi G, Trotta A, Manganelli P, et al. Infliximab plus prednisone or placebo plus prednisone for the initial treatment of polymyalgia rheumatica. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2007;146:631–9.
- [89] Andonopoulos AP, Meimaris N, Daoussis D, Bounas A, Giannopoulos G. Experience with infliximab (anti-TNF alpha monoclonal antibody) as monotherapy for giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62:1116.
- [90] Brack A, Rittner HL, Younge BR, Kaltschmidt C, Weyand CM, Goronzy JJ. Glucocorticoid-mediated repression of cytokine gene transcription in human arteritis-SCID chimeras. *J Clin Invest* 1997;99:2842–50.
- [91] Evans JM, ÓFallon WM, Hunder GG. Increased incidence of aortic aneurysm and dissection in giant cell (temporal) arteritis. A population-based study. *Ann Intern Med* 1995;122:502–7.
- [92] Evans JM, Bowles CA, Björnsson J, Mullany CJ, Hunder GG. Thoracic aortic aneurysm and rupture in giant cell arteritis. A descriptive study of 41 cases. *Arthritis Rheum* 1994;37:1539–47.
- [93] Binard A, De Bandt M, Berthelot JM, Saraux A. Inflammatory joint disease working group CRI of the French Society for Rheumatology. Usefulness of the disease activity scores for polymyalgia rheumatica for predicting glucocorticoid dose changes: a study of 243 scenarios. *Arthritis Rheum* 2007;57:481–6.
- [94] Leeb BF, Rintelen B, Sautner J, Fassl C, Bird HA. The polymyalgia rheumatica activity score in daily use: proposal for a definition of remission. *Arthritis Rheum* 2007;57:810–5.
- [95] Binard A, De Bandt M, Berthelot JM, Saraux A. Inflammatory joint disease working group of the French Society for Rheumatology. Performance of the polymyalgia rheumatica activity score for diagnosing disease flares. *Arthritis Rheum* 2008;59:263–9.
- [96] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, Harington LE. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* 2007;25:821–52.
- [97] Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, ÓGarra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.
- [98] Martínez-Taboada V, Brack A, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. The inflammatory infiltrate in giant cell arteritis selects against B lymphocytes. *J Rheumatol* 1996;23:1011–4.
- [99] Weyand CM, Goronzy JJ. Giant cell arteritis as an antigen driven disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1995;21:1027–39.
- [100] Martínez-Taboada V, Hunder NN, Hunder GG, Weyand CM, Goronzy JJ. Recognition of tissue residing antigen by T cells in vasculitic lesions in giant cell arteritis. *J Mol Med* 1996;74:695–703.
- [101] Martínez-Taboada VM, Bartolome MJ, Lopez-Hoyos M, Blanco R, Mata C, Calvo J, et al. HLA-DRB1 allele distribution in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: influence on clinical subgroups and prognosis. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34:454–64.
- [102] Salvarani C, Macchioni P, Zizzi F, Mantovani W, Rossi F, Castri C, et al. Epidemiologic and immunogenetic aspects of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis in Northern Italy. *Arthritis Rheum* 1991;34:351–6.
- [103] Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ. The HLA-DRB1 locus as a genetic component in giant cell arteritis. Mapping of a disease-linked sequence motif to the antigen binding site of the HLA-DR molecule. *J Clin Invest* 1992;90:2355–61.
- [104] Cid MC, Ercilla G, Vilaseca J, Sanmarti R, Villalta J, Ingelmo M, et al. Polymyalgia rheumatica: a syndrome associated with HLA-DR4 antigen. *Arthritis Rheum* 1988;31:678–82.
- [105] Weyand CM, Hunder NH, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ. HLA-DRB1 alleles in polymyalgia rheumatica, giant cell arteritis, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994;37:514–20.
- [106] Guerne PA, Salvi M, Seitz M, Bruhlmann P, Rivier G, Frey D, et al. Molecular analysis of HLA-DR polymorphism in polymyalgia rheumatica. Swiss Group for research on HLA in polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol* 1997;24:671–6.
- [107] González-Gay MA, Boiardi L, García-Porrúa C, Macchioni P, Amor-Dorado JC, Salvarani C. Geographical and genetic factors do not account for significant differences in the clinical spectrum of giant cell arteritis in southern Europe. *J Rheumatol* 2004;31:520–3.
- [108] Salvarani C, Casali B, Boiardi L, Ranzi A, Macchioni P, Nicoli D, et al. Intercellular adhesion molecule 1 gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica/giant cell arteritis: association with disease risk and severity. *J Rheumatol* 2000;27:1215–21.
- [109] Amoli MM, Shelley E, Matthey DL, Garcia-Porrúa C, Thomson W, Hajeer AH, et al. Lack of association between ICAM-1 gene polymorphisms and giant cell arteritis. *J Rheumatol* 2001;28:1600–4.
- [110] Dababneh A, González-Gay MA, García-Porrúa C, Hajeer AH, Thomson W, Ollier WER. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica can be differentiated by distinct patterns of HLA class II association. *J Rheumatol* 1998;25:2140–5.
- [111] Uthman I, Kanj N, Atweh S. Infliximab as monotherapy in giant cell arteritis. *Clin Rheumatol* 2006;25:109–10.
- [112] Torrente SV, Güerri RC, Pérez-García C, Benito P, Carbonell J. Amaurosis in patients with giant cell arteritis: treatment with anti-tumour necrosis factor- α . *Intern Med J* 2007;37:280–1.
- [113] Bhatia A, Ell PJ, Edwards JC. Anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) as an adjunct in the treatment of giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1099–100.
- [114] Lopez-Hoyos M, Bartolome-Pacheco MJ, Blanco R, Rodríguez-Valverde V, Martínez-Taboada VM. Selective T cell receptor decrease in peripheral blood T lymphocytes of patients with polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2004;63:54–60.
- [115] Johansen M, Elling P, Elling H, Olsson A. A genetic approach to the aetiology of giant cell arteritis: depletion of the CD8+ T-lymphocyte subset in relatives of patients with polymyalgia rheumatica and arteritis temporalis. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13:745–8.
- [116] Martínez-Taboada VM, Blanco R, Fito C, Pacheco MJ, Delgado-Rodríguez M, Rodríguez-Valverde V. Circulating CD8+ T cells in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: a review. *Semin Arthritis Rheum* 2001;30:257–71.

Circulating cytokines in active polymyalgia rheumatica

L Alvarez-Rodríguez,¹ M Lopez-Hoyos,² C Mata,³ M Jose Marin,² J Calvo-Alen,³
R Blanco,¹ E Aurrecoechea,³ M Ruiz-Soto,¹ V M Martínez-Taboada¹

¹ Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Spain;

² Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Spain;

³ Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Sección de Reumatología, Hospital de Sierrallana, Torrelavega, Cantabria, Spain

Correspondence to:
Dr V M Martínez-Taboada,
Rheumatology Division, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Avda Valdecilla s/n 39008, Santander, Spain; vmartinez@medynet.com

Accepted 6 February 2009
Published Online First
1 March 2009

ABSTRACT

Objective: To characterise the circulating cytokine profile and the cellular source of circulating cytokines in polymyalgia rheumatica (PMR).

Methods: The study included 34 patients with active untreated PMR and 17 age-matched healthy controls (HC). Circulating cytokines were measured by cytometric bead array and ELISA. Intracellular cytokines were assessed in CD3+ and CD14+ cells by flow cytometry. Cytokines in cell culture supernatants were also determined after polyclonal stimulation of patients' peripheral blood mononuclear cells.

Results: Circulating levels of interleukin-6 (IL6) were significantly higher in subjects with active PMR than in HC. Corticosteroid (CS) treatment was followed by a decrease in the level of IL6. Intracellular cytokine staining showed that circulating monocytes did not produce higher amounts of proinflammatory cytokines in patients with PMR than in HC. There was a discordance between serum levels and cytokine-producing monocyte and T cells, and it was not possible to demonstrate a Th1 bias in the peripheral compartment.

Conclusions: Active PMR is characterised by increased serum levels of IL6, but not of other proinflammatory cytokines, that are rapidly suppressed by CS treatment. As circulating monocytes do not show increased production of proinflammatory cytokines, IL6 may be mainly produced in the inflamed tissue. A study of the circulating cytokine profile and its cellular source may provide a clue to new therapeutic options.

Polymyalgia rheumatica (PMR) is a chronic inflammatory disorder of unknown aetiology in elderly subjects.¹ It presents with inflammation of joint and periarticular structures and is characterised by systemic manifestations such as fever, anorexia and weight loss.¹ These manifestations are accompanied by laboratory abnormalities characteristic of a florid acute phase response such as anaemia, thrombocytosis and increased erythrocyte sedimentation rate (ESR) and C reactive protein (CRP) level.^{2,3} The mechanisms linking tissue inflammation and the systemic component of the disease remain undefined, but may involve proinflammatory cytokines that act as endocrine mediators at the site of inflammation.⁴ An alternative but not exclusive hypothesis suggests that this syndrome has a systemic component that is at least partially independent of the tissue component and mediated by the production of proinflammatory mediators, especially interleukin-6 (IL6), by circulating monocytes.⁴

Cytokines are involved in the pathogenesis of most inflammatory diseases and a number of studies

have addressed their role in the pathogenesis of PMR.^{4,5} However, the cellular type and the site of production of circulating cytokines, the interaction between T cell-derived and macrophage-derived cytokines, and the influence of corticosteroid (CS) treatment in a wide range of circulating cytokines have rarely been assessed. The importance of clarifying the role of cytokines in PMR also has implications for its treatment, as we now have available an increasing number of effective biological agents directed against cytokines.

The purpose of the present study was to identify the cellular source of circulating cytokines and the state of activation of the different peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in patients with PMR. We also analysed the influence of CS treatment on circulating cytokines.

METHODS

Study subjects

The study included 34 prospectively recruited patients with active and untreated PMR and 17 healthy controls (HC). One sample from 14 of the 34 patients was also studied after disease remission with CS treatment. Patients with PMR were diagnosed according to the criteria proposed by Chuang *et al.*³ Patients with PMR and ESR <40 mm/h but who satisfied other clinical criteria were also included in the study.² In patients with PMR, giant cell arteritis (GCA) was excluded by a negative temporal artery biopsy and/or a complete resolution of symptoms with low-dose CS (10 mg/day prednisone) and the absence of characteristic GCA manifestations. Patients with polymyalgic symptoms who satisfied the ACR 1987 revised criteria for rheumatoid arthritis⁶ were excluded. Seventeen age-matched healthy controls (HC) without a previous history of infectious, neoplastic or autoimmune disease were included in the study.

The clinical findings at diagnosis and during follow-up, the ESR and CRP values at diagnosis and the initial prednisone dosage were ascertained by reviewing the patients' medical records (table 1). At the time of diagnosis, all patients with isolated PMR received an initial dose of prednisone of 10 mg/day immediately after obtaining the blood sample for the pretreatment study. Reductions in CS therapy were individualised according to physician judgement.

Detection of soluble cytokines in serum

The serum was isolated from 2.5 ml blood obtained in tubes without additives from each individual and stored at -80°C until analysis.

Table 1 Demographic and clinical characteristics of patients with polymyalgia rheumatica (PMR)

	Control	PMR
Number of patients	17	34
Mean (SD) age (years)	67.5 (8.3)	72.8 (6.7)
Sex (% female)	82.3	61.8
Mean (SD) time to diagnosis (months)	–	2.7 (2.2)
PMR symptoms (%)	–	100
TAB (compatible with GCA/done)	0/0	0/9
Mean (SD) pretreatment ESR (mm/h)	–	55.7 (23.7)
Mean (SD) pretreatment CRP (mg/dl)	0.3 (0.2)	4.7 (3.5)

CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; GCA, giant cell arteritis; PMR, polymyalgia rheumatica; TAB, temporal artery biopsy.

Cytometric bead array (CBA)

The quantitative determination of proinflammatory cytokines in serum was performed using the Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammation kit (BD Biosciences, San Diego, California, USA). The CBA assay contained five bead populations with distinct fluorescence intensities which had been coated with capture antibodies specific for IL12p70, tumour necrosis factor (TNF)- α , IL10, IL6 and IL1 β . Previously, these beads were mixed to form mixed capture beads which were then incubated together with phycoerythrin-conjugated detection antibodies and recombinant standards or test samples to form sandwich complexes. The fluorescence produced by CBA beads was measured on a FACScalibur Flow Cytometer (BD Biosciences) and analysed using Software CBA Folder Excel 98 (BD Biosciences). Detection limits were 1.9 pg/ml for IL12p70, 3.7 pg/ml for TNF α , 3.3 pg/ml for IL10, 2.5 pg/ml for IL6 and 7.2 pg/ml for IL1 β .

ELISA

The quantitative determination of serum interferon γ (IFN γ) was performed by ELISA (Diacclone, Besançon, France) following the manufacturer's instructions. The minimum detectable level of IFN γ was 0.69 pg/ml.

Detection of intracellular cytokines in circulating lymphocytes and monocytes by flow cytometry analysis

Intracellular cytokine staining is able to detect the production and accumulation of cytokines in the endoplasmic reticulum following stimulation. Cells collected in sodium heparin tubes were either polyclonally stimulated for 4 h with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 1 μ g/ml; Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, USA) and ionomycin (50 μ g/ml; Calbiochem, Gibbstown, New Jersey, USA) in polystyrene tubes (lymphocytes) or activated with lipopolysaccharide (LPS) (100 μ g/ml; Sigma Aldrich) in polypropylene tubes (monocytes) in the presence of brefeldin A (500 μ g/ml; Sigma Aldrich) (induced or stimulated cytokine expression). Cells incubated in identical medium without stimulation (spontaneous or unstimulated cytokine expression) were used as controls.

After culture, cells were stained with peridinin chlorophyll protein-conjugated anti-CD3 antibody and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD14 antibody to identify lymphocyte and monocyte subpopulations, respectively. Thereafter, the red blood cells were lysed with FACS lysing solution and the mononuclear cells were permeabilised using FACS Permeabilizing Solution and intracellularly stained with FITC- or phycoerythrin-conjugated cytokine-specific monoclonal antibodies (anti-IL2, anti-IFN γ and anti-IL4 for lymphocytes; anti-IL1 β , anti-TNF α and anti-IL6 for monocytes). Levels

of intracellular cytokine-producing cells were determined using a FACScalibur Flow Cytometer and analysed using Paint-A-Gate or Cell Quest Pro Software (all from BD Biosciences).

Detection of cytokines in cell culture supernatants

PBMCs from heparinised blood were obtained by Ficoll Histopaque 1077 (Sigma Aldrich) gradient centrifugation. PBMCs from 10 patients of each disease group and HC were cultured in RPMI 1640 and 10% FCS with PMA (100 ng/ml) and ionomycin (4 μ g/ml) for 24 h. Supernatants were obtained and stored at -80°C until analysis. Release of proinflammatory cytokines (IL1 β , TNF α and IL6) into the culture supernatants was determined using the CBA kit as described above. Release of IL12p70 and IFN γ into the culture supernatants was determined by ELISA (Diacclone) in accordance with the manufacturer's instructions. The sensitivity of the ELISA kit for IL12p70 was 0.75 pg/ml.

Statistical analysis

All the statistical analysis of data was carried out using the SPSS 12.0 software (Chicago, Illinois, USA). The statistical comparisons of data between patients and controls were performed using the Mann-Whitney U test. Differences between pre- and post-treatment data were analysed by Wilcoxon signed-rank test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

IL6 is the more detectable proinflammatory circulating cytokine in active PMR

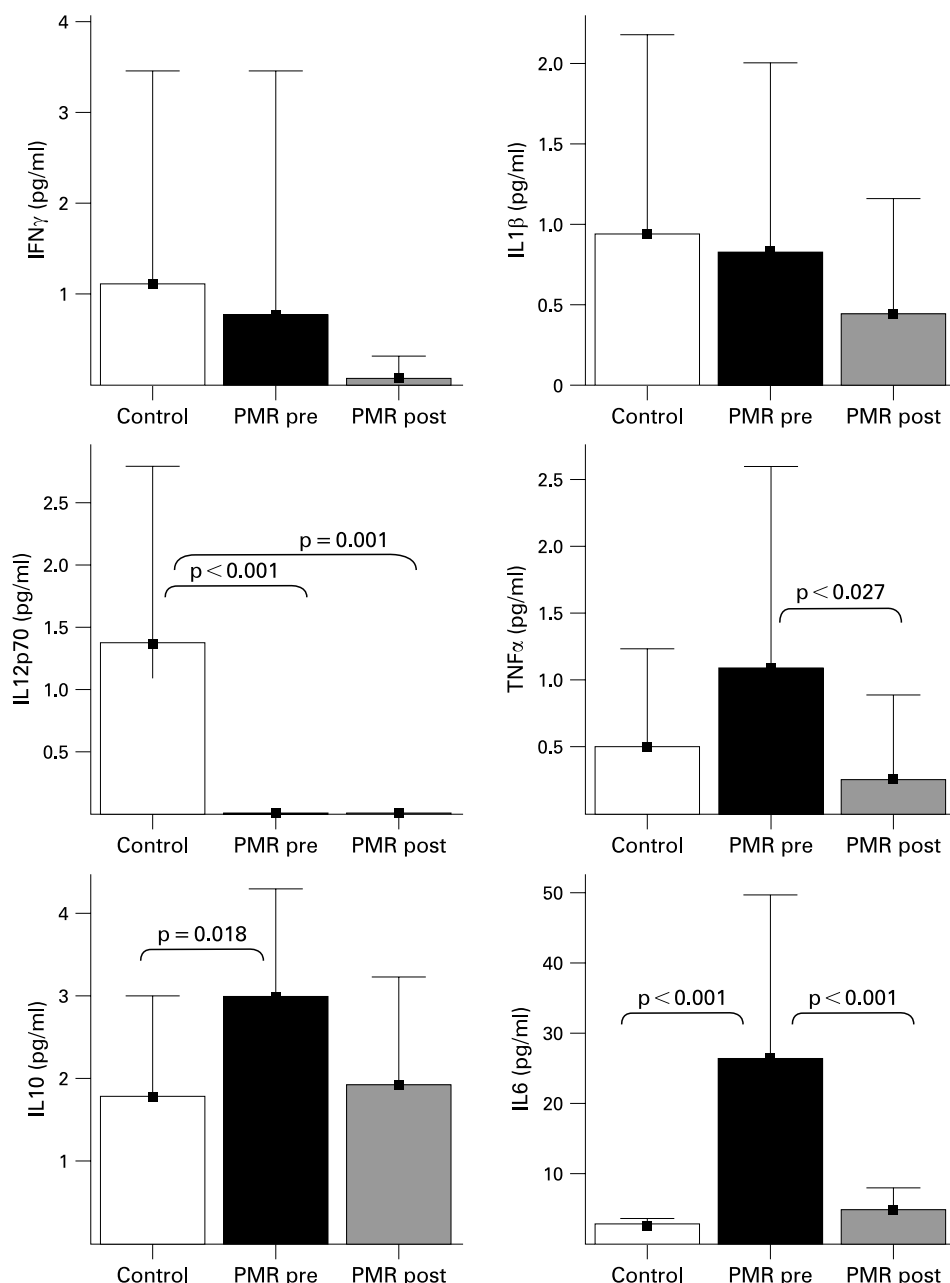
Previous studies suggest that PMR is characterised by a hyperproduction of IL6,^{4 5 7–11} and the results of the present study confirm this (fig 1). Circulating levels of IL6 were significantly higher in patients with active untreated PMR compared with HC. Treatment with CS was followed by a prompt and complete clinical response in all patients. As shown in fig 1, after treatment for a mean (SD) of 9.7 (4.1) weeks, the circulating IL6 levels in patients with PMR decreased significantly with most patients having IL6 levels under the detection limit. Treatment with CS was also followed by a significant decrease in circulating TNF α levels in patients with PMR (fig 1).

IL1 β , IL6 and TNF α are the major cytokines secreted by monocytes, and it would be expected that, in the case of a non-specific activation of circulating monocytes, IL1 β and TNF α would also be increased. However, in agreement with previous studies,⁷ serum levels of IL1 β and TNF α were not raised in patients with PMR compared with controls (fig 1). Interestingly, the anti-inflammatory cytokine IL10 showed higher levels in patients with PMR than in HC ($p = 0.018$). Finally, the circulating cytokine profile did not enable us to distinguish between patients with PMR with high or low ESR.

Cytokine production by circulating T lymphocytes in patients with PMR

As soluble cytokine levels may not reflect the real state of specific cell production, we analysed cell-specific cytokine production without ex vivo stimulation. We also examined the capacity of the cell response by measuring cell-specific cytokine production after in vitro stimulation of PBMC from patients with PMR. As shown in fig 2, circulating CD3+ lymphocytes from patients with PMR expressed similar amounts of intracellular cytokines to controls. Polyclonal in vitro stimulation showed a several fold increase in the main Th1 cytokine IFN γ and a lower response of the Th2 cytokine IL4

Figure 1 Serum cytokine levels in patients with active untreated polymyalgia rheumatica (PMR) and effect of corticosteroid treatment. Serum cytokine levels were assessed by cytometric beads array in 34 patients with active PMR and compared with 17 age-matched healthy controls. The effect of corticosteroid treatment was assessed in one serum sample from 14 patients with PMR in clinical remission after a mean (SD) treatment duration of 9.7 (4.1) weeks. *p* Values are only shown when significant. IFN, interferon; IL, interleukin; pre, active untreated disease; post, post-treatment samples; TNF, tumour necrosis factor.



(fig 2). Treatment with CS did not induce significant changes in Th1 cytokines ex vivo or after in vitro stimulation (fig 2).

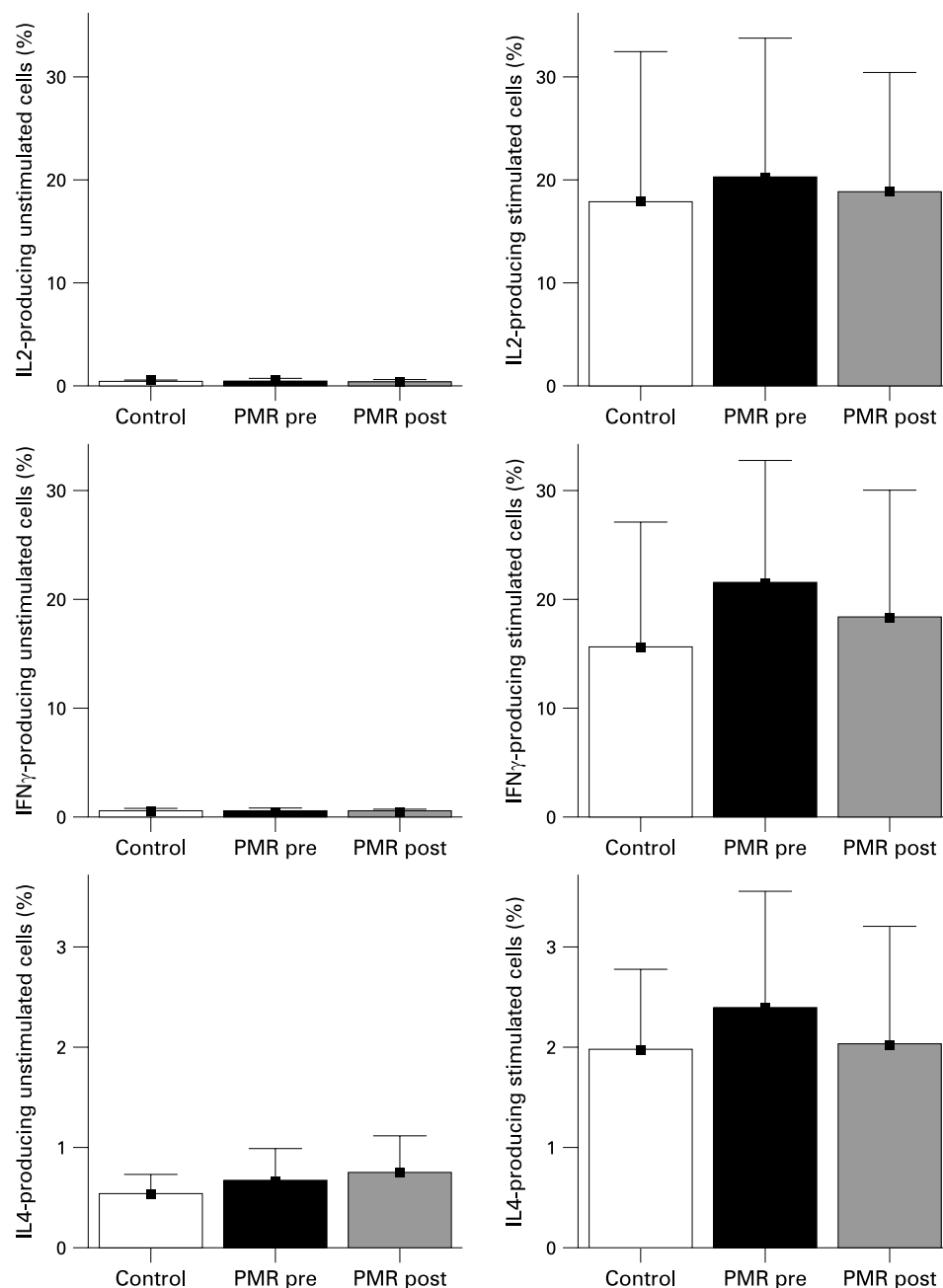
Peripheral blood monocytes do not produce higher amounts of proinflammatory cytokines in PMR

It has been suggested that the systemic component of PMR is secondary to the production of proinflammatory cytokines by circulating monocytes.⁷ These observations were based on a semiquantitative PCR study and have not been confirmed. Using flow cytometry technology, we examined whether circulating monocytes are a major source of proinflammatory cytokines in patients with PMR. As shown in fig 3, the percentage of proinflammatory cytokine-producing cells ex vivo in patients with PMR was similar to the percentage in HC. In vitro stimulation with LPS showed a clear response of circulating CD14⁺ cells, especially in HC (fig 3). The percentage of TNF α -producing cells after in vitro stimulation was

significantly lower in patients with active PMR. We did not find a significant correlation between serum and cell-specific cytokines (not shown). Treatment with CS induced a decrease in the percentage of circulating proinflammatory cytokine-producing CD14⁺ cells that becomes clearly significant after in vitro stimulation (fig 3).

We also tested the capacity of the PBMCs of patients to secrete proinflammatory cytokines to culture supernatant upon in vitro activation. After 24 h of stimulation, no significant differences were found between patients and controls, although there was a tendency for patients with PMR to produce higher levels of IL1 β and IL6 (fig 4, left panel). Interestingly, polyclonal T cell stimulation in vitro was not followed by an increase in the amount of IFN γ released. Patients with PMR secreted less IFN γ into the supernatant than age-matched HC ($p = 0.07$, fig 4, right panel). The same results were also found for IL12. Polyclonal T cell stimulation

Figure 2 Intracellular T cell-derived cytokines in healthy controls and patients with polymyalgia rheumatica (PMR). Peripheral blood mononuclear cells were polyclonally stimulated for 4 h with phorbol 12-myristate 13-acetate and ionomycin in polystyrene tubes (induced or stimulated cytokine expression, right panel). Cells incubated in identical medium without stimulation acted as controls (spontaneous or unstimulated cytokine expression, left panel). After culture, cells were stained with anti-CD3 antibody and intracellularly stained with cytokine-specific monoclonal antibodies (anti-IL2, anti-IFN γ and anti-IL4). The levels of intracellular cytokine-producing cells were determined by flow cytometry. IFN, interferon; IL, interleukin.



in vitro was followed by a significant decrease in IL12 secretion in patients with PMR.

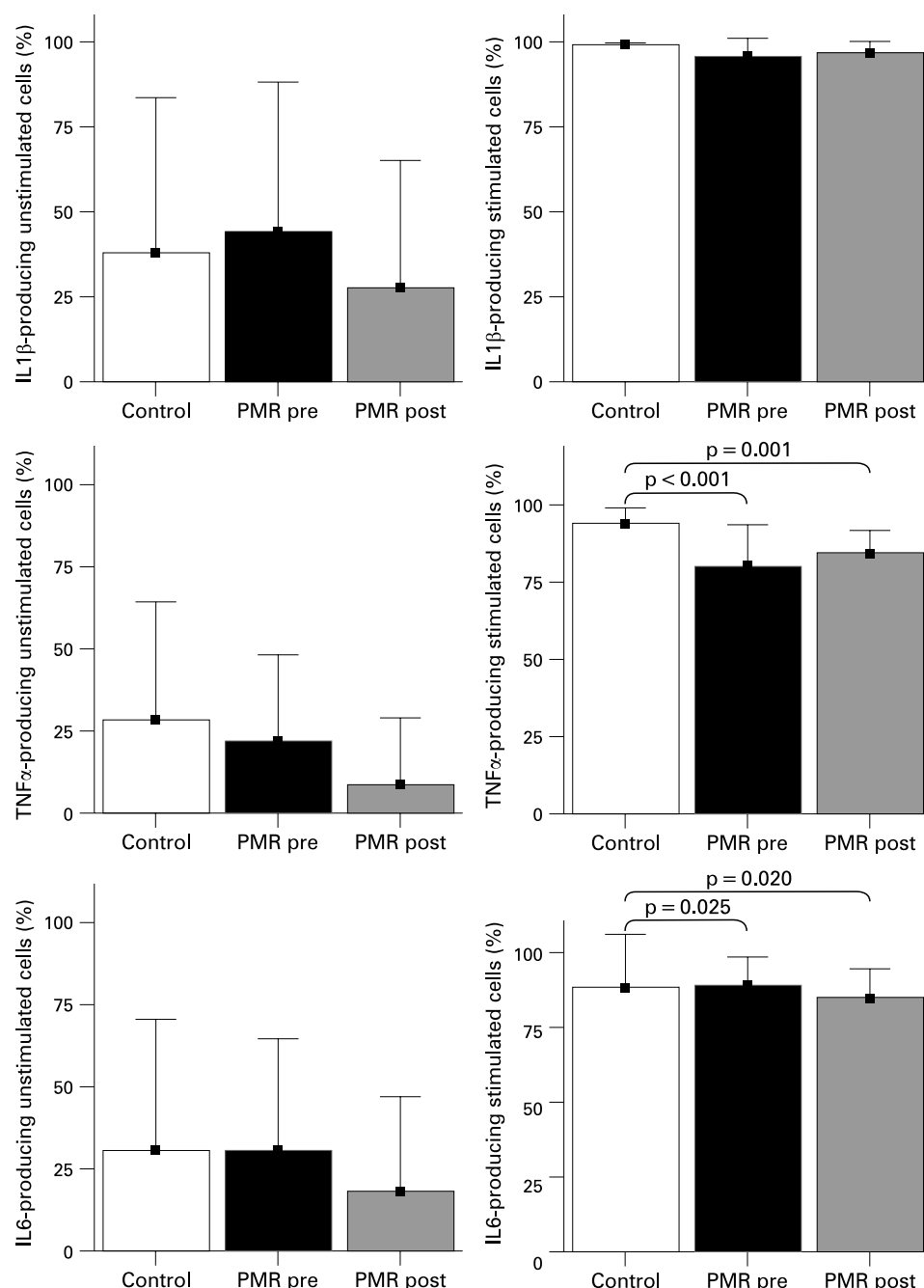
DISCUSSION

Cytokines function at a microenvironment level. However, their study is limited by the availability of inflamed tissue and the complex techniques that are needed to address this issue. Only one study has assessed the tissue levels of cytokines in PMR,¹² but most studies have addressed only the levels in serum or plasma.^{5 7–11 13–17} In this study we have combined different strategies to study circulating cytokines in patients with PMR in order to examine whether there is an underlying dysregulation of cytokine secretion independent of tissue inflammatory effects. To this end, we have measured a wide panel of circulating cytokines at the serum level, intracellular cytokines by flow cytometry, and we have also measured the levels of

cytokines in supernatants of in vitro stimulated PBMCs. Furthermore, we have been able to identify the main cellular source of cytokines at the peripheral blood compartment, the state of activation of PBMCs during the active phase of the disease, and also the capacity of the response of PBMCs to in vitro stimuli. Finally, the study of patients after clinical remission with CS treatment also allowed us to examine the main effects of treatment on circulating cytokines.

We confirmed that patients with PMR are characterised by an increase in serum levels of IL6.^{5 7–11} The central role of IL6 in PMR was illustrated by the rapid clinical response to CS treatment which was followed by a parallel decrease in serum levels of this cytokine. Alternatively, it may be that the main source of IL6 is not the activated circulating monocyte but other cell types that selectively or predominantly produce IL6. The levels of other proinflammatory cytokines such as IL1 β and

Figure 3 Intracellular monocyte-derived cytokines in healthy controls and patients with polymyalgia rheumatica (PMR). Peripheral blood mononuclear cells were stimulated for 4 h with lipopolysaccharide in polypropylene tubes (induced or stimulated cytokine expression, right panel). Cells incubated in identical medium without stimulation acted as controls (spontaneous or unstimulated cytokine expression, left panel). After culture, cells were stained with anti-CD14 antibody and intracellularly stained with cytokine-specific monoclonal antibodies (anti-IL1 β , anti-TNF α and anti-IL6) for monocytes. Levels of intracellular cytokine-producing cells were determined by flow cytometry. IL, interleukin; TNF, tumour necrosis factor.



TNF α were within a very low range, and differences may reflect different pathogenic pathways or differences in the polymorphisms of genes within the IL1 pathway that influence circulating cytokine levels.^{18 19} In fact, IL1RN*2 homozygosity is significantly higher in patients with PMR than in HC.^{20 21}

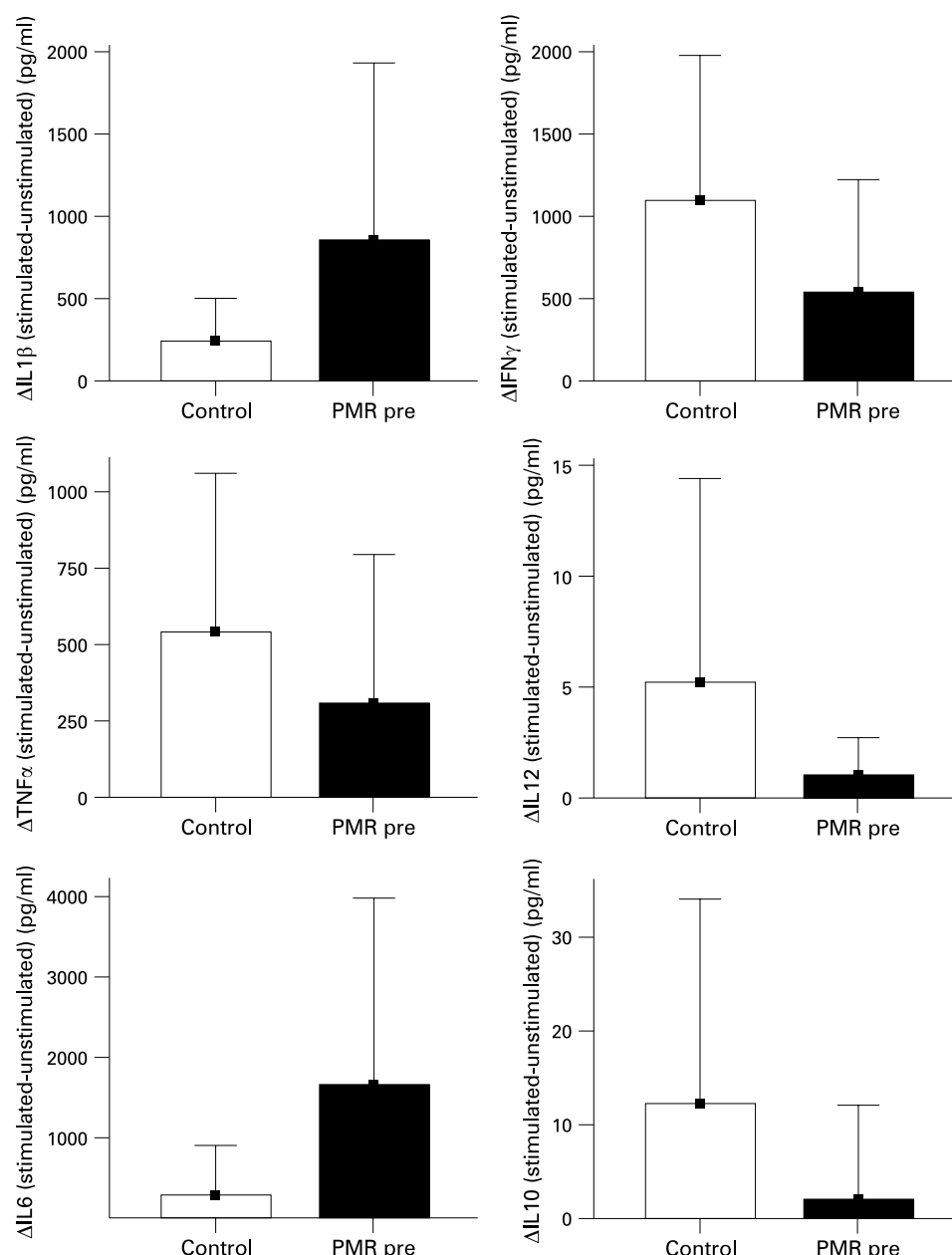
Despite the advantages of measuring circulating levels of cytokines, there are also a number of drawbacks.^{22 23} The levels of circulating cytokines may be affected by receptor binding, cytokine metabolism, processing technique and the type of test used for measurement.²³ Furthermore, although cytokines also act as endocrine mediators, their major function is to act locally at the cellular level. Serum cytokine levels therefore provide, at best, an indirect measure of cytokine function and may not reflect the role of a cytokine in disease pathogenesis.^{23–26}

This is the first study in which cytokines have been detected at the single cell level in patients with PMR. Although we did

not assess intracellular cytokines at the site of inflammation, PMR is a systemic process characterised by a significant acute phase response so serum cytokines and blood cytokine-producing cells might be expected to reflect the systemic component of the disease. It is still unclear whether the increase in cytokine production is caused by an increase in the numbers of cytokine-producing cells or by the enhanced ability to produce cytokines. We also compared serum cytokines with cell-specific cytokine production without ex vivo stimulation. The reasoning behind this comparison is that patients with an increased acute phase response such as those with PMR might be expected to have in vivo stimulated cells.²³

It has been suggested that PMR has a systemic component that is at least partially independent of the tissue component and is mediated by the production of IL6 by circulating monocytes.⁴ Our findings showed ex vivo activation in both

Figure 4 Production of cytokines by activated peripheral blood mononuclear cells from patients with polymyalgia rheumatica (PMR). Peripheral blood mononuclear cells from 10 patients of each disease group and controls were cultured with phorbol 12-myristate 13-acetate and ionomycin for 24 h. Release of proinflammatory cytokines (left panel) and Th1 cytokines (IFN γ , IL12 and IL10, right panel) into the culture supernatant was determined using the cytometric beads array kit and ELISA, respectively. IFN, interferon; IL, interleukin; TNF, tumour necrosis factor.



patients and HC. Spontaneous ex vivo cytokine production by PBMC has been reported in healthy individuals, especially for IL6.^{22–23} It has been shown that the correlation of serum and cytokine-specific cells is weak.²³ In fact, this correlation may be negative, indicating that serum and cytokine-specific cells measure different factors.^{22–27} Furthermore, some cytokines such as IL6 might be produced by circulating immune cells and also by other non-blood cell types. Thus, serum levels might not necessarily reflect the production of circulating immune cells.²⁸ In this study we found no correlation between serum and intracellular cytokine production. We therefore hypothesise that the increased levels of IL6 found in patients with PMR are not the result of IL6 production by circulating monocytes, and it is reasonable to assume that the major production of proinflammatory cytokines is located at the site of the inflammatory process⁷ or in blood cells different from circulating CD14+ cells.

We also examined intracellular cytokine production and extracellular cytokine secretion in vivo and after in vitro

stimulation. The presence of spontaneous cytokine production ex vivo implies prior in vivo stimulation. In theory, if cells have been stimulated in vivo, secondary ex vivo induction could lead to in vitro apoptosis and obscure the role of the studied cell-specific cytokine.²² Cytokine expression is strongly dependent on the specific activation stimulus²⁹ and also on the duration of in vitro stimulation,³⁰ and the results must therefore be interpreted accordingly.

Despite these considerations, our in vitro results yielded the following conclusions. In vitro stimulation showed no significant difference in the induction of proinflammatory cytokines in HC, which may suggest that the proinflammatory cytokines studied here are not crucial in the pathogenesis of PMR.²⁴ Alternatively, the lack of significant differences in the response of circulating monocytes may also reflect the hyporesponsiveness of previously activated T lymphocytes. The latter hypothesis might be supported by the marked reduction in IFN γ secretion following polyclonal activation of T cells in PBMC from patients with PMR. Although we cannot exclude a gene

transcription defect, the reduction in IFN γ secretion does not appear to be attributable to reduced intracellular protein production. In fact, although intracellular cytokine production was assessed at different time intervals from protein secretion (fig 2), there were no differences between patients and controls. Furthermore, a selective peripheral impairment of the Th1 response might also be confirmed by the similar results found for IL12, another Th1 cytokine produced by a different cell type. These findings could have important pathogenic implications. It has been shown in animal models that IFN γ can reduce the inflammatory response,³¹ and the reduced peripheral Th1 response may represent an increased risk for infections.³² On the other hand, reductions in the peripheral Th1 response may prime inflamed tissues to a prolonged and exacerbated inflammation.²⁹

A detailed knowledge of the cellular source and the role of cytokines in the pathogenesis of PMR might have therapeutic implications. Although CS will continue to be the main therapeutic agents, their toxicity and the existence of a subgroup of patients with a refractory course make it necessary to search for alternatives. In this regard, the rapid development of more selective therapeutic agents—especially those directed at blocking proinflammatory cytokines—has opened up new treatment options. Thus, blocking IL6³³ may represent a major step towards avoiding the use of prolonged CS treatment in this aged population.

In summary, active PMR is characterised by increased serum levels of IL6—but not of other proinflammatory cytokines—that are rapidly suppressed by CS treatment. As circulating monocytes do not show increased production of proinflammatory cytokines, IL6 is probably mainly produced in the inflamed tissue. The discordance found between serum levels and cytokine-producing cells may have important consequences for the understanding of the pathogenesis of PMR.

Acknowledgements: The authors thank Iñaki Beares (supported by a grant for Research Aid from Schering-Plough, Spain), Marta González, Maria San Martín and Ainhoa Bolívar (supported by Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV) for their helpful technical assistance, and all the patients and controls included in the present study and the consultants of the Rheumatology Divisions who monitored them.

Funding: This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (05/0475), Fundación Marqués de Valdecilla and Fundación Mutua Madrileña. LA-R was supported by a grant for Research Aid from Wyeth Pharma (Spain).

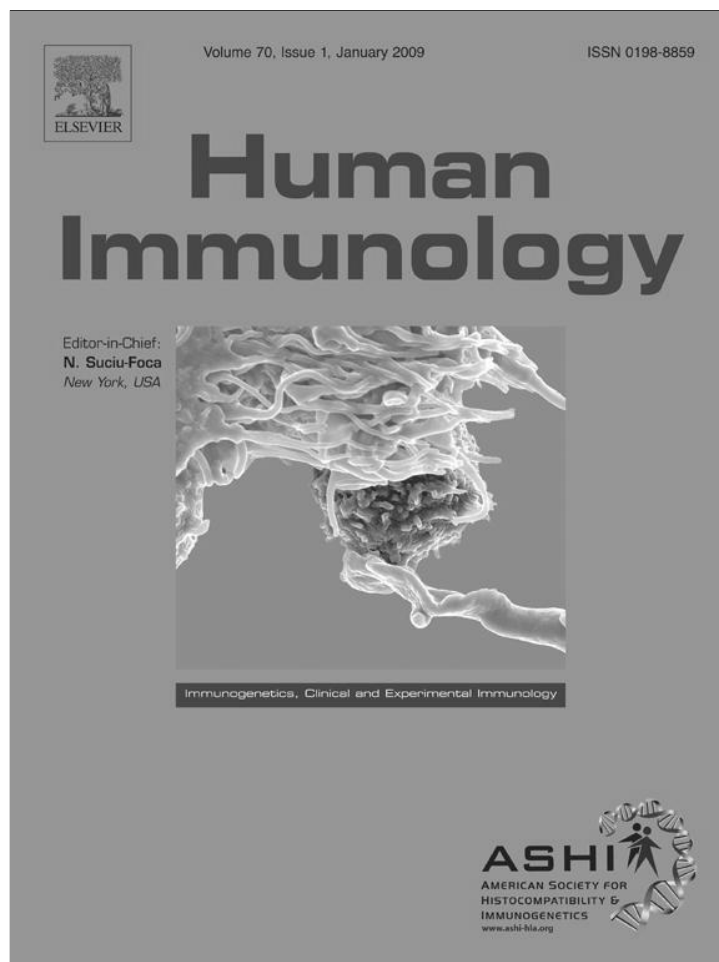
Competing interests: None.

Ethics approval: All the patients and controls gave signed informed consent and the study was approved by the regional ethics committee.

Provenance and peer review: Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, et al. Polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *N Engl J Med* 2002;**347**:261–71.
- González-Gay MA, Rodríguez-Valverde V, Blanco R, et al. Polymyalgia rheumatica without significantly increased ESR: a more benign syndrome. *Arch Intern Med* 1997;**157**:317–20.
- Chuang T-Y, Hunder GG, Ilstrup DM, et al. Polymyalgia rheumatica: a 10-year epidemiologic and clinical study. *Ann Intern Med* 1982;**97**:672–80.
- Martínez-Taboada VM, Alvarez L, Ruiz-Soto M, et al. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: role of cytokines in the pathogenesis and implications for treatment. *Cytokine* 2008;**44**:207–20.
- Straub RH, Gluck T, Cutolo M, et al. The adrenal steroid status in relation to inflammatory cytokines (interleukin-6 and tumor necrosis factor) in polymyalgia rheumatica. *Rheumatology* 2000;**39**:624–31.
- Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;**31**:315–24.
- Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, et al. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1993;**36**:1286–94.
- Corrigal VM, Dolan AL, Dasgupta B, et al. The sequential analysis of T lymphocyte subsets and interleukin-6 in polymyalgia rheumatica as predictors of disease remission and steroid withdrawal. *Br J Rheumatol* 1997;**36**:976–80.
- Uddhammar A, Sundqvist KG, Ellis B, et al. Cytokines and adhesion molecules in patients with polymyalgia rheumatica. *Br J Rheumatol* 1998;**37**:766–9.
- Cutolo M, Straub RH, Foppiani L, et al. Adrenal gland hypofunction in active polymyalgia rheumatica. Effect of glucocorticoid treatment on adrenal hormones and interleukin 6. *J Rheumatol* 2002;**29**:748–56.
- Cutolo M, Montecucco CM, Covagna L, et al. Serum cytokines and steroidal hormones in polymyalgia rheumatica and elderly-onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;**65**:1438–43.
- Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, et al. Tissue cytokine patterns distinguish polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Intern Med* 1994;**121**:484–91.
- Straub RH, Herfarth HH, Rinkes B, et al. Favorable role of interleukin 10 in patients with polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol* 1999;**26**:1318–25.
- Caplanne D, Le Parc JM, Alexandre JA. Interleukin-6 in clinical relapses of polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 1996;**55**:403–4.
- Tellus M, Byron K, Sachthep S, et al. Cytokines in polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum* 1996;**39**:1264–5.
- Straub RH, Georgi J, Helmke K, et al. In polymyalgia rheumatica serum prolactin is positively correlated with the number of typical symptoms but not with typical inflammatory markers. *Rheumatology* 2002;**41**:423–9.
- Pountain G, Hazleman B, Cawston TE. Circulating levels of IL-1 β , IL-6 and soluble IL-2 receptor in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1998;**37**:797–8.
- Hacker UT, Erhardt S, Tschöp K, et al. Influence of the IL-1Ra gene polymorphism on in vivo synthesis of IL-1Ra and IL-1 β after live yellow fever vaccination. *Clin Exp Immunol* 2001;**125**:465–9.
- Danis VA, Millington M, Hyland VJ, et al. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* 1995;**99**:303–10.
- Boiardi L, Salvarani C, Timms JM, et al. Interleukin-1 cluster and tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol* 2000;**18**:675–81.
- Alvarez-Rodríguez L, Carrasco-Marín E, Lopez-Hoyos M, et al. Interleukin-1RN gene polymorphisms in elderly patients with rheumatoid inflammatory chronic conditions: association of IL-1RN*2/2 genotype with polymyalgia rheumatica. *Hum Immunol* 2009;**70**:49–54.
- Walker D, Jason J, Wallace K, et al. Spontaneous cytokine production and its effect on induced production. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;**9**:1049–56.
- Jason J, Archibald LK, Nwanyanwu OC, et al. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;**8**:1097–103.
- Pascual V, Allantaz F, Arce E, et al. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 blockade. *J Exp Med* 2005;**201**:1479–86.
- Bennet L, Palucka AK, Arce E, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003;**197**:711–23.
- Hoffman HM, Rosengren S, Boyle DL, et al. Prevention of cold-associated acute inflammation in familial cold autoinflammatory syndrome by interleukin-1 receptor antagonist. *Lancet* 2004;**364**:1779–85.
- Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods* 1995;**188**:117–28.
- Boiardi L, Casali B, Farnetti E, et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2006;**54**:4011–7.
- Moss RB, Hsu YP, Olds L. Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2000;**120**:518–25.
- Sugi-Ikai N, Nakazawa M, Nakamura S, et al. Increased frequencies of interleukin-2 and interferon- γ -producing T cells in patients with active Behçet's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;**39**:996–1004.
- Johansen HK, Høgen HP, Rygaard J, et al. Interferon-gamma treatment decreases the inflammatory response in chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rats. *Clin Exp Immunol* 1996;**103**:212–8.
- Moser C, Johansen HK, Song Z, et al. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection is more severe in Th2 responding BALB/c mice compared to Th1 responding C3H/HeN mice. *APMIS* 1997;**105**:838–42.
- Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, et al. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet* 2008;**371**:998–1006.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Human Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm



Research article

Interleukin-1RN gene polymorphisms in elderly patients with rheumatic inflammatory chronic conditions: Association of *IL-1RN**2/2 Genotype with polymyalgia rheumatica

Lorena Alvarez-Rodriguez ^a, Eugenio Carrasco-Marin ^b, Marcos Lopez-Hoyos ^b, Cristina Mata ^c, Lorena Fernandez-Prieto ^b, Maria Ruiz-Soto ^a, Jaime Calvo ^c, Vicente Rodriguez-Valverde ^a, Teresa Ruiz ^c, Ricardo Blanco ^a, Alfonso Corrales ^d, Victor Manuel Martinez-Taboada ^{a,*}

^a Division of Rheumatology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Fundación Marqués de Valdecilla-Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, Spain

^b Division of Immunology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, Fundación Marqués de Valdecilla-Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, Spain

^c Rheumatology Section, Hospital de Sierrallana, Torrelavega, Spain

^d Rheumatology Unit, Hospital de Laredo, Cantabria, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2008

Revised 16 October 2008

Accepted 22 October 2008

Available online 19 November 2008

Keywords:

Giant cell arteritis

Polymyalgia rheumatica

Interleukin 1

Interleukin 1 receptor antagonist

Polymorphism

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate whether there is an association between *IL1RN* polymorphism and disease susceptibility for three age-related inflammatory conditions: polymyalgia rheumatica (PMR), giant cell arteritis (GCA), and elderly-onset rheumatoid arthritis (EORA). A tandem-repeat polymorphism within *IL1RN* intron 2 was analyzed in 139 PMR, 69 GCA, and 156 RA patients (75 with EORA) as well as in 437 healthy subjects, together with the *in vitro* production of *IL-1β*. Our results showed that the *IL1RN**2/2 genotype was more frequent in PMR patients compared with controls ($p = 0.032$, odds ratio = 1.785, 95% confidence interval = 1.047–3.044) and GCA patients ($p = 0.008$, odds ratio = 4.661, 95% confidence interval = 1.352–16.065). We found no difference in the distribution of genotypes between PMR and EORA or between EORA and controls. However, the frequency of the *IL-1RN**2/2 genotype had a tendency to be higher in patients with EORA compared with young onset RA. The presence of *IL1RN**1 or *IL1RN**2 allele was not associated with severity of the disease in PMR and GCA patients and did not influence the production of *IL-1β*. In conclusion, the *IL1RN**2 polymorphism in a homozygous state was associated with an increased susceptibility to PMR and may give some clues for a differential therapy with GCA.

© 2009 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Polymyalgia rheumatica (PMR) and giant cell arteritis (GCA) are chronic inflammatory disorders of unknown etiology that affect elderly people almost exclusively [1,2]. Despite the similarities regarding age distribution, some clinical manifestations, laboratory value abnormalities, and excellent response to corticosteroid (CS) therapy, the relationship between GCA and PMR is not clearly established [1–3]. In fact, it is unknown why in some patients with PMR a systemic vasculitis develops, whereas in others the disease process remains limited to joint structures.

In addition to the clinical manifestations of PMR and GCA, both syndromes are characterized by systemic manifestations such as fever, anorexia, and weight loss. These clinical manifestations run in parallel with typical laboratory abnormalities of a marked acute phase response such as anemia, thrombocytosis, increased erythro-

cyte sedimentation rate (ESR), and C-reactive protein (CRP) [2,4,5]. The possible mechanisms linking tissue inflammation and the systemic component of the disease remain undefined, but they may involve the production of pro-inflammatory cytokines that act as endocrine mediators at the site of the inflammatory process [6].

The inflammatory acute phase response is initiated by cytokines of the interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor (TNF)- α , and IL-6 families, which are produced predominantly by activated macrophages and monocytes. These pro-inflammatory cytokines affect gene regulation and upregulate surface expression of the endothelial cell adhesion molecules to allow subsequent migration of leukocytes into the tissues [7]. During this inflammatory process several mechanisms such as secretion of receptor antagonists, may act as anti-inflammatory agents and thus favor the disease outcome [8].

The majority of studies on pro-inflammatory cytokines in PMR and GCA have focused on IL-6 [9–17]. Although IL-1 β is situated upstream from IL-6 in the inflammatory cascade, less information about its role in the pathogenesis of GCA exists. IL-1 β can be de-

* Corresponding author.

E-mail address: vmartinez@medynet.com (V.M. Martínez-Taboada)

tected in temporal artery biopsy (TAB) lesions from patients with GCA [6,18–23]; but in general, studies on IL-1 β have failed to detect circulating levels of this cytokine in PMR and GCA patients [12,16,17,24]. Only in the study by Pountain *et al.* [25] a slight but significant increase in IL-1 β in active patients compared with controls was detected. However, in the initial diagnosis of PMR and GCA, the detection of IL-1 β had no advantage over the conventional investigations of ESR and CRP, although in relapses, plasma IL-1 β was more likely to be raised than ESR or CRP [25].

IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) is a member of the IL-1 family that binds to the IL-1 receptor but does not induce any intracellular response and thus acts as an inhibitor of IL-1 activity [26]. Again, circulating levels of IL-1Ra have been studied in only a few reports with conflicting results [12,15,17,24]. More recently, two studies have addressed the role of the interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) gene, which encodes IL-1Ra, in patients with PMR and GCA [27,28]. Several polymorphic sites have been described in the IL-1RN gene and have been associated with a differential production of IL-1Ra and also IL-1 β [8,29,30]. In the study by Bioardi *et al.* [27], IL-1RN*2 homozygosity was significantly higher in PMR patients than in controls. In this study, the polymorphisms of the IL-1A and B genes did not reveal any association with PMR, and none of the genes analyzed were associated with disease severity. The same IL-1 cluster gene polymorphisms were analyzed in a cohort of Spanish patients with GCA and no significant association with susceptibility or disease severity were found [28].

Despite these investigations on the IL-1RN gene and the close relationship between PMR and GCA, there is no previous work looking for differences in IL-1RN polymorphism in patients with both disorders from the same geographic area. Therefore, the purpose of this study was to investigate whether there is an association between IL1RN gene polymorphism and disease susceptibility for three age-related inflammatory conditions in patients from the same geographic area: namely, PMR, GCA, and elderly-onset rheumatoid arthritis (EORA). We also attempted to analyze whether IL-1 β production was related with this gene polymorphism in the patient and control populations.

2. Subjects and methods

2.1. Patients

The present study included 69 patients with GCA, 139 with PMR, and 156 with rheumatoid arthritis (RA), along with 437 controls. All patients with GCA fulfilled the 1990 American College of Rheumatology classification criteria for GCA [31]. As shown in Table 1 84% had characteristic findings of arteritis in the TAB [32]. Patients with PMR were diagnosed according to the criteria proposed by Chuang *et al.* [33]. Patients who had PMR and ESR <40 mm/h, but who satisfied other clinical criteria, were also included in the study [34]. Patients with RA were required to meet the American College of

Table 1
Demographic and clinical data of patients with polymyalgia rheumatica (PMR) and giant cell arteritis (GCA)

	PMR	GCA
No. of patients	139	69
Female (%)	57.6	61.4
Age at diagnosis (mean $\pm$ SD, years)	72.4 $\pm$ 7.2	73.3 $\pm$ 7.2
PMR symptoms (%)	100	41.4
Temporal artery biopsy positive (%)	0	83.8
Ischemic manifestations (%)	0	48.5
ESR at diagnosis (mean $\pm$ SD, mm/h)	56.4 $\pm$ 28.3	86.6 $\pm$ 32.7
CRP at diagnosis (mean $\pm$ SD, mg/dl)	4.8 $\pm$ 4.3	9.0 $\pm$ 5.7
Duration of follow-up (mean $\pm$ SD, months)	56.7 $\pm$ 48.6	67.2 $\pm$ 52.3
Duration of CS therapy (mean $\pm$ SD, months)	29.3 $\pm$ 35.8	42.2 $\pm$ 40.9

GCA = giant cell arteritis; PMR = polymyalgia rheumatica; RA, rheumatoid arthritis; CS = corticosteroids; CRP, C-reactive protein; ESR = erythrocyte sedimentation rate.

Table 2
Demographic and clinical characteristics of rheumatoid arthritis (RA) patients

	Total	EORA	YORA
No. of patients	156	75	81
Female (%)	68.2	63.2	72.2
Age at diagnosis (mean $\pm$ SD, years)	56.9 $\pm$ 14.7	68.9 $\pm$ 6.9	45.3 $\pm$ 10.3
Rheumatoid factor positive (%)	59.7	41.7	71.1
Anti-CCP positive (%)	45.3	27.8	61.5

RA = rheumatoid arthritis; EORA = elderly onset rheumatoid arthritis; YORA = young onset rheumatoid arthritis; PMR = polymyalgia rheumatica.

Rheumatology (ACR) 1987 revised criteria for RA [35]. Patients with RA were divided according to the age of first symptoms (>60 years) in EORA or young-onset RA (YORA) (Table 2). As a control group, we included 437 healthy unrelated blood donors. Both patients and controls were Caucasians of Spanish ancestry and lived in the same geographic area of Cantabria in northern Spain. All patients and controls gave signed informed consent, and the study was approved by the regional ethics committee.

The clinical findings at diagnosis and during follow-up, the ESR and CRP values at diagnosis, as well as the initial prednisone dosage were ascertained by reviewing the patients' medical records. Patients were subgrouped according to the presence or absence of PMR and the presence or absence of ischemic complications. Ischemic complications were defined as the presence of visual loss, jaw claudication, cerebrovascular accidents, or/and aortic arch syndrome [4,36]. For the analysis of some variables such as relapses/recurrences, duration of corticosteroid therapy, and accumulated dose of prednisone, only patients with follow-up $\geq$ 2 years were included.

2.2. Genotyping the IL-1 receptor antagonist gene

Genomic DNA was extracted from 5 ml of whole blood, using a DNA isolation kit (GENTRA, GENERATION DNA Purification kits; Minneapolis, MN). IL-1RN 86 bp variable number of tandem repeats (VNTR) within the second intron genotypes was determined by polymerase chain reaction (PCR), as previously described [37]. Briefly, genomic DNA was amplified using 1.25 U of Taq polymerase (Promega, Madison, WI) in PCR buffer 10 $\times$ (100 mmol/l Tris HCl, 500 mmol/l KCl and 15 mmol/l MgCl₂), 2 μ mol/l dNTP, 2.5 mmol/l MgCl₂, and 2 μ mol/l of each primer. The forward primer was 5'-CTCAGCAACTCTCTA-3' and the reverse primer was 5'-TCCTg-gTCTgCaggTAA-3'. The PCR conditions were as follows: 94°C for 4 minutes, 30 cycles of 94°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute, with a final extension at 72°C for 5 minutes. The PCR products were run on a 2.2% agarose gel containing ethidium bromide and an appropriate size ladder. Bands were visualized under UV light. The product size of different alleles was as follows: IL1RN*1 (allele 1) four repeats, 410 bp; IL1RN*2 (allele 2) two repeats, 240 bp; IL1RN*3 (allele 3) five repeats, 500 bp; and IL1RN*4 (allele 4) three repeats, 325 bp.

2.3. Detection of soluble IL-1 β in serum and culture supernatant

The serum was isolated from 2.5 ml of blood obtained from a subgroup of patients with active untreated disease and stored at –80°C until analysis. Circulating IL-1 β was analyzed in 31 healthy controls and 59 patients with active, untreated disease, including 13 with GCA, 34 PMR and 12 EORA. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from heparinized blood were obtained by Ficoll Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, St Louis, MO) gradient centrifugation. PBMCs from 10 patients of each disease group and age-matched controls were cultured in RPMI 1640 and 10% fetal calf serum with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (100 ng/ml; Sigma-Aldrich) and ionomycin (4 μ g/ml; Calbiochem; Gibbstown, NJ) for 24 hours. Thereafter, supernatants were obtained and stored

at -80°C until analysis. The determination of IL-1 β protein levels in serum was performed using the BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammation kit (BD Biosciences, San Jose, CA), according to the manufacturer's instructions.

2.4. Statistical analysis

All the statistical analysis of data was carried out using SPSS 12.0 (Chicago, IL). For the analysis of the IL-1RN* alleles, haplotypes 13, 14, 23, 24, and 34 were considered as a single haplotypic combination because of their low frequencies. The strength of the association between PMR, GCA or RA and alleles or genotypes of the IL-1RN gene was estimated using odds ratios (ORs), 95% confidence intervals (CIs), and the power calculation. Levels of significance were determined using contingency tables by either a χ^2 or Fisher exact test analysis. For serum and supernatant studies, the statistical comparisons of data between patients with different pathologic conditions and control subjects were performed using the Mann-Whitney *U* test. Differences were considered significant when *p* values were <0.05 .

3. Results

3.1. Characteristics of study patients

The main demographic, clinical, and laboratory value characteristics of the study population are shown in Tables 1 and 2. The study was comprised of 208 patients with PMR/GCA, 156 patients with RA, and 437 healthy controls. A total of 41% of the GCA patients also had polymyalgic symptoms, and $\sim 50\%$ of the GCA patients had ischemic manifestations. In patients with PMR, GCA was excluded because of a negative temporal artery biopsy and/or a complete resolution of symptoms with low-dose corticosteroids (10–15 mg/d of prednisone) and the absence of characteristic GCA manifestations. Of the patients with GCA, 84% had signs of arteritis in the temporal artery biopsy, and the remaining patients fulfilled the 1990 ACR classification criteria. As expected, acute-phase reactants were higher in GCA patients compared with patients with PMR (Table 1).

Of the 156 patients with RA, 75 had the initial symptoms after the age of 60 years (EORA). Seropositivity for rheumatoid factor and anti-CCP antibodies was more frequent in the YORA population (Table 2).

3.2. Association between IL-1RN gene polymorphism and disease susceptibility in PMR and GCA

The distribution of cytokine allele frequencies and genotypes in PMR and GCA patients and controls is shown in Table 3. The study population was found to be in Hardy-Weinberg equilibrium for the IL-1RN gene polymorphism studied. Some of these patients were previously included in a study that evaluated the HLA-DRB1 alleles in patients with PMR and GCA [38]. PMR patients had a significantly higher frequency of the IL-1RN*2/2 genotype compared with controls ($p = 0.032$, OR = 1.785, 95% CI = 1.047–3.044) and to patients with GCA ($p = 0.008$, OR = 4.661, 95% CI = 1.352–16.065). The distribution of the alleles and genotypes for the IL-1RN gene polymorphism studied was not significantly different between GCA patients and controls (Table 3).

3.3. IL-1RN gene polymorphism is not associated with disease severity in PMR and GCA patients

The severity of PMR and GCA was addressed by analyzing the presence of at least one relapse/recurrence, number of relapses, duration of corticosteroid treatment, and cumulative prednisone dose. As patients had different follow-up and the average of corticosteroid treatment duration in both diseases is ~ 2 years [5,33,39], only those patients with ≥ 2 years of follow-up were included. For the GCA patients, the presence of ischemic manifestations at any

Table 3

Allele and genotype distribution of IL-1RN in controls and patients with polymyalgia rheumatica (PMR) and giant cell arteritis (GCA)

Gene	Controls (%) <i>n</i> = 437	PMR (%) <i>n</i> = 139	GCA (%) <i>n</i> = 69
Alleles			
1	595 (68.1)	181 (65.1)	97 (70.3)
2	266 (30.4)	92 (33.1)	37 (26.8)
Others ^a	13 (1.5)	5 (1.8)	4 (2.9)
Genotypes			
11	207 (47.4)	67 (48.2)	31 (44.9)
12	172 (39.4)	43 (30.9)	31 (44.9)
22	46 (10.5) ^b	24 (17.3) ^{b,c}	3 (4.3) ^c
Others	12 (2.7)	5 (3.6)	4 (5.9)

^aOthers comprise $<5\%$, *p* value was calculated in a 2x2 contingency table in presence or absence of allele 1.

^bPMR versus control genotype: $p = 0.032$ [OR: 1.785 (95% CI: 1.047–3.044)].

^cPMR versus GCA genotype: $p = 0.008$ [OR: 4.661 (95% CI: 1.352–16.065)].

time was also analyzed. No significant association between the IL-1RN polymorphism and any of these variables was found.

3.4. Association between IL-1RN gene polymorphism and disease susceptibility in RA patients

When we analyzed the distribution of the alleles and genotypes for the IL-1RN gene polymorphism in the whole group of RA patients, no significant differences between RA patients and controls were observed. YORA patients had a significantly lower frequency of the IL-1RN*2/2 genotype compared with controls ($p = 0.022$, OR = 4.618, 95% CI = 1.099–19.404). The distribution of the alleles and genotypes was not significantly different between EORA patients and controls (Table 4). However, the frequency of the IL-1RN*2/2 genotype was higher in patients with EORA compared with those with YORA ($p = 0.037$, OR = 4.727, 95% CI = 0.970–23.038), although the statistical power of this association was poor (42%). Disease severity was not evaluated in patients with RA.

Because we observed that in PMR the main source of symptoms arise from synovitis and bursitis of proximal structures [2,40,41], we examined whether the IL-1RN gene polymorphism was more similar to that in patients with RA than with GCA. As shown in Table 4, the total group of RA patients had a significantly lower frequency of the IL-1RN*2/2 genotype compared with patients with PMR ($p = 0.004$, OR = 3.047, 95% CI = 1.401–6.628), a difference that was especially due to the group with YORA ($p = 0.001$, OR = 8.243, 95% CI = 1.894–35.876). There was no significant difference between patients with PMR and EORA ($p = 0.196$, OR = 1.748, 95% CI = 0.743–4.110).

3.5. IL-1RN gene alleles are not associated with the production of IL-1 β

Although the results are probably limited by the sample size, no influence of the IL-1RN polymorphism studied on the *in vivo* (Figure 1A) and the *in vitro*-induced production of IL-1 β was found (Figure 1B).

4. Discussion

The association of a genetic polymorphism and a disease may be of relevance in terms of both susceptibility and disease severity. Furthermore, genetic associations might also be important in explaining possible pathogenic mechanisms that are relevant for the clinical expression of a disease. As PMR and GCA are characterized by marked acute-phase response mediated through the production of pro-inflammatory cytokines by activated macrophages/monocytes [10,18], we addressed the issue of whether a polymorphism within the IL-1RN gene may distinguish both disorders from healthy controls, and whether it may also differentiate them from other age-related conditions such as EORA. The reasoning behind the proposed involvement of cytokine gene polymorphisms in susceptibility or disease severity is that they may influence *in vivo* cytokine levels

Table 4

Allele and genotype distribution of IL-1RN in controls and patients with rheumatoid arthritis (RA) and polymyalgia rheumatica (PMR)

Gene	Controls (%) n = 437	Total RA (%) n = 156	YORA (%) n = 81	EORA (%) n = 75	PMR (%) n = 139
Alleles					
1	595 (68.1)	217 (69.6)	119 (73.5)	98 (65.3)	181 (65.1)
2	266 (30.4)	87 (27.9)	39 (24.1)	48 (32)	92 (33.1)
Others *	13 (1.5)	8 (2.5)	4 (2.4)	4 (2.7)	5 (1.8)
Genotypes					
11	207 (47.4)	73 (46.8)	41 (50.6)	32 (42.7)	67 (48.2)
12	172 (39.4)	65 (41.7)	34 (42)	31 (41.3)	43 (30.9)
22	46 (10.5) ^{b,c}	10 (6.4) ^d	2 (2.5) ^{c,e,f}	8 (10.7) ^f	24 (17.3) ^{b,d,e}
Others ^a	12 (2.7)	8 (5.1)	4 (4.9)	4 (5.3)	5 (3.6)

^aOthers comprises <5%. p Value was calculated in a 2 × 2 contingency table in presence or absence of allele 1.

^bPMR versus control genotype (p = 0.032, OR = 1.785, 95% CI = 1.047–3.044).

^cYORA versus control genotype (p = 0.022, OR = 4.618, 95% CI = 1.099–19.404).

^dPMR versus total RA genotype (p = 0.004, OR = 3.047, 95% CI = 1.401–6.628).

^ePMR versus YORA genotype (p = 0.001, OR = 8.243, 95% CI = 1.894–35.876).

^fEORA versus YORA genotype (p = 0.037, OR = 4.727, 95% CI = 0.970–23.038).

[42]. In this regard, it has been suggested that carriers of the IL-1RN*2 allele have higher plasma levels of IL-1Ra [43] and also that this allele is strongly associated with an increased production of IL-1 β after *in vitro* stimulation [44]. The results of the present study confirm previous findings of other Southern European groups. Boiardi *et al.* found that isolated PMR was associated with IL-1RN*2 allele in the homozygous state [27]. In agreement with this, PMR patients from our cohort were significantly associated with IL-1RN*2/2 genotype. This association was clearly significant when compared with the control population and also when compared with other diseases such as GCA and YORA but, importantly, not with EORA. In agreement with another study [28], no association with susceptibility to GCA was found. Furthermore, in previous research and the present study, no association with disease severity in PMR and GCA was observed.

Cytokines are involved in the pathogenesis of most inflammatory diseases, and consequently many studies have been conducted

to investigate whether a genetic basis for these diseases may be found in polymorphisms of cytokine genes. As stated above, it has been suggested that cytokine gene polymorphisms may influence *in vivo* cytokine levels and therefore have a role in susceptibility or disease severity. However, the work by Warle *et al.* illustrates the weak consensus on the relationship between certain cytokine gene polymorphisms and *in vitro* cytokine production [42]. It is also possible that other nongenetic stimuli, such as the disease itself, might contribute to cytokine production. Thus, we compared *in vivo* and *in vitro* cytokine production between patients and healthy individuals according to the IL-1RN gene polymorphism. As shown here, we did not find a significant correlation between IL-1RN gene polymorphism and the *in vivo* or *in vitro* IL-1 β production in both patients and controls. Further studies are needed in which both healthy individuals and patients are tested by the same *in vitro* stimulation conditions. Multiple regulatory elements exist in the promoter region of cytokine genes, and the relationship between

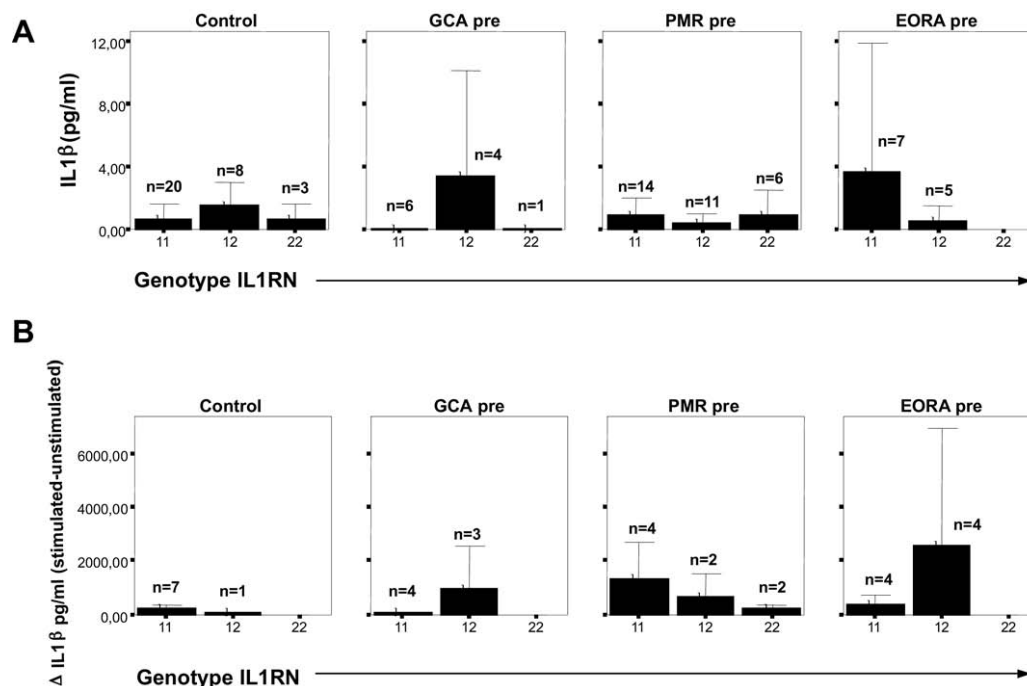


Fig. 1. Interleukin (IL)-1 β concentrations in patients and healthy volunteers. (A) Circulating IL-1 β was analyzed in healthy controls and patients with active untreated disease according to the IL-1RN genotypes. The quantification of IL-1 β protein levels in serum was performed using the BD Cytometric Bead Array (CBA). Only the most representative alleles were considered. Mean $\pm$ SD values are shown. (B) PBMCs from 10 patients of each disease group and controls were stimulated in culture with PMA and ionomycin for 24 hours. The determination of IL-1 β in supernatants was performed using CBA and measured as the differences (Δ IL-1 β) between stimulated culture and the unstimulated culture supernatants. Results are divided into patient groups and IL-1RN genotypes. Mean $\pm$ SD values are represented.

genotypes and levels of expression is both complicated and dependent on the producing cell type [42]. An important concern for clinicians who often see elderly patients is to differentiate isolated PMR from that associated with GCA [3]. This point is especially crucial, as GCA is associated with permanent ischemic manifestations in a significant proportion of patients [39]. Unfortunately, and despite the differences between PMR and GCA regarding the IL-1RN gene polymorphism, we did not find any association with disease severity in the present study. Another point of interest is to search for differences in genetic associations that may shed light on whether GCA and PMR have the same or different genetic backgrounds. One of the advantages of the present study is that we simultaneously analyzed three age-related syndromes that should be included in the differential diagnosis of elderly patients with polymyalgic symptoms and a strong systemic component. Interestingly enough, IL-1RN gene polymorphism analysis revealed that PMR patients are clearly different from GCA and also from the whole group of RA patients. However, in the RA population, these differences were related to the YORA group, which shows some differential features from EORA. Among them, EORA patients usually have a lower humoral response, as demonstrated by the lower frequency of RF and anti-CCP antibody positivity, compared with the YORA patients, as previously described [45]. Interestingly enough, PMR and EORA patients showed a similar distribution of IL-1RN genotypes. It is also possible that the association of PMR with the IL-1RN gene polymorphism studied in the present study is related to the disease itself and not to the presence of polymyalgic symptoms in the other patient populations. Thus, when we compared the IL-1RN gene polymorphism in patients with GCA or EORA subgrouped according to the presence of polymyalgic symptoms, no differences were found (data not shown). On the other hand, it may be argued that our control population is nonselected, as controls are not age and gender-matched, and this may contribute bias. However, a subgroup of well-characterized, healthy subjects more than 60 years of age from our cohort did not show any difference in the distribution of the IL-1RN polymorphism from those of the total control group (data not shown).

In summary, the presence of the IL1RN*2 polymorphism in a homozygous state was associated with an increased susceptibility to PMR when compared with that in control subjects as well as with other age-related conditions (GCA) in our population, but it did not seem to be related with the severity of the disease. These findings confirm previous studies and may provide some clues for differential therapy in age-related diseases.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundación Marqués de Valdecilla, Fondo de Investigación Sanitaria (05/0475), and Fundación Mutua Madrileña. Lorena Alvarez was supported by a grant for Research Aid from Wyeth Pharma (Spain). Lorena Fernandez was supported by ISCIII (CA06/0062). We are especially grateful to Iñaki Beares (supported by a grant for Research Aid from Schering-Plough, Spain), and Ainhoa Bolívar and María San Martín (supported by Fundación Marqués de Valdecilla) for their helpful technical assistance. We would like to thank the consultants of the Rheumatology Divisions who monitored the patients, along with all patients and controls included in the present study.

References

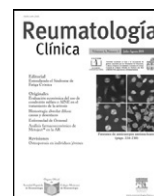
- [1] Martínez-Taboada VM, Goronzy JJ, Weyand CM. Conceptos actuales sobre la patogenia de la arteritis de células gigantes. *Rev Esp Reumatol* 1994;21:293–9.
- [2] Salvarani C, Cantini F, Boiardi L, Hunder GG. Polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *N Engl J Med* 2002;347:261–71.
- [3] Rodríguez-Valverde V, Sarabia JM, González-Gay MA, Figueroa M, Armona J, Blanco R, et al. Risk factors and predictive models of giant cell arteritis in polymyalgia rheumatica. *Am J Med* 1997;102:331–6.
- [4] Armona J, Rodríguez Valverde V, González-Gay MA, Figueroa M, Fernández-Sueiro JL, Blanco R, et al. Arteritis de células gigantes. Estudio de 191 pacientes. *Med Clin (Barc)* 1995;105:734–7.
- [5] Huston KA, Hunder GG, Lie JT, Kennedy KH, Elveback LR. Temporal arteritis. A 25 year epidemiological, clinical and pathologic study. *Ann Intern Med* 1978;88:162–7.
- [6] Emilie D, Liozon E, Crevon MC, Lavignac C, Portier A, Liozon F, et al. Production of interleukin 6 by granulomas of giant cell arteritis. *Hum Immunol* 1994;39:17–24.
- [7] Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today* 1994;15:74–80.
- [8] Arend WP, Guthridge CJ. Biological role of interleukin-1 receptor antagonist isoforms. *Ann Rheum Dis* 2000;59 (Suppl 1):i60–4.
- [9] Lecron JC, Roblot P, Chevalier S, Morel F, Alderman E, Gombert J, et al. High circulating leukaemia inhibitory factor in patients with giant cell arteritis: Independent regulation of LIF and IL-6 under corticosteroid therapy. *Clin Exp Immunol* 1993;92:23–6.
- [10] Roche NE, Fulbright JW, Wagner AD, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. Correlation of interleukin-6 production and disease activity in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:1286–94.
- [11] Corrigal VM, Dolan AL, Dasgupta B, Pahayi GS. The sequential analysis of T lymphocyte subsets and interleukin-6 in polymyalgia rheumatica as predictors of disease remission and steroid withdrawal. *Br J Rheumatol* 1997;36:976–80.
- [12] Uddhammar A, Sundqvist KG, Ellis B, Rantapää-Dahlqvist S. Cytokines and adhesion molecules in patients with polymyalgia rheumatica. *Br J Rheumatol* 1998;37:766–9.
- [13] Straub RH, Gluck T, Cutolo M, Georgi J, Helmke K, Schölmerich J, et al. The adrenal steroid status in relation to inflammatory cytokines (interleukin-6 and tumor necrosis factor) in polymyalgia rheumatica. *Rheumatology* 2000;39:624–31.
- [14] Cutolo M, Straub RH, Foppiani L, Prete C, Pulsatelli L, Sulli A, et al. Adrenal gland hypofunction in active polymyalgia rheumatica. Effect of glucocorticoid treatment on adrenal hormones and interleukin 6. *J Rheumatol* 2002;29:748–56.
- [15] Cutolo M, Montecucco CM, Cavagna L, Caporali R, Capellino S, Montagna P, et al. Serum cytokines and steroidal hormones in polymyalgia rheumatica and elderly-onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:1438–43.
- [16] Hernandez-Rodriguez J, Garcia-Martinez A, Casademont J, Filella X, Esteban MJ, Lopez-Soto A, et al. A strong initial systemic inflammatory response is associated with higher corticosteroid requirements and longer duration of therapy in patients with giant-cell arteritis. *Arthritis Rheum* 2002;47:29–35.
- [17] Roblot P, Morel F, Lelievre E, Gascan H, Wijdenes J, Lecron JC. Serum cytokine and cytokine receptor levels in patients with giant cell arteritis during corticosteroid therapy. *J Rheumatol* 1996;23:408–10.
- [18] Wagner AD, Goronzy JJ, Weyand CM. Functional profile of tissue infiltrating and circulating CD68+ cells in giant cell arteritis. Evidence for two components of the disease. *J Clin Invest* 1994;94:1134–40.
- [19] Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sánchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ, et al. Elevated production of interleukin 6 is associated with a lower incidence of disease-related ischemic events in patients with giant-cell arteritis. *Circulation* 2003;107:2428–34.
- [20] Weyand CM, Hicok KC, Hunder GG, Goronzy JJ. Tissue cytokine patterns distinguish polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis. *Ann Intern Med* 1994;121:484–91.
- [21] Weyand CM, Wagner AD, Björnsson J, Goronzy JJ. Correlation of the topographical arrangement and the functional pattern of tissue-infiltrating macrophages in giant cell arteritis. Evidence for two components of the disease. *J Clin Invest* 1996;98:1642–9.
- [22] Hernandez-Rodriguez J, Segarra M, Vilardell C, Sánchez M, Garcia-Martinez A, Esteban MJ, et al. Tissue production of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α and IL-6) correlates with the intensity of the systemic inflammatory response and with corticosteroid requirements in giant-cell arteritis. *Rheumatology* 2004;43:294–301.
- [23] Weyand CM, Tetzlaff N, Björnsson J, Brack A, Young B, Goronzy JJ. Disease patterns and tissue cytokine profiles in giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1997;40:19–26.
- [24] Straub RH, Herfarth HH, Rinkes B, Konecna L, Gluck T, von Landerberg P, et al. Favorable role of interleukin 10 in patients with polymyalgia rheumatica. *J Rheumatol* 1999;26:1318–25.
- [25] Pountain G, Hazleman B, Cawston TE. Circulating levels of IL-1b, IL-6 and soluble IL-2 receptor in polymyalgia rheumatica and giants cell arteritis and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1998;37:797–8.
- [26] Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med* 2005;201:1355–9.
- [27] Boiardi L, Salvarani C, Timms JM, Silvestri T, Macchioni PL, di Giovine FS. Interleukin-1 cluster and tumor necrosis factor- α gene polymorphisms in polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:675–81.
- [28] González-Gay MA, di Giovine FS, Silvestri T, Amoli MM, Garcia-Porrúa C, Thomson W, et al. Lack of association between IL-1 cluster and TNF- α gene polymorphisms in giant cell arteritis. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18:431.
- [29] Hacker UT, Erhardt S, Tschöp K, Jelinek T, Endres S. Influence of the IL-1Ra gene polymorphism on in vivo synthesis of IL-1Ra and IL-1 β after live yellow fever vaccination. *Clin Exp Immunol* 2001;125:465–9.
- [30] Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: Inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* 1995;99:303–10.

- [31] Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Edworthy SM, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the Classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:1122–8.
- [32] Martínez-Taboada V, Brack A, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. The inflammatory infiltrate in giant cell arteritis selects against B lymphocytes. *J Rheumatol* 1996;23:1011–4.
- [33] Chuang T-Y, Hunder GG, Ilstrup DM, Kurland LT. Polymyalgia rheumatica: A 10- year epidemiologic and clinical study. *Ann Intern Med* 1982;97:672–80.
- [34] González-Gay MA, Rodríguez-Valverde V, Blanco R, Fernández-Sueiro JL, Armona J, Blanco R, et al. Polymyalgia rheumatica without significantly increased ESR: A more benign syndrome. *Arch Intern Med* 1997;157:317–20.
- [35] 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.
- [36] Brack A, Martínez-Taboada VM, Stanson R, Goronzy JJ, Weyand CM. Disease pattern in cranial and large-vessel giant cell arteritis. *Arthritis Rheum* 1999;42:311–7.
- [37] Tarlow JK, Blakemore AI, Lennard A, Solari R, Hughes HN, Steinkasserer A, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. *Hum Genet* 1993;91:403–4.
- [38] Martínez-Taboada VM, Bartolome MJ, Lopez-Hoyos M, Blanco R, Mata C, Calvo J, et al. HLA-DRB1 allele distribution in polymyalgia rheumatica and giant cell arteritis: Influence on clinical subgroups and prognosis. *Semin Arthritis Rheum* 2004;34:454–64.
- [39] Martínez-Taboada V, Blanco R, Rodríguez-Valverde V. Arteritis de células gigantes. *Seminarios de Reumatología* 2000;1:141–57.
- [40] Cantini F, Niccoli L, Nannini C, Padula A, Olivieri I, Boiardi L, et al. Inflammatory changes of hip synovial structures in polymyalgia rheumatica. *Clin Exp Rheumatol* 2005;23:462–8.
- [41] Cantini F, Salvarani C, Olivieri I, Niccoli L, Padula A, Macchioni L, et al. Shoulder ultrasonography in the diagnosis of polymyalgia rheumatica: A case-control study. *J Rheumatol* 2001;28:1049–55.
- [42] Warle MC, Farhan A, Metselaar HJ, Hop WC, Perrey C, Zondervan PE, et al. Are cytokine polymorphisms related to *in vitro* cytokine production profiles? *Liver Transpl* 2003;9:170–81.
- [43] Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are coordinately regulated by both IL-1RA and IL-1 beta genes. *Eur J Immunol* 1998;28:2598–602.
- [44] Santtila S, Savinainen K, Hurme M. Presence of IL-1RA allele 2 (IL-1RN*2) is associated with enhanced IL-1 beta production *in vitro*. *Scand J Immunol* 1998;47:195–8.
- [45] Lopez-Hoyos M, Ruiz de Alegria C, Blanco R, Crespo J, Peña M, Rodríguez-Valverde V, et al. Clinical utility of anti-CCP antibodies in the differential diagnosis of elderly-onset rheumatoid arthritis and polymyalgia rheumatica. *Rheumatology* 2004;43:655–7.



Reumatología Clínica

www.reumatologiaclinica.org



Original

Análisis del polimorfismo rs20541 (R130Q) del gen de la IL-13 en pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento

Lorena Álvarez-Rodríguez^a, Marcos López-Hoyos^b, Eugenio Carrasco-Marín^b, Cristina Mata^c, Jaime Calvo-Alén^c, Elena Aurrecoechea^c, Ricardo Blanco^a, Teresa Ruiz^c, Pedro Muñoz Cacho^d, Ignacio Villa^c y Víctor Manuel Martínez-Taboada^{a,*}

^a Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, España

^b Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander, España

^c Sección de Reumatología, Hospital de Sierrallana, Torrelavega, Cantabria, España

^d Gerencia Atención Primaria, Servicio Cántabro de Salud, Cantabria, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 12 de abril de 2012

Aceptado el 25 de abril de 2012

On-line el xxx

Palabras clave:

Interleucina 13

Arteritis de células gigantes

Polimialgia reumática

Artritis reumatoide de inicio en el anciano

Polimorfismo

Envejecimiento

RESUMEN

Objetivo: Investigar si existe asociación del polimorfismo rs20541 (R130Q) del gen de la IL-13 con la susceptibilidad y la expresión clínica de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas asociadas al envejecimiento.

Material y métodos: Se estudiaron 78 pacientes con arteritis de células gigantes (ACG), 174 con polimialgia reumática (PMR), 90 con artritis reumatoide de comienzo en el anciano (EORA), y 465 controles sanos de la misma zona geográfica. El polimorfismo rs20541 (R130Q) para IL-13 se evaluó mediante PCR-RFLP. Los niveles de IL-13 circulante se determinaron por ELISA.

Resultados: En los pacientes con ACG se observó una mayor frecuencia del genotipo AA [2,349 (0,994-5,554)], así como del alelo A [1,589 (1,085-2,328)] y de portadores de dicho alelo [1,656 (1,021-2,686)] ($p < 0,05$). No encontramos diferencias significativas entre los pacientes con PMR y EORA respecto al grupo control. Cuando comparamos las diferentes patologías entre sí, tampoco encontramos diferencias significativas entre ellas. En los pacientes con ACG las diferencias en el genotipo se asociaron con el pronóstico de la enfermedad. En pacientes con PMR, el genotipo AA se asoció con niveles más elevados de IL-13 circulante comparado con el GA. Sin embargo, esta asociación no se apreció para los controles o las otras enfermedades.

Conclusiones: La ACG es más frecuente en individuos portadores del polimorfismo rs20541 (R130Q) del gen de la IL13. La utilidad de este gen para predecir el pronóstico en ACG debe ser confirmada en estudios con mayor número de pacientes.

© 2012 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Analysis of the rs20541 (R130Q) polymorphism in the IL-13 gene in patients with elderly-associated chronic inflammatory diseases

ABSTRACT

Objective: To investigate whether there is association between the rs20541 (R130Q) polymorphism in the IL-13 gene with disease susceptibility and clinical subsets in patients with elderly-associated inflammatory chronic diseases.

Material and methods: 78 patients with giant cell arteritis (GCA), 174 with polymyalgia rheumatica (PMR), 90 elderly-onset rheumatoid arthritis (EORA), and 465 healthy controls from the same geographic area were studied. The rs20541 (R130Q) polymorphism in the IL-13 gene was evaluated by PCR-RFLP. Circulating levels of IL-13 were measured by ELISA.

Results: A higher frequency of the AA genotype [2,349 (0.994-5.554)], as well as the allele A [1,589 (1.085-2.328)] and the A carriers [1,656 (1.021-2.686)] ($p < 0.05$) was observed in the GCA patients. No significant differences were observed in the PMR and EORA patients as compared with the healthy controls. Neither

Keywords:

Interleukin 13

Giant cell arteritis

Polymyalgia rheumatica

Elderly-onset rheumatoid arthritis

Polymorphism

Aging

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: vmartinez@medynet.com (V.M. Martínez-Taboada).

difference was observed among the different disease groups studied. In GCA patients, differences in the genotype were associated with a worse prognosis. In PMR patients, the AA genotype was associated with higher levels of serum IL-13 than the GA one. However, such an association was not detected for controls and the other disease groups.

Conclusions: GCA is more frequent in carriers of the rs20541 (R130Q) polymorphism in the IL-13 gene. The utility of this polymorphism to predict the GCA prognosis must be confirmed in studies with a higher number of patients.

© 2012 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

El proceso de envejecimiento se acompaña de cambios cualitativos y cuantitativos en el sistema inmune, que se agrupan bajo el término de inmunosenescencia¹. Como consecuencia de ello, los ancianos muestran un aumento en la susceptibilidad a padecer neoplasias, infecciones y enfermedades autoinmunes². En este sentido, el envejecimiento se acompaña de la aparición de algunas enfermedades asociadas a la edad, y uno de los mejores ejemplos es la arteritis de células gigantes (ACG), una vasculitis sistémica granulomatosa con preferencia por arterias de mediano y gran vaso³. Las manifestaciones clínicas de la ACG varían desde síntomas craneales clásicos, hasta el síndrome del arco aórtico o manifestaciones menos específicas tales como fiebre, pérdida de peso o síndrome polimiálgico⁴⁻⁷. La polimialgia reumática (PMR) es un síndrome caracterizado por dolor y rigidez en cuello, cintura escapular y pélvica que también afecta solo a individuos de edad avanzada⁸. Aunque la PMR ocurre normalmente en ausencia de ACG, algunos pacientes pueden también desarrollar arteritis en el transcurso de la enfermedad⁹. Por otro lado, se ha sugerido que la PMR y la artritis reumatoide de inicio en el anciano (EORA), especialmente la forma seronegativa, tienen mucho en común¹⁰.

El perfil de citocinas derivadas de células T en este tipo de patologías inflamatorias asociadas al envejecimiento sugiere que se trata de enfermedades fundamentalmente dirigidas o mediadas por una respuesta Th1. Esto puede deberse a un aumento en la expresión de citocinas Th1, como es el caso del IFN- γ el cual desempeña un papel crucial en el desarrollo de la ACG¹¹, o bien a un defecto en la regulación activa por parte de citocinas Th2.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios de polimorfismos de genes de citocinas en PMR y ACG¹². Sin embargo, estos estudios se han centrado en citocinas pro-inflamatorias y Th1 más que en citocinas Th2. La respuesta inmune Th2 se caracteriza por la expresión de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Teóricamente un descenso en la actividad de estas citocinas Th2 podría acompañarse de mayor gravedad en estas enfermedades mientras que una actividad Th2 aumentada podría asociarse con un cuadro clínico más leve. Existe solo un estudio previo llevado a cabo por Amoli et al.¹³ en el cual se observa una asociación ligeramente significativa entre ACG y algunos polimorfismos genéticos de un solo nucleótido (SNPs) de IL-4.

La IL-13 es una proteína inmunorreguladora producida principalmente por las células Th2 activadas¹⁴ y está implicada en la maduración y diferenciación de células B. Promueve la expresión de CD23 y moléculas de histocompatibilidad de clase II¹⁵ así como el cambio de isotipo a IgE en las células B¹⁶. Asimismo, IL-13 disminuye la actividad de los macrófagos, inhibiendo por tanto la producción de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β , IL-6 y TNF- α entre otras. Recientemente se han identificado numerosos polimorfismos en el gen de IL-13 y se han asociado con niveles de IgE y/o enfermedades alérgicas¹⁷. Uno de los SNPs se localiza en el exón 4 en la posición 2044 (cambio de G por A, llamado G2044A) y causa un cambio de aminoácido (arginina por glutamina en el codón 130, denominado R130Q), lo que posiblemente afecta a la interacción ligando-receptor^{18,19}.

El objetivo de este estudio fue investigar la asociación entre el polimorfismo R130Q del gen de la IL-13 y la susceptibilidad en ACG y otras 2 enfermedades inflamatorias asociadas a la edad como son la PMR y la EORA.

Pacientes y métodos

Pacientes

El presente estudio incluyó 78 pacientes con ACG, 174 pacientes con PMR y 90 pacientes con EORA (tabla 1). Como grupo control se incluyeron 465 individuos sanos reclutados en la misma región que no presentaban evidencia alguna de las enfermedades antes mencionadas. Tanto pacientes como controles eran de origen caucásico, de ancestros españoles y residentes en la misma área geográfica del norte de España, Cantabria. La obtención de muestras y los estudios se realizaron tras la obtención de un consentimiento informado escrito, y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética regional.

Todos los pacientes con ACG cumplían los criterios de clasificación del American College of Rheumatology de 1990 para la ACG²⁰. Como se muestra en la tabla 1, el 82,7% de los pacientes con ACG presentaban evidencia histológica característica en las biopsias de la arteria temporal²¹. Los pacientes con PMR se diagnosticaron de acuerdo a los criterios propuestos por Chuang et al.⁸. También se incluyeron en el estudio pacientes con PMR con VSG < 40 mm/1 h pero que cumplían los otros criterios clínicos²². Los pacientes con artritis reumatoide (AR) debían satisfacer los criterios clínicos para AR revisados por la ACR en 1987²³. Los pacientes con AR se consideraron de inicio en el anciano si los síntomas de la enfermedad comenzaban a partir de la edad de 60 años²⁴. Un tercio de los pacientes con EORA eran factor reumatoide (FR) positivo ($280,3 \pm 509,7$ IU/ml) y el 25% eran positivos para los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (APCC) (1.012 ± 623 U/ml).

En la PMR y la ACG las características clínicas al diagnóstico y durante el seguimiento, los valores de PCR y VSG al diagnóstico, así como la dosis inicial de prednisona, se recogieron de forma protocolizada mediante la revisión de las historias clínicas de los pacientes. Los pacientes se agruparon de acuerdo a la presencia o ausencia de síndrome polimiálgico, y a la presencia o ausencia de manifestaciones isquémicas. Las manifestaciones isquémicas se definieron como la presencia de pérdida visual, claudicación mandibular, accidentes cerebrovasculares y/o síndromes del arco aórtico^{4,7}. En los pacientes con más de 2 años de seguimiento se incluyó el análisis de algunas variables como recidivas, duración del tratamiento con corticosteroides (CS), y dosis acumulada de prednisona^{5,8,25}. En los pacientes con ACG y PMR evaluamos la gravedad de la enfermedad en términos de presencia de recidivas y/o recurrencias, la duración del tratamiento con corticoides y la dosis acumulada de los mismos. En pacientes con EORA no se evaluó la gravedad de la enfermedad de forma sistemática.

Al diagnóstico los pacientes con PMR aislada recibieron una dosis inicial de prednisona de 10 mg/día (5 mg/12 h). Los pacientes con ACG recibieron una dosis inicial de prednisona entre 40-60 mg/día. Aquellos con complicaciones isquémicas también recibieron 3 pulsos i.v. de 1 g de metil-prednisolona/día.

Tabla 1

Características demográficas, clínicas y de laboratorio en los pacientes con arteritis de células gigantes (ACG), polimialgia reumática (PMR), y artritis reumatoide de inicio en el anciano (EORA) incluidos en el estudio

	ACG (n = 78)	PMR (n = 174)	EORA (n = 90)
Mujeres (%)	61,5	60,3	64,4
Edad al diagnóstico (media $\pm$ DE, años)	73,7 $\pm$ 7,5	72,9 $\pm$ 7,6	70,4 $\pm$ 7,5
Biopsia positiva/número total de biopsias de arteria temporal realizadas (%)	62/75 (82,7%)	0/64 (0%)	0/2 (0%)
Manifestaciones isquémicas (%)	53,3	Ninguna	
VSG (media $\pm$ DE, mm/seg)	86,4 $\pm$ 32,9 ^a	56,6 $\pm$ 30,0	66,8 $\pm$ 34,1
PCR (media $\pm$ DE, mg/dl)	8,7 $\pm$ 5,6 ^b	4,7 $\pm$ 5,1	6,3 $\pm$ 5,2
Duración del seguimiento (media $\pm$ DE, meses)	65,6 $\pm$ 47,4	49,8 $\pm$ 45,7	72,1 $\pm$ 69,3

DE: desviación estándar; PCR: proteína C reactiva; VSG: velocidad de sedimentación globular.

^aACG vs PMR: $p \leq 0,001$ tanto para VSG como PCR.

^bACG vs EORA: $p = 0,004$ para VSG y $p = 0,021$ para PCR.

La reducción en el tratamiento con CS fue individualizada y según juicio médico.

Genotipaje del polimorfismo R130Q del gen de la IL-13

El ADN genómico de los individuos estudiados se extrajo a partir de sangre usando un kit de purificación para ADN (GENTRA, GENERATION® DNA Purification kits; MN; EE. UU.). El polimorfismo de IL13 rs20541 (R130Q)¹⁸ se determinó mediante la amplificación del gen usando 2 cebadores: Sentido 5'-CTTCCGTGAGGACTGAATGAGACGGTC-3' y antisentido 5'-GCAAATAATGATGCTTTCGAAGTTTCAGTGG-3'. Las condiciones de amplificación fueron 4 min a 94 °C, 1 min a 69 °C y 2 min a 72 °C, y después se sometieron a 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 67 °C y 30 s a 72 °C, 5 min para la extensión a 72 °C. Los productos de la PCR se digirieron mediante la adición de 0,25 U *Nla*IV e incubación a 37 °C durante 3,30 h. El tamaño de los fragmentos esperados tras la digestión en el genotipo normal fue de 210 pares de bases (pb) y 26 pb, mientras que el alelo mutante se determinó por la presencia de 3 bandas de 178, 32 y 26 pb.

Cuantificación de IL-13 en suero

La determinación de la concentración de IL-13 en suero se realizó mediante ELISA. El suero se recogió y se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis. Los niveles séricos de IL-13 se determinaron mediante el kit de ELISA Pelikine Compact Human IL-13 (Sanquin, Ámsterdam, Holanda). El límite de detección fue de 3 pg/ml.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo usando el software SPSS 15,0 (Chicago, IL, EE. UU.). La asociación entre PMR, ACG o EORA y los alelos o genotipos del gen de IL-13 se estimó usando odd

ratios (OR) e intervalos de confianza al 95% (IC). Las frecuencias de los alelos y genotipos se compararon con el test de Chi cuadrado. Para evaluar las diferencias entre grupos en el caso de variables numéricas, se emplearon los test de Mann-Whitney y el de Kruskal-Wallis según estuviese indicado. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue $< 0,05$.

Resultados

Características demográficas y clínicas

Las principales características demográficas, clínicas y de laboratorio de las diferentes poblaciones a estudio se muestran en la tabla 1. La mayoría de los pacientes con ACG tenían una biopsia de la arteria temporal positiva. En la mitad de los pacientes con ACG se observaron complicaciones isquémicas. Además, los pacientes con ACG tenían niveles más elevados de VSG y PCR comparado con aquellos pacientes con PMR y EORA. No encontramos diferencias estadísticamente significativas de VSG y PCR entre PMR y EORA.

El polimorfismo R130Q del gen de la IL-13 se asocia a la susceptibilidad a padecer arteritis de células gigantes

Las distribuciones alélicas de las poblaciones a estudio se hallaban en equilibrio de Hardy-Weinberg, excepto para los pacientes con PMR ($p = 0,025$). Las distribuciones alélicas y genotípicas del polimorfismo R130Q del gen de la IL-13 en los distintos grupos de pacientes comparado con los controles se muestran en las tablas 2-4. En los pacientes con ACG comparado con el grupo control se observó una mayor frecuencia del genotipo AA, así como del alelo A y de ser portador de dicho alelo (tabla 2). No se observaron diferencias significativas en la distribución del polimorfismo R130Q del gen de la IL-13 entre los pacientes con PMR o EORA y los controles sanos (tablas 3 y 4). Cuando comparamos las diferentes patologías entre sí, no encontramos ninguna diferencia significativa

Tabla 2

Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del gen de IL-13 rs20541 (R130Q) en pacientes con arteritis de células gigantes (ACG) comparado con controles sanos

Genotipo	Control N= 465	ACG N= 78	p	OR (95% IC)
IL-13 [db SNP ID rs20541 (R130Q)]				
<i>Frecuencia genotípica</i>				
GG	301/465 (64,7)	41/78 (52,6)		Referencia
GA	139/465 (29,9)	29/78 (37,2)	0,104	1,532 (0,914-2,567)
AA	25/465 (5,4)	08/78 (10,3)	0,046	2,349 (0,994-5,554)
<i>Frecuencia alélica</i>				
G	741/930 (79,7)	111/156 (71,2)		Referencia
A	189/930 (20,3)	45/156 (28,8)	0,017	1,589 (1,085-2,328)
<i>Frecuencia portadores alélicos</i>				
Alelo G	440/465 (94,6)	70/78 (89,7)	0,095	0,497 (0,216-1,146)
Alelo A	164/465 (35,3)	37/78 (47,4)	0,039	1,656 (1,021-2,686)

Tabla 3

Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del gen de IL-13 rs20541 (R130Q) en pacientes con polimialgia reumática (PMR) comparado con controles sanos

Genotipo	Controles N= 465	PMR N= 174	p	OR (95% IC)
IL-13 [db SNP ID rs20541 (R130Q)]				
<i>Frecuencia genotípica</i>				
GG	301/465 (64,7)	107/174 (61,5)	0,796	Referencia
GA	139/465 (29,9)	52/174 (29,9)		1,052 (0,714-1,550)
AA	25/465 (5,4)	15/174 (8,6)		1,688 (0,858-3,322)
<i>Frecuencia alélica</i>				
G	741/930 (79,7)	266/348 (76,4)	0,207	Referencia
A	189/930 (20,3)	82/348 (23,6)		1,209 (0,900-1,623)
<i>Frecuencia portadores alélicos</i>				
Alelo G	440/465 (94,6)	159/174 (91,4)	0,132	0,602 (0,310-1,171)
Alelo A	164/465 (35,3)	67/174 (38,5)	0,448	1,149 (0,802-1,647)

Tabla 4

Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo del gen de IL-13 rs20541 (R130Q) en pacientes con artritis reumatoide de inicio en el anciano (EORA) comparado con controles sanos

Genotipo	Controles N= 465	EORA N= 90	p	OR (95% IC)
IL-13 [db SNP ID rs20541 (R130Q)]				
Frecuencia genotípica				
GG	301/465 (64,7)	50/90 (55,6)	0,065	Referencia
GA	139/465 (29,9)	36/90 (40,0)		1,559 (0,971-2,503)
AA	25/465 (5,4)	04/90 (4,4)		0,963 (0,322-2,885)
Frecuencia alélica				
G	741/930 (79,7)	136/180 (75,6)	0,214	Referencia
A	189/930 (20,3)	44/180 (24,4)		1,268 (0,871-1,847)
Frecuencia portadores alélicos				
Alelo G	440/465 (94,6)	86/90 (95,6)	0,716	1,222 (0,415-3,599)
Alelo A	164/465 (35,3)	40/90 (44,4)	0,098	1,468 (0,929-2,319)

entre ellas (tablas suplementarias 1, 2 y 3). Cuando se analizaron las 3 patologías asociadas al envejecimiento de forma conjunta (tabla suplementaria 4) observamos una tendencia similar a la observada en los pacientes con ACG.

Niveles séricos de IL-13 en pacientes con patología inflamatoria crónica asociada al envejecimiento y asociación con el polimorfismo del gen de la IL-13

Dado que el estudio se centra en el análisis de un polimorfismo en el gen de la IL-13 analizamos las diferencias existentes en los niveles de IL-13 en el suero de los pacientes incluidos en el estudio (fig. 1). Los datos reflejan un aumento no significativo de la concentración de IL-13 sérica en pacientes con EORA activa respecto a los controles sanos en límite de la significación estadística ($p=0,066$) y a los pacientes con ACG y PMR activos. Tras el tratamiento esteroideo, los niveles disminuían en los 3 grupos de pacientes aunque en el grupo de EORA los niveles postratamiento se mantuvieron significativamente más elevados que en el de ACG y PMR (ACG post vs EORA post $p=0,037$ y PMR post vs EORA post $p=0,024$).

Puesto que el polimorfismo R130Q induce un cambio de aminoácido funcional, quisimos analizar la repercusión que dicho polimorfismo tenía en la concentración sérica de IL-13 en los distintos grupos de pacientes. Dado que el polimorfismo R130Q fue muy poco frecuente, los datos no fueron significativos, aunque se observó una tendencia a tener niveles más disminuidos de IL-13 sérica en los sujetos sanos AA comparado con los GA y GG. Esta misma tendencia se observó también en los pacientes con ACG y EORA. En cambio, los pacientes con PMR y portadores del genotipo AA mostraron niveles más elevados de IL-13 circulante (fig. 2). Cuando analizamos los 3 grupos de pacientes de forma conjunta no observamos diferencias significativas en los niveles de IL-13 circulante para los distintos genotipos (fig. 4).

Estudios de asociación entre el polimorfismo del gen de IL-13 y los niveles circulantes de IL-13 con las manifestaciones clínicas y pronóstico en pacientes con arteritis de células gigantes y polimialgia reumática

Para evaluar la posible influencia tanto del genotipo del polimorfismo de IL-13 estudiado como de los niveles circulantes de IL-13 en

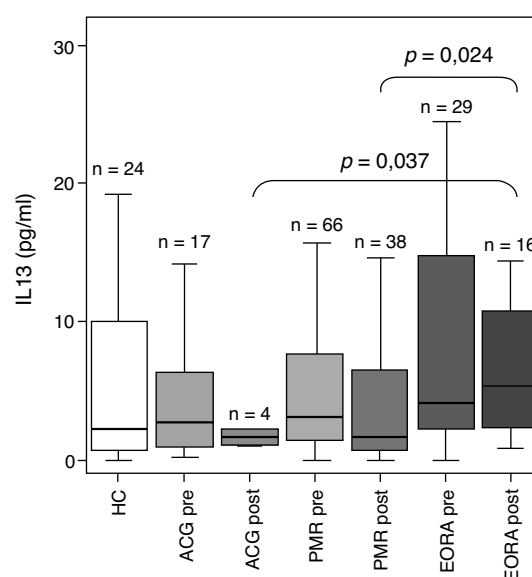


Figura 1. Concentración sérica de IL-13 en pacientes con arteritis de células gigantes (ACG), polimialgia reumática (PMR) y artritis reumatoide de inicio en el anciano (EORA) en comparación con sujetos controles sanos pareados para edad y sexo (HC). Los resultados se presentan como boxplots con mediana y rango intercuartílico en cada grupo. Se representan los datos obtenidos en pacientes en fase activa de la enfermedad (pre) y en remisión tras tratamiento esteroideo (post). Se indica el número de sujetos en cada grupo y la significación estadística solo cuando la p fue menor de 0,05.

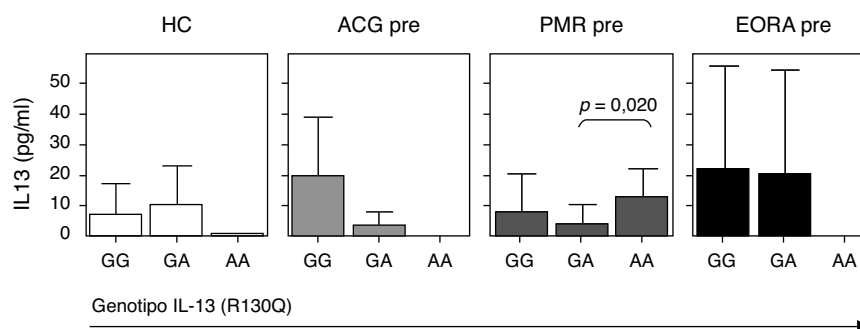


Figura 2. Concentración sérica de IL-13 en función del SNP R130Q en el gen de la IL-13. Los datos se representan por separado en pacientes con enfermedad activa de arteritis de células gigantes (ACG; N=15), polimialgia reumática (PMR; N=71) y artritis reumatoide de inicio en el anciano (EORA; N=28) y sujetos controles sanos pareados para edad y sexo (HC; N=21).

los distintos subgrupos clínicos, analizamos los pacientes con ACG de acuerdo a la presencia o ausencia de manifestaciones isquémicas o síndrome polimiálgico, los pacientes con PMR de acuerdo a los niveles de VSG («baja» o menor de 40 mm/1.^a h y «clásica» o mayor de 40 mm/1.^a h), y los pacientes con EORA se subdividieron según su forma de inicio en inicio polimiálgico o clásico. Aunque no dispusimos de información detallada sobre la actividad y el pronóstico de los pacientes con EORA, se analizó también la posible influencia del genotipo en la presencia de autoanticuerpos típicos (FR y APCC) y su título. No encontramos ninguna asociación significativa entre el genotipo o los niveles circulantes de IL-13 con ninguna de las variables antes mencionadas.

En los pacientes con ACG y PMR evaluamos el pronóstico de la enfermedad analizando en aquellos pacientes con más de 2 años de seguimiento la presencia de recidivas y/o recurrencias, la duración del tratamiento con corticoides y la dosis acumulada de los

mismos. Como se muestra en la figura 3 (panel superior), en los pacientes con ACG el genotipo GA se asoció con una menor duración del tratamiento con corticoides y una dosis acumulada más baja de los mismos, probablemente debido a una menor tasa de recidivas/recurrencias. No encontramos ninguna relación de estos factores pronósticos con los niveles circulantes de IL-13.

Discusión

La IL-13 es una proteína inmunorreguladora producida principalmente por las células Th2 activadas¹⁴ y está implicada en la maduración y diferenciación de células B¹⁵. Esta citocina se considera parte de la respuesta inmune Th2 y una hipótesis razonable es que el desequilibrio en el balance Th1/Th2 podría participar en la etiopatogenia de enfermedades crónicas relacionadas con la edad y que son el resultado de un desequilibrio en la regulación del

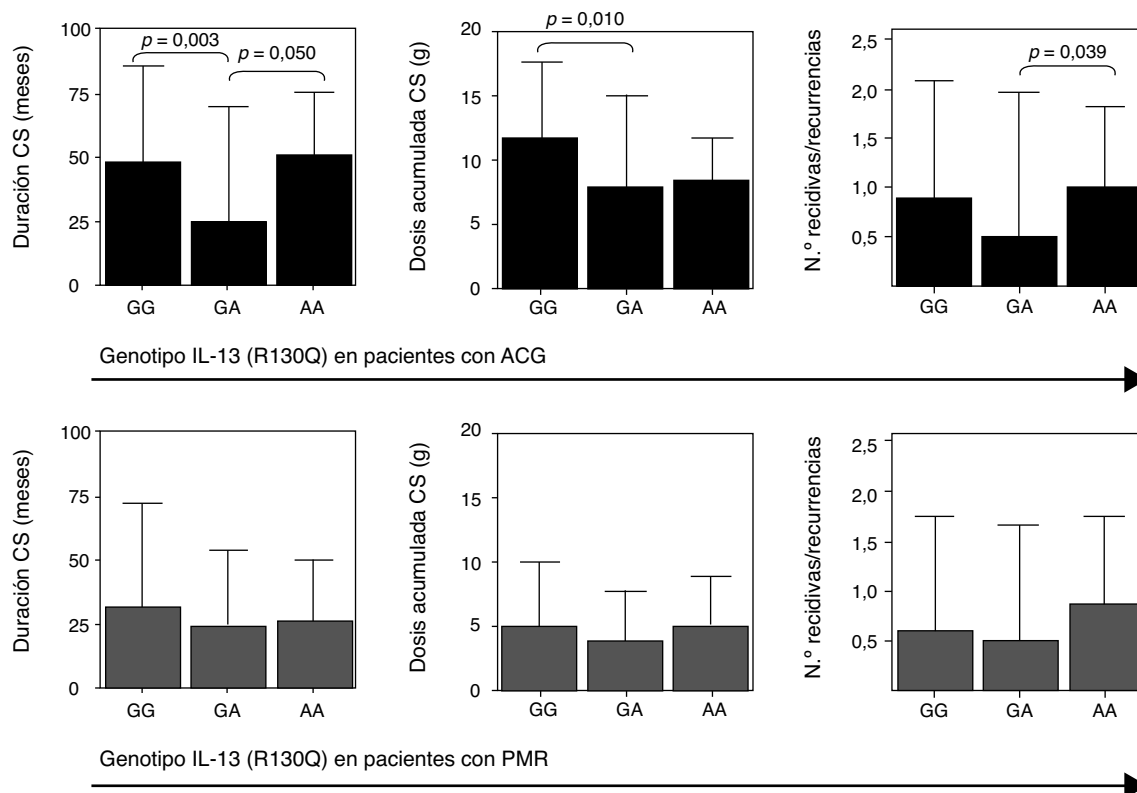


Figura 3. Duración en meses del tratamiento con corticoides (CS, izquierda), dosis acumulada de CS (medio) y número de recidivas y recurrencias (derecha) en función del SNP R130Q en el gen de la IL-13. Los datos se representan por separado en pacientes con enfermedad activa de arteritis de células gigantes (ACG, n=55; panel superior) y polimialgia reumática (PMR, n=120; panel inferior).

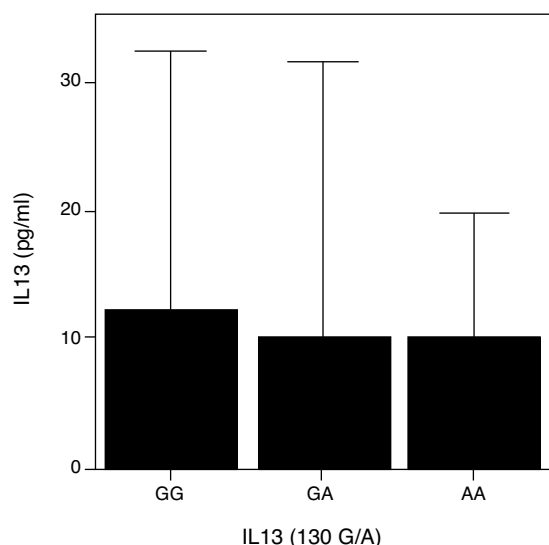


Figura 4. Concentración sérica de IL-13 en función del SNP R130Q en el gen de la IL-13. Los datos se representan de forma conjunta para los pacientes con enfermedad activa de las tres patologías incluidas en el estudio (N.º total=114: arteritis de células gigantes [ACG; N = 15], polimialgia reumática [PMR; N = 71] y artritis reumatoide de inicio en el anciano [EORA; N = 28]).

sistema inmune. De acuerdo con esta hipótesis, una predisposición genética en la expresión de los genes codificantes para citocinas Th2 podría influir en la gravedad y/o susceptibilidad de estas 3 patologías. Existe solo un estudio previo llevado a cabo por Amoli et al.¹³ en el cual se observa una asociación ligeramente significativa entre ACG y algunos SNPs para IL-4. Sin embargo, estos resultados eran más significativos cuando se consideraban solo aquellos pacientes HLA-DRB1*04, sugiriendo una interacción entre HLA-DRB1 e IL-4 que contribuía a aumentar la susceptibilidad de la enfermedad¹³.

Por tanto, tomando en consideración la falta de estudios previos que estudian la influencia de genes de citocinas Th2 analizamos por primera vez la influencia del polimorfismo rs20541 (R130Q) en el gen que codifica para la IL-13 en estas patologías. Para ello, el presente estudio analizó el polimorfismo R130Q del gen de la IL-13 en una serie amplia de pacientes con enfermedades inflamatorias asociadas al envejecimiento.

Los datos muestran una asociación de este polimorfismo con la susceptibilidad a sufrir ACG. Aunque las diferencias encontradas en el presente trabajo solo son significativas para los pacientes con ACG, los pacientes con PMR muestran una tendencia similar. Sin embargo, la potencia estadística del estudio para las comparaciones en las frecuencias alélicas y genotípicas de los pacientes con PMR son bajas, oscilando entre el 12 y el 34%, por lo que los resultados obtenidos deben tomarse con cautela, y confirmarse en estudios que contengan un número más elevado de pacientes. Aunque en este estudio se observa una asociación significativa entre el polimorfismo analizado y la ACG no podemos excluir que otro polimorfismo dentro de este gen o de su receptor puedan asociarse a la susceptibilidad y/o gravedad de estas enfermedades. De hecho, el polimorfismo estudiado en el presente trabajo es el asociado de forma más clara con asma y atopia, sobre todo en niños. En cambio, en patología inflamatoria reumatológica se ha descrito la asociación de otros polimorfismos en el gen de la IL-13 distintos del rs20541 (R130Q), como el IL13 rs1800925 (IL13-1055) e IL13 rs2243204, los cuales no se han evaluado en el presente trabajo²⁶⁻²⁸.

Por otra parte, los SNPs pueden tener efectos biológicos diferentes dependiendo del tipo celular sobre el que actúa la citocina o bien del ambiente inflamatorio en el que desarrolla su efecto²⁹. En este sentido, los estudios funcionales realizados en el SNP rs20541 (R130Q) han demostrado consecuencias funcionales en

la actividad de transcripción, aumento de actividad o señalización a través de su proteína, o cambios en los niveles séricos de proteína en distintos tipos celulares^{30,31}. Por lo tanto, en el presente trabajo no solo se investigó la posible asociación genética entre el polimorfismo R130Q y la susceptibilidad genética a padecer enfermedad, sino también su correlación con los niveles circulantes de IL-13. Se ha sugerido que los pacientes homocigotos para la mutación de este gen de la IL-13 presentan niveles aumentados de IL-13 circulante³². Parece ser que la presencia del genotipo AA se asocia con unos niveles disminuidos de IL-13 en suero tanto en los controles sanos como en los pacientes con ACG y EORA. Por el contrario, en PMR esta relación es la opuesta, encontrándose unos niveles de IL-13 circulantes más elevados con respecto a la población heterocigota, lo que se corresponde con lo publicado previamente³². En cualquier caso, estos datos deben tomarse con reserva dada la baja frecuencia de este genotipo y la ausencia de estudios similares.

Los niveles séricos y en líquido sinovial de IL-13 se han visto aumentados en pacientes con distintos tipos de artropatías, incluida la AR^{32,33}. Además, los niveles séricos de IL-13 se han correlacionado con la presencia de autoanticuerpos, como el FR³³. En nuestro estudio, a pesar de que no encontramos diferencias significativas con los controles sanos, los pacientes con EORA presentaban una tendencia a tener mayores niveles circulantes de IL-13, que se mantenía a pesar del tratamiento. Aunque no encontramos una correlación significativa entre los niveles de IL-13 circulante y los de autoanticuerpos característicos de la AR, nuestra serie difiere claramente de las antes mencionadas³³ en cuanto a la población de estudio, solamente EORA, y por lo tanto en cuanto a la frecuencia de estos autoanticuerpos.

La asociación del genotipo GA con una menor tasa de recaídas/recurrencias, y, por lo tanto, con una menor duración y dosis acumulada de corticosteroides en los pacientes con ACG resulta de interés dada la ausencia actual de marcadores pronósticos para esta enfermedad, pero debe ser confirmada en series más amplias de pacientes.

En resumen, el polimorfismo rs20541 (R130Q) del gen de la IL13 se asocia con susceptibilidad a padecer ACG. La utilidad de este gen para predecir el pronóstico en ACG debe ser confirmada en estudios con mayor número de pacientes. Se necesitan más estudios genéticos de citocinas de Th2 que nos permitan aclarar esta cuestión.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por becas de la Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV y Fondo de Investigación Sanitaria (PI050475 y PI080098). Lorena Álvarez-Rodríguez fue financiada por una beca de ayuda a la investigación de la Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV. Iñaki Beares y Marta González (financiados por la Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV) y Carolina Santa Cruz (financiada por una beca de ayuda a la investigación de Schering-Ploug, España).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Estamos especialmente agradecidos a Iñaki Beares y Marta González (financiados por la Fundación Marqués de Valdecilla-IFIMAV) y Carolina Santa Cruz (financiada por una beca de ayuda a la investigación de Schering-Ploug, España) por su ayuda técnica. Nos gustaría agradecer igualmente a los médicos del Servicio de

Reumatología quienes han monitorizado a los pacientes, así como agradecer también a los pacientes y controles su participación en el estudio.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2012.04.006>.

Bibliografía

1. Pawelec G, Solana R. Immunosenescence. *Immunol Today*. 1997;18:514-6.
2. Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis*. 2000;31:578-85.
3. Martínez-Taboada VM, Goronzy JJ, Weyand CM. Conceptos actuales sobre la patogenia de la arteritis de células gigantes. *Rev Esp Reumatol*. 1994;2:293-9.
4. Armona J, Rodríguez Valverde V, González-Gay MA, Figueroa M, Fernández-Suero JL, Blanco R, et al. Arteritis de células gigantes, Estudio de 191 pacientes. *Med Clin (Barc)* 1995;105:734-7.
5. Huston KA, Hunder GG, Lie JT, Kennedy KH, Elveback LR. Temporal arteritis. A 25 year epidemiological, clinical and pathologic study. *Ann Intern Med*. 1978;88:162-7.
6. González-Gay MA, Blanco R, Rodríguez-Valverde V, Martínez-Taboada VM, Delgado-Rodríguez M, Figueroa M, et al. Permanent visual loss and cerebrovascular accidents in giant cell arteritis, Predictors and response to treatment. *Arthritis Rheum*. 1998;41:1497-504.
7. Brack A, Martínez-Taboada VM, Stanson A, Goronzy JJ, Weyand CM. Disease pattern in cranial and large-vessel giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 1999;42:311-7.
8. Chuang TY, Hunder GG, Ilstrup DM, Kurland LT. Polymyalgia rheumatica: a 10-year epidemiologic and clinical study. *Ann Intern Med*. 1982;97:672-80.
9. Fito C, Martínez-Taboada VM, Blanco R, Sánchez-Andrada S, Rodríguez-Valverde V, Figueroa M, et al. Long-term outcome of 162 patients with polymyalgia rheumatica. *Arthritis Rheum*. 1998;41 suppl. 9:S356.
10. Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. Is seronegative RA in the elderly the same as polymyalgia rheumatica. *Bull Rheum Dis*. 1994;43:1-3.
11. Weyand CM, Goronzy JJ. Giant cell arteritis as an antigen driven disease. *Rheum Dis Clin North Am*. 1995;21:1027-39.
12. Martínez-Taboada VM, Álvarez-Rodríguez L, Ruiz Soto M, Marin MJ, López-Hoyos M. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica: role of cytokines in the pathogenesis and implications for treatment. *Cytokine*. 2008;44:207-20.
13. Amoli MM, González-Gay MA, Zeggini E, Salway F, García-Porrúa C, Ollier WER. Epistatic interactions between HLA-DRB1 and interleukin 4, but not interferon-gamma, increase susceptibility to giant cell arteritis. *J Rheumatol*. 2004;31:2413-7.
14. Chomarat P, Banchereau J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol*. 1998;17:1-52.
15. Briere F, Bridon JM, Servet C, Rousset F, Zurawski G, Banchereau J. IL-10 and IL-13 as B cell growth and differentiation factors. *Nouv Rev Fr, Hematol*. 1993;35:233-5.
16. Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, et al. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:3730-4.
17. Vercelli D. Genetics of IL-13 and functional relevance of IL-13 variants. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2002;2:389-93.
18. Graves PE, Kabesch M, Halonen M, Holberg CJ, Baldini M, Fritzsche C, et al. A cluster of seven tightly linked polymorphisms in the IL-13 gene is associated with total serum IgE levels in three populations of white children. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:506-13.
19. Heinzmann A, Mao XQ, Akaiwa M, Kreomer RT, Gao PS, Ohshima K, et al. Genetic variants of IL-13 signalling and human asthma and atopy. *Hum Mol Genet*. 2000;9:549-59.
20. Hunder GG, Bloch DA, Michel BA, Stevens MB, Arend WP, Calabrese LH, et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the Classification of giant cell arteritis. *Arthritis Rheum*. 1990;33:1122-8.
21. Martínez-Taboada V, Brack A, Hunder GG, Goronzy JJ, Weyand CM. The inflammatory infiltrate in giant cell arteritis selects against B lymphocytes. *J Rheumatol*. 1996;23:1011-4.
22. González-Gay MA, Rodríguez-Valverde V, Blanco R, Fernández-Suero JL, Armona J, Figueroa M, et al. Polymyalgia rheumatica without significantly increased ESR: A more benign syndrome. *Arch Intern Med*. 1997;157:317-20.
23. 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.
24. Hellier JP, Eliaou JF, Daures JP, Sany J, Combe B. HLA-DRB1 genes and patients with late onset rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:531-3.
25. Martínez-Taboada V, Blanco R, Rodríguez-Valverde V. Arteritis de células gigantes. *Semin Fund Esp Reumatol*. 2000;1:141-57.
26. Granel B, Chevillard C, Allanore Y, Arnaud V, Cabantous S, Marquet S, et al. Evaluation of interleukin 13 polymorphisms in systemic sclerosis. *Immunogenetics*. 2006;58:693-9.
27. Duffin KC, Freeny IC, Schrodri SJ, Wong B, Feng BJ, Soltani-Arabshahi R, et al. Association between IL13 polymorphisms and psoriatic arthritis is modified by smoking. *J Invest Dermatol*. 2009;129:2777-83.
28. Bowes J, Eyre S, Flynn E, Ho P, Salah S, Warren RB, et al. Evidence to support IL-13 as a risk locus for psoriatic arthritis but not psoriasis vulgaris. *Ann Rheum Dis*. 2011;70:1016-9.
29. Bottema RW, Nolte IM, Howard TD, Koppelman GH, Dubois AE, De Meer G, et al. Interleukin 13 and interleukin 4 receptor- α polymorphisms in rhinitis and asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010;153:259-67.
30. Arima K, Umeshita-Suyama R, Sakata Y, Akaiwa M, Mao XQ, Enomoto T, et al. Upregulation of IL-13 concentration in vivo by the IL13 variant associated with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109:980-7.
31. Vladich FD, Brazille SM, Stern D, Peck ML, Ghittoni R, Vercelli D. IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *J Clin Invest*. 2005;115:747-54.
32. Spadaro A, Rinaldi T, Riccieri V, Valesini G, Taccari E. Interleukin 13 in synovial fluid and serum of patients with psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2002;61:174-6.
33. Spadaro A, Rinaldi T, Riccieri V, Taccari E, Valesini G. Interleukin-13 in autoimmune rheumatic diseases: relationship with the autoantibody profile. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20:213-6.

