

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ENVOLVIMENTO DO PEPTÍDEO LIBERADOR DA GASTRINA, DE SEU  
RECEPTOR E DA VIA PI3K/AKT NA FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE: UM  
ESTUDO IN VITRO EM FIBROBLASTOS SINOVIAIS**

Vanessa Schuck Clarimundo

Porto Alegre  
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ENVOLVIMENTO DO PEPTÍDEO LIBERADOR DA GASTRINA, DE SEU  
RECEPTOR E DA VIA PI3K/AKT NA FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE: UM  
ESTUDO IN VITRO EM FIBROBLASTOS SINOVIAIS**

Vanessa Schuck Clarimundo

Orientador: Ricardo Machado Xavier

Co-orientadora: Patrícia Gnieslaw de Oliveira

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2016

BANCA EXAMINADORA

*Professor Dr. Guido Lenz*

*Professor Dr. Paulo Louzada Junior*

*Professor Dr. Rafael Roesler*

*Professor Dr. Rafael da Silva Chakr*

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.*

José de Alencar

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Ricardo Machado Xavier pela orientação e pelas valiosas contribuições ao trabalho. Sem dúvidas, és um exemplo de profissional e de pessoa que desejo seguir.

À Dr. Patrícia de Oliveira pela oportunidade de inserção ao grupo de pesquisa, por acreditar e confiar constantemente em meu potencial profissional; pela coorientação incessante e pela amizade ao longo desses anos de trabalho.

Aos colegas de laboratório, Mirian Farinon, Renata Pedó e Vivian Teixeira, por participarem ativamente do desenvolvimento experimental e científico desta dissertação.

À minha família, meu porto-seguro, por me ensinar a ser corajosa e determinada e, principalmente, a buscar o autodesenvolvimento pessoal e profissional. O apoio incondicional e o incentivo de vocês foram primordiais para a conclusão desta etapa.

Aos amigos que compreenderam minha ausência durante toda minha caminhada acadêmica e mesmo assim me estimularam a prosseguir nos momentos mais difíceis.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); à Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas (FIPE) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, e principalmente, pelo interesse nesse estudo.

A realização desta dissertação de mestrado não é um resultado de um esforço individual; a concretização da mesma só foi possível com o apoio de todos. A todos muito obrigada.

## RESUMO

Introdução: A artrite reumatoide é caracterizada pela invasão de fibroblastos sinoviais no interior da cartilagem e pela erosão do osso ocasionando uma progressiva destruição da articulação. A invasão de fibroblastos *in vitro* é correlacionada com o dano articular na AR, entretanto pouco é sabido sobre esta regulação. O peptídeo liberador da gastrina (GRP) é um homólogo funcional da bombesina e sua sinalização através de seu receptor está envolvida em diversas funções, incluindo a resposta inflamatória. O GRP e seu receptor (GRPR) têm sido encontrados na membrana sinovial e no fluído de pacientes com AR, mas o envolvimento dos mesmos na AR não está completamente elucidado. Em paralelo, estudos tem mostrado que a sinalização GRP/GRPR está relacionada com a sinalização PI3K/AKT. Esta última, é uma via de sinalização que apresenta um papel chave em diversos processos celulares, como proliferação, migração e invasão celular. O RC-3095 é um antagonista do GRPR. Objetivo: Avaliar o envolvimento do GRP e do GRPR no comportamento invasivo dos FLS de camundongo com artrite, bem como o envolvimento do GRP na sinalização da via PI3K/AKT. Métodos: FLS foram isolados das articulações de camundongos com artrite induzida por colágeno. A expressão de GRPR foi investigada por imunocitoquímica e por western blot. A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio de sulforodamina B após o tratamento dos FLS com GRP e/ou RC-3095 (antagonista do GRP), e/ou Ly294002 (inibidor da via PI3K/AKT) e a capacidade invasora dessas células após o tratamento com GRP, RC-3095 ou Ly249002 foi avaliada utilizando um ensaio de invasão em matrigel. A fosforilação da AKT foi analisada através de western blot. Resultados: A proteína GRPR foi detectada por imunocitoquímica e western blot. A exposição ao GRP aumentou cerca de duas vezes a invasão comparado com células não tratadas ( $p < 0,05$ ), enquanto que o RC-3095 reverteu este efeito ( $p < 0,001$ ). O GRP também aumentou a expressão de AKT fosforilada. Por fim, quando adicionado Ly294002 com GRP, o mesmo preveniu o aumento da invasão induzida por GRP ( $p < 0,001$ ). Conclusão: Esta é a primeira vez que a expressão de GRPR está sendo demonstrado nos FLS. Além disso, este trabalho sugere que o GRP aumenta o comportamento invasor dos FLS. Este efeito ocorre em parte através da ativação da AKT. Entretanto, mais estudos devem ser realizados sobre a via GRP/GRPR, já que a mesma pode ser relevante para o desenvolvimento de terapias cujo alvo são os FLS.

## ABSTRACT

**Introduction:** Rheumatoid Arthritis (RA) is characterized by invasion of fibroblast-like synoviocytes (FLS) into de articular cartilage and by bone erosion leading to progressive joint destruction. FLS *in vitro* invasiveness correlates with articular damage in RA, yet little is known about this regulation. Gastrin-releasing peptide (GRP) is a functional homologue of bombesin, and its receptor signaling is involved in several functions, including the inflammatory response. GRP and its receptor (GRPR) have been found in synovial membrane and fluid of RA patient, but their involvement with RA is not completely elucidated. In parallel, studies have shown that GRP/GRPR is related with PI3K/AKT signaling. This pathway plays a key role in multiple cellular processes such as cell proliferation, migration and invasion. RC-3095 is an antagonist of GRPR. **Objective:** To examine the role of gastrin-releasing peptide (GRP) and its receptor (GRPR) on the invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes (FLS) from arthritic mice, as well as to evaluate GRP-induced signaling on PI3K/AKT pathway. **Methods:** FLS were isolated from the joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA). Expression of GRPR in FLS was investigated by immunocytochemistry and western blot (WB). FLS treated with GRP and/or RC-3095 (GRP antagonist), and/or Ly294002 (inhibitor of PI3K/AKT pathway) were assessed for proliferation by sulforhodamine B assay over a three-day period, and for invasion using a Matrigel-coated transwell system over 24 hours. Akt phosphorylation was assessed by WB. **Results:** GRPR protein was detected in FLS by immunocytochemistry and WB. Exposure to GRP increased FLS invasion by nearly two-fold, compared with untreated cells ( $p < 0.05$ ), while RC-3095 reversed that effect ( $p < 0.001$ ). GRP also increased phosphorylated AKT expression in FLS. When Ly294002 was added with GRP, it prevented the GRP-induced increased cell invasiveness ( $p < 0.001$ ). **Conclusion:** GRPR was expressed on FLS and mediates the GRP-induced increased invasiveness. This effect occurs at least in part through the AKT activation. Further understanding of the GRP/GRPR pathway could be relevant in the development of FLS-targeted therapy for RA.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACPA - anticorpos contra proteínas citrulinadas  
AR – artrite reumatoide  
AKT – proteína cinase B  
BN – bombesina  
BRS-3 – receptor de bombesina subtipo-3  
DMARDS – drogas anti-reumáticas modificadoras da doença  
FLS – fibroblastos do tipo sinoviócitos  
FR – fator reumatoide  
GRP – peptídeo liberador da gastrina  
GRPR – receptor do peptídeo liberador da gastrina  
IL-1 – interleucina 1  
IL-6 – interleucina 6  
MHC – complexo maior de histocompatibilidade  
MMPs – metaloproteinases  
MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos  
NMRB – receptor de neuromedina B  
NSAIDS – drogas anti-inflamatórias não esteroidais  
PI3K – fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinase  
STAT-3 – proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral



## ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO .....	10
2.	REVISÃO DA LITERATURA .....	13
2.2	Estratégia de busca .....	13
2.3	Conceitos, epidemiologia e na Artrite Reumatoide.....	13
2.4	Fisiopatogenia da Artrite Reumatoide.....	15
2.5	Tratamentos para a AR.....	15
2.6	Fibroblasto Sinovial (FLS).....	17
2.7	Peptídeo liberador da gastrina, seu receptor e um de seus antagonistas .....	18
3.	MARCO TEÓRICO.....	21
4.	JUSTIFICATIVA .....	22
5.	OBJETIVOS .....	23
5.1	Objetivos primários .....	23
6.	ARTIGO .....	24
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
8.	PERSPECTIVAS .....	40
9.	REFERÊNCIAS.....	41

## 1. INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune complexa e heterogênea clinicamente, que afeta em torno de 1% da população mundial, acometendo três vezes mais mulheres que homens (1) (2). Esta patologia é caracterizada pela inflamação crônica e destruição progressiva das articulações. Sua incidência aumenta com a idade e o pico ocorre entre os 55 e 64 anos (3). As complicações decorrentes da doença podem levar ao comprometimento da capacidade funcional, do trabalho e da qualidade de vida dos pacientes justificando os esforços na elucidação de sua patogênese, diagnóstico e tratamento (4) (5). O curso da doença é variado, protocolos de tratamento mais recentes indicam que uma terapia agressiva nos primeiros eventos da doença, como a utilização de drogas anti-reumáticas em monoterapia ou em combinações com outras medicações, podem desacelerar a evolução da doença, entretanto, a maioria dos indivíduos afetados são normalmente diagnosticados em fases mais tardias e crônicas da doença, sendo que o estudo das fases iniciais da doença é dificultado (5).

A patologia da sinovite reumatoide caracteriza-se fundamentalmente por proliferação da membrana sinovial e erosão subsequente da cartilagem articular e do osso subcondral. Embora se desconheça o evento desencadeador, parece envolver alguma estimulação antigênica específica de linfócitos T suscetíveis que expressam as moléculas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) apropriadas (6). Isto resulta em proliferação das células T e B, estimulação da proliferação de vasos sanguíneos na membrana sinovial, acúmulo de células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, proliferação de células sinoviais e desenvolvimento de um *pannus* invasivo de rápido crescimento. Este último cresce de modo rápido, invade a cartilagem, ativa os condrócitos e libera enzimas proteolíticas que degradam a cartilagem e o osso, resultando por fim em erosões e destruição articular (7).

A pesquisa em AR tradicionalmente tem focado nas células do sistema imune e citocinas, enquanto que o conhecimento do papel do estroma ainda é limitado. Entretanto, as interações entre as células da sinóvia alteram o fenótipo de fibroblastos do tipo sinoviais (FLS), os quais têm sido cada vez mais considerados como os componentes ativos que conduzem o processo de destruição do tecido na artrite reumatoide. Os FLS aderem e invadem a cartilagem articular e desse modo expressam níveis aumentados de moléculas de adesão, mediadores pró-inflamatórios e de

degradação matricial. Além disso, os FLS na AR estimulam a neovascularização sinovial através da liberação de fatores pró-angiogênicos. Como resultado disso, há o surgimento de um influxo de células do sistema imune nas articulações afetadas, perpetuando o processo inflamatório, e facilitando a disseminação dos FLS na corrente sanguínea, agravando a doença (8).

A bombesina é um peptídeo neurotransmissor endógeno encontrado no sistema nervoso central e periférico de anfíbios. Seu equivalente em mamíferos é o peptídeo liberador da gastrina ou GRP. Este se liga ao seu receptor (GRPR) e provoca a ativação do mesmo. O GRPR é uma proteína de superfície celular acoplada à proteína G (9).

Tanto o GRP quanto o GRPR estão envolvidos com o sistema imune. O GRP atua no desenvolvimento e na regulação imunológica. Linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e células endoteliais expressam receptor para GRP, indicando um papel deste peptídeo na patogênese de condições inflamatórias. Especificamente na AR já foi demonstrado a expressão de GRPR no infiltrado inflamatório e nos condrócitos de pacientes (10) (11).

O RC-3095, [D-Tpi<sup>6</sup>, Leu<sup>13</sup>Ψ-(CH<sub>2</sub>NH)Leu<sup>14</sup>] bombesina<sub>6-14</sub>, é um pseudononapeptídeo sintético com ação antagonista do receptor da BN/GRP, com alta afinidade de ligação. O RC-3095 bloqueia o efeito estimulador autócrino do BN/GRP em tumores e, por este motivo, está sendo desenvolvido para o tratamento de múltiplos tipos de cânceres (12) (13). Recentemente nosso grupo demonstrou resultados promissores apontando o efeito anti-inflamatório do RC-3095 em diferentes modelos de artrite. Nossos resultados sugerem que o RC-3095 regula a severidade da doença experimental, podendo esse efeito também estar envolvido com a modulação dos FLS (14) (15). Entretanto pouco se sabe sobre esse mecanismo.

A sinalização mediada pelo GRPR está relacionada com a via PI3K/AKT (16), um importante mediador de diversos processos celulares como proliferação, motilidade, invasão, apoptose, entre outros. Existem evidências que esta via de sinalização aumenta a proliferação de fibroblastos sinoviais, neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, bem como, ativa a proliferação e a maturação de linfócitos T e B na AR (17).

Dentro deste contexto, este trabalho tem por objetivo estudar a sinalização GRP/GRPR em FLS de camundongos DBA/1J, como também, a influência da mesma sobre a via da AKT. Isto é justificado visto que esta sinalização poderá fornecer informações relevantes sobre o papel deste peptídeo no desenvolvimento da doença e ampliar o conhecimento de uma nova proposta de tratamento para artrite reumatoide.

Sendo assim, esta dissertação é composta por uma revisão da literatura e por um manuscrito do trabalho, sendo um artigo original intitulado “Gastrin-releasing peptide and its receptor increase arthritis fibroblast-like synoviocyte invasiveness through the PI3K/AKT pathway”. Esta pesquisa foi desenvolvida no laboratório de Doenças Autoimunes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. O trabalho gerado será submetido no periódico *Arthritis and Rheumatology* (Fator de impacto 8,9; Qualis CAPES A1).

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.2 Estratégia de busca**

Esta revisão da literatura está focada nos seguintes itens: artrite reumatoide, fibroblasto sinovial, peptídeo liberador da gastrina, sinalização celular e AKT. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, Sciece Direct e o repositório digital LUME/UFRGS no período de 1972 a 2016. Foram realizadas buscas utilizando os seguintes termos e suas combinações: “rheumatoid arthritis”, “arthritis”, “fibroblast-like synoviocytes”, “synovial fibroblast”, “gastrin-releasing peptide”, “gastrin-releasing peptide receptor”, “RC-3095”, “akt pathway”. Para realização desta revisão foram selecionados 74 artigos a partir da pesquisa científica.

### **2.3 Conceitos, epidemiologia e na Artrite Reumatoide**

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, sistêmica, autoimune e progressiva. Sabe-se que esta patologia é caracterizada por uma sinovite crônica que pode acarretar na destruição da cartilagem e erosão óssea, podendo ocasionar a incapacidade física. (18) Trata-se de uma condição que atinge em torno de 1% da população mundial e 0,45% da população brasileira, representando 1 milhão de pessoas acometidas pela doença (19)(20). Sua incidência é 3 vezes maior no sexo feminino em relação ao masculino e sua prevalência aumenta com a idade, sendo o pico de início da doença entre 55 anos e 64 anos de idade (21).

A AR é uma doença com grande impacto na saúde pública, devido ao alto custo de tratamento e alta morbimortalidade. Estima-se um custo anual de tratamento de \$19,3 bilhões nos Estados Unidos e no Brasil R\$ 18,5 milhões (22) (23). Além disso, devido a perda da capacidade funcional uma média de 20-40% dos pacientes tornam-se incapazes ao trabalho após 2 anos de diagnóstico, aumentando de 40-80% após 5-20 anos (24). Por outro lado, indivíduos com diagnóstico de AR têm uma maior chance de desenvolver morbidades como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e diabetes mellitus. Além disso, estima-se que os mesmos apresentam uma redução de dez anos em sua expectativa de vida (25).

Embora tenha etiologia ainda desconhecida, sabe-se que a AR é uma doença de patogênese complexa e multifatorial. A mesma é resultante de defeitos na imunorregulação, fatores genéticos e ambientais que contribuem para a quebra da autotolerância desencadeando o aparecimento da doença (26).

Existem estudos que evidenciam uma associação entre fatores genéticos e o fenótipo à progressão e o desfecho da doença. Estima-se que 60% do risco de desenvolver AR esteja associado com a herdabilidade genética (27). Diversos loci já foram relacionados com o desenvolvimento da AR, sendo os alelos HLA-DRB1 a principal associação. Estes apresentam um motivo comum denominado epítipo compartilhado. Acredita-se que este epítipo está envolvido com a apresentação de autopeptídeos artritogênicos e/ou com a modulação do repertório de linfócitos T (28).

Até o momento, o real papel causal dos fatores ambientais no desenvolvimento da AR não é concluinte em muitos casos. O fator ambiental de risco mais bem estabelecido é o fumo (29). Já foi demonstrado que o fumo acelera as reações de citrulinização em proteínas pulmonares em pacientes portadores do gene HLA-DRB1, o que dispara as reações de produção de autoanticorpos. Além disso o tabagismo também está envolvido com a severidade da doença, manifestação extra-articular e presença do fator reumatoide FR (30). Dentre outros fatores ambientais incluem o consumo de café, infecções causadas por Epstein Baar vírus e citomegalovírus, os níveis de vitamina D, o uso de contraceptivos orais e o consumo de álcool (31).

Além da predisposição genética e da exposição aos fatores ambientais, a presença de autoanticorpos é fundamental na patogênese da AR. A soropositividade para algum autoanticorpo característico da doença é encontrada em 70% dos pacientes, a maioria é soropositiva para o fator reumatoide (FR) e/ou os anticorpos contra proteínas citrulinadas (ACPA). O FR é um autoanticorpo clássico utilizado como marcador patogênico da doença, entretanto não é específico da AR podendo também ser detectado no lúpus eritematoso sistêmico, na síndrome de Sjögren, em infecções crônicas, etc. Por outro lado, o anti-CCP é mais específico e sensível para o diagnóstico da AR, sua soropositividade geralmente indica uma doença mais severa comparada com pacientes soronegativos. Além disso, o mesmo está associado com uma maior progressão radiográfica e um maior risco de eventos cardiovasculares e complicações pulmonárias (32) (33).

## 2.4 Fisiopatogenia da Artrite Reumatoide

Como mencionado anteriormente, a AR é uma doença de etiologia desconhecida. Embora se desconheça o evento desencadeador, sabe-se que a patologia da AR é caracterizada por proliferação da membrana e erosão subsequente da cartilagem articular e do osso subcondral (34).

O evento inicial é uma estimulação antigênica de linfócitos T suscetíveis que expressam as moléculas de imunohistocompatibilidade (MHC) apropriadas. Conseqüentemente, isto ativa a proliferação de linfócitos T e B; o influxo de células da reposta inata e adaptativa (monócitos, células dendríticas, mastócitos, plasmócitos, etc); e a hipervascularização da membrana sinovial. Além disso, os sinoviócitos (macrófago e fibroblastos sinoviais) apresentam alta taxa de proliferação e se tornam hipertróficos, gerando hiperplasia da membrana sinovial (35).

O infiltrado linfocítico, a neoangiogênese e a hiperplasia da membrana sinovial levam a formação de um tecido conhecido com “*pannus*” e este se caracteriza por ser um tecido inflamatório altamente proliferativo e invasivo. O mesmo cresce semelhante a um tumor benigno, ativa os condrócitos, invade a cartilagem e libera enzimas proteolíticas que degradam a cartilagem e o osso, resultando na progressiva destruição articular (35).

Por outro lado, diversas citocinas e quimiocinas contribuem com o ambiente inflamatório no compartimento sinovial, sendo as principais a interleucina 1-beta (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). (19) A produção exacerbada dessas citocinas está relacionada com as manifestações extra-articulares presentes nesta patogenia (36).

## 2.5 Tratamentos para a AR

Atualmente os medicamentos disponíveis buscam a remissão da AR e conseqüentemente a melhora da condição de vida dos pacientes, visto que ainda não foi descoberta cura para a mesma. Sabe-se que de 10 a 50% dos pacientes atingem a remissão. Além disso, o tratamento da AR apresenta como objetivos secundário a redução da dor, manutenção da função do membro e preservação das atividades criativas e de trabalho (22).

Existem três principais categorias terapêuticas utilizadas no tratamento da AR: drogas anti-inflamatórias não esteroidais (NSAIDS), glicocorticoides, drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDS) e agentes biológicos. A terapêutica do paciente irá variar de acordo com o estágio da doença, sua atividade e agressividade (37).

Antigamente, a primeira linha de escolha eram os NSAIDS. Entretanto esta classe de medicamentos foi substituída pelos DMARDS devido à baixa efetividade, alta toxicidade e inabilidade de modificar a doença em longo prazo. Dessa forma, recomenda-se a associação de inibidores da bomba de prótons, afim de garantir uma proteção do trato gastrointestinal (38) (39).

Assim como os NSAIDS, os glicocorticoides também são utilizados para suprimir a inflamação da AR, reduzindo sintomas como a dor e o inchaço articular. Os mesmos são utilizados em baixas doses, até no máximo 15mg de prednisona ao dia. Além disso, os glicocorticoides prejudicam o metabolismo ósseo, assim pacientes com uso prolongado de glicocorticoides devem receber suplementação com vitamina D e cálcio (40).

Atualmente, os NSAIDS e os glicocorticoides não são utilizados como monoterapia. Ambos são recomendados apenas nas primeiras semanas após o diagnóstico enquanto se espera a ação dos DMARDS, visto que os mesmos diminuem a inflamação. O uso intermitente desses medicamentos é recomendado em pacientes com AR de difícil controle (41).

O medicamento padrão ouro para o tratamento da doença é o metotrexato, um medicamento da classe dos DMARD. Outros exemplos são a leflunamida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, entre outros. Embora os medicamentos pertencentes a esta classe não tenham um mecanismo de ação completamente estabelecido, sabe-se que os mesmos reduzem significativamente o inchaço articular, a dor, os marcadores de fase aguda, a progressão do dano articular e melhoram a função (42). Apesar de o metotrexato ser a primeira escolha de tratamento, o mesmo apresenta efeitos adversos significativos como hepatotoxicidade, náuseas e doenças pulmonares intersticiais (43).

Os avanço nos estudos sobre a fisiopatogenia da AR permitiram a produção de agentes biológicos específicos contra elementos considerados com papel central na instalação e progressão da doença. Dentre essa classe de fármacos, os inibidores de TNF foram os primeiros a serem desenvolvidos. Atualmente, três estão disponíveis para uso comercial: infliximab, adalimumab (anticorpos monoclonais anti-TNF) e o etanercept



(proteína de fusão do receptor II de TNF) (44) (45) (18). Além destes, o Rituximabe e o Abatacept, agentes biológicos que não apresentam o TNF como alvo terapêutico, também foram aprovados para o tratamento da AR (46)(47). Apesar destes fármacos serem altamente eficazes no tratamento da AR, os mesmos também apresentam efeitos adversos, como o risco aumentado de desenvolvimento de tuberculose e de infecções virais, bacterianas e fúngicas (18) (44).

## 2.6 Fibroblasto Sinovial (FLS)

Os FLS ou sinoviócitos do tipo B são células mesenquimais que compõem a camada íntima da membrana sinovial. Em indivíduos saudáveis, essas células são responsáveis pela síntese de ácido hialurônico, um importante constituinte do fluido sinovial, e secretam lubricina, um proteoglicano responsável pela lubrificação da articulação (48). Além disso, os FLS também possuem funções de células da imunidade inata, uma vez que podem atrair neutrófilos e responder à estimulação via receptor do tipo toll com a produção de citocinas em pró-inflamatória (49).

Na AR essas células apresentam um papel chave na formação do *pannus* invasivo e são importantes tanto na iniciação quanto na perpetuação da inflamação das articulações. A transformação dos FLS saudáveis em células com um comportamento agressivo está associada com diversos processos, como a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por linfócitos B encontrados na sinóvia (49), a fosforilação da proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição (STAT-3) e o aumento da expressão do prooncogene *c-myc* (50).

Em função da mudança de fenótipo, os FLS se tornam a população majoritária do *pannus*. Estudos sugerem que esta expansão celular exacerbada ocorre devido a inibição de vias de apoptose (3). Além disso, estas células produzem diversos mediadores que promovem o crescimento celular, a angiogênese, o recrutamento e a ativação de diversas células do sistema imune (48).

Além de contribuir com o ambiente inflamatório os FLS produzem em grande quantidade proteases, como as metaloproteinases (MMPs), responsáveis por degradar os componentes da matriz extracelular. As MMPs constituem uma família de 19 proteases, sendo que os FLS expressam MMPs 1, 3, 9 e 10 (50).

A expressão de MMPs está correlacionada com a capacidade invasora dos FLS *in vitro* (50). Por outro lado, esta última está correlacionada com o dano histológico e

radiográfico em pacientes com AR. Dessa forma, acredita-se que uma combinação de terapias que modulem tanto a resposta imune quanto o fenótipo agressivo dos FLS serão mais efetivas no controle da progressão da doença (48).

## **2.7 Peptídeo liberador da gastrina, seu receptor e um de seus antagonistas**

Neuropeptídeos são moléculas sinalizadoras que regulam a transmissão sináptica e a plasticidade dos neurônios, entretanto, também podem atuar fora do sistema nervoso como mensageiros químicos. Recentes estudos evidenciam o envolvimento de alguns neuropeptídios em doenças imunológicas, inclusive na artrite reumatoide (51).

A bombesina (BN) é um peptídeo neurotransmissor endógeno que foi isolado da pele de uma rã, da espécie *Bombina Bombina*. Posteriormente, outros dois peptídeos da mesma família foram isolados em mamíferos: o peptídeo liberador da gastrina (GRP) e a neuromedina B (52).

O peptídeo liberador da gastrina é um neuropeptídeo que induz a secreção de gastrina no trato gástrico. Esse peptídeo é composto por 27 aminoácidos e compartilha com a bombesina nove a dez aminoácidos carboxiterminais. Estes aminoácidos compartilhados são essenciais para a imunogenicidade e para ligação com seu receptor (53).

O GRP promove seu efeito através da ativação de seu receptor, o GRPR, um receptor transmembrana pertencente à família dos receptores acoplados à proteína G. Existem quatro subtipos de receptores descritos para a família do GRP, entretanto apenas três são encontrados em mamíferos: o GRPR, o receptor de neuromedina B (NMRB) e o receptor de bombesina subtipo-3 (BRS-3). Dentre estes, o GRP e a BN se ligam com alta afinidade ao GRPR e a neuromedina B se liga seletivamente ao NMRB. Até então, não se identificou nenhum ligante para o BRS-3 (54).

Enquanto que o GRP é o agonista do GRPR, o RC-3095 [D-Tpi5,Leu13ψ-(CH2NH)Leu14}] é um de seus antagonistas. O RC-3095 é um pseunapeptídeo sintético que foi desenvolvido por Shally *et al* através do método de fase sólida (55).

Tanto o GRP quanto o GRPR estão envolvidos em um amplo espectro de atividades biológicas. Já foi descrito que ambos participam da modulação da secreção gástrica e pancreática, como também, da motilidade gastrointestinal (55). Por outro lado, no sistema nervoso central, estão relacionados com a ansiedade, o medo, o estresse e a modulação do ciclo circadiano (13). Por fim, existem evidências de que ambos

atuam sobre o sistema imune, visto que diversas células imunes expressam o receptor de GRP (56). Com relação especificamente à AR, já foi demonstrado a expressão de GRP e GRPR no infiltrado inflamatório de pacientes, bem como condrócitos humanos e murinos (57) (58).

Por outro lado o RC-3095 foi testado em modelos animais de doenças inflamatórias como a sepse intestinal e o dano pulmonar agudo, demonstrando diminuição na produção de citocinas próinflamatórias, como TNF e IL-1 $\beta$ , sem alterar a citocina anti-inflamatória IL-10 e apresentando melhora na sobrevivência dos animais testados, em torno de 70% (59) (60). Em um modelo animal de uveíte, o RC-3095 mostrou importante ação contra danos oxidativos das írides, assim como ação anti-inflamatória através da diminuição da atividade da mieloperoxidase, diminuição do TNF e dos níveis das proteínas quimioatrativa dos monócitos -1 (MCP-1), mesmo quando comparado a droga padrão, dexametasona (61). Em um modelo animal de úlcera gástrica o RC-3095, sozinho e em associação com o omeprazol, foi efetivo na inibição da secreção gástrica, além de apresentar efeito protetor exercido pela redução do dano oxidativo (62). Finalmente, em um modelo animal de colite ulcerativa, o RC-3095, reduziu a gravidade da doença inflamatória intestinal e sua atividade anti-inflamatória foi associada a redução da expressão do TNF-alfa colônico (63).

Nosso grupo recentemente demonstrou o efeito anti-inflamatório do RC-3095 em dois modelos murinos de artrite, que apresentou uma melhora significativa nos parâmetros da doença, ao comparar os animais do grupo tratado com o grupo controle. Também verificou-se uma diminuição na secreção de diversas citocinas pró-inflamatórias. Por fim, comprovou-se a presença de GRPR na membrana sinovial dos camundongos com artrite induzida por colágeno bovino do tipo II (14) (15).

## **2.8 Proteína Cinase B (PKB/AKT)**

A proteína cinase B ou AKT (PKB/AKT) é uma proteína cinase de resíduos serina/treonina que consiste em três isoformas com alta homologia: AKT1 (PKB $\alpha$ ), AKT2 (PKB $\beta$ ) e AKT3 (PKB $\gamma$ ). Suas isoformas compartilham 3 domínios funcionais: um domínio central cinase, um domínio regulatório C-terminal e um domínio PH. Este último é imprescindível para a ligação da proteína em lipídios como o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), um fosfolípídeo de membrana (64).

As isoformas da AKT são ativadas através mecanismo em diversas etapa. Diversos estímulos como hormônios, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular são capazes de ativar a AKT. A cascata de sinalização se inicia através da ativação do receptor de tiorosina quinase na membrana celular, conseqüentemente o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-cinase (PI3K) fosforila o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato gerando um segundo um segundo mensageiro o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Este último se liga no domínio PH e provoca um recrutamento da AKT para a membrana citoplasmática, como também, uma alteração conformacional que apresenta o sítio catalítico para subseqüente fosforilação dependente de PDK-1. A fosforilação da AKT (pAKT) pode ocorrer em dois sítios catalíticos: Treonina 308 e Serina 473. Quando esses dois aminoácidos são mutados para resíduos não fosforiláveis, a ativação da cinase é eliminada. Uma vez ativada, a cascata de sinalização da AKT atua sobre diversas vias de sinalização celular como ativação da proliferação, migração e invasão, bem como inibição da morte celular por apoptose (65).

Estudos prévios relatam que a ativação via PI3K/AKT está associada com o aumento da quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos, bem como com o aumento da degranulação de mastócitos. Além disso, está envolvida com a ativação, maturação e sobrevivência de linfócitos T e B na AR (66).

Em fibroblastos está relacionada com a motilidade celular e inibição da apoptose (morte celular programada). Além disso, já foi demonstrado que a ativação dessa via em fibroblastos sinoviais causa um aumento na proliferação e produção de interleucina 17. Por fim, também foi demonstrado nessas células que a ativação da via do GRP/GRPR está envolvida com a ativação da via de sinalização PI3K/AKT (67).

### **3. MARCO TEÓRICO**

A revisão teórica descrita nesta dissertação evidencia que a artrite reumatoide é uma doença que reflete socioculturalmente, ou seja, acarreta na diminuição da qualidade de vida, na deterioração funcional e conseqüentemente na antecipação de afastamento do trabalhador. Além desses problemas, a AR é uma doença inflamatória crônica sistêmica que envolve diversos mecanismos resultando na dificuldade de tratamento. Mesmo com o grande avanço dos tratamentos, ainda não existe cura para a doença e nem todos os pacientes atingem a remissão completa. Desta forma, se faz necessário estudar novos alvos terapêuticos a fim de estabelecer novos tratamentos que poderão trazer um maior benefício para o manejo da doença e, principalmente, para a melhora da qualidade de vida do paciente.

#### **4. JUSTIFICATIVA**

A necessidade de novos alvos terapêuticos e de novas estratégias terapêuticas para a AR, tendo em vista a remissão ou até mesmo a prevenção da evolução da doença, é de extrema importância devido ao impacto da doença na vida do paciente. Neste contexto, tem-se intensificado a pesquisa sobre os componentes envolvidos na sua fisiopatologia, em especial os neuropeptídeos. Em paralelo, nosso grupo de pesquisa é pioneiro no estudo do envolvimento do GRP e do GRPR na patofisiologia da artrite reumatoide, bem como, o efeito farmacológico do RC-3095 nesta patologia. Portanto, se torna crucial o aprofundamento destes estudos *in vivo* para que novos alvos terapêuticos sejam constatados.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivos primários**

Avaliar o papel do GRP e do GRPR sobre a capacidade proliferativa e invasora de fibroblastos sinoviais, bem como, elucidar o envolvimento do GRP sobre a via de sinalização celular AKT.

### **5.2 Objetivos secundários**

1. Demonstrar a expressão de GRPR em fibroblastos sinoviais;
2. Avaliar a influência dos tratamentos RC-3095 e GRP sobre a proliferação celular.
3. Avaliar a influência dos tratamentos RC-3095, GRP e GRP+RC-3095 sobre a invasão celular.
4. Avaliar a influência do GRP sobre a via de sinalização AKT.

## 6. ARTIGO

O manuscrito gerado a partir da pesquisa original deste trabalho é intitulado “Gastrin-releasing peptide and its receptor increase arthritis fibroblast-like synoviocyte invasiveness through the PI3K/AKT pathway” O mesmo será submetido no periódico *Arthritis and Rheumatology* (Fator de impacto 8,9; Qualis CAPES ). Sob autoria de Vanessa Schuck Clarimundo, Mirian Farinon, Renata Tenus Pedó, Vivian Teixeira, Carolina Nör, Pércio Gulko, Ricardo Machado Xavier, Patricia Gnieslaw de Oliveira.

Esta pesquisa foi desenvolvida durante os dois anos de mestrado no laboratório de Doenças Autoimunes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para a realização do mesmo foi necessário o apoio financeiro do Fundo de Incentivo de Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



**Gastrin-releasing peptide and its receptor increase arthritis fibroblast-like synoviocyte invasiveness through the PI3K/AKT pathway**

Vanessa Schuck Clarimundo<sup>1,2</sup>, Mirian Farinon<sup>1,2</sup>, Renata Tenus Pedó<sup>1,2</sup>, Vivian Oliveira Nunes Teixeira<sup>1,2</sup>, Carolina Nör<sup>3</sup>, Percio S. Gulko<sup>4</sup>, Ricardo Machado Xavier<sup>1,2</sup>, Patrícia Gnieslaw de Oliveira<sup>1,2</sup>.

**Corresponding Author:**

Ricardo Machado Xavier, Ph.D., Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcellos, 2350, sala 645  
Zip code 90035-003 - Porto Alegre, Brazil.  
Telephone: +55-51-33598837 / E-mail: rxavier10@gmail.com

1 – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

2 – Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

3 – Peter Gilgan Centre for Research and Learning, Toronto, Canadá

4 – Division of Rheumatology, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, USA.

## ABSTRACT

### **Objective:**

To examine the role of gastrin-releasing peptide (GRP) and its receptor (GRPR) on the invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes (FLS) from arthritic mice, as well as to evaluate GRP-induced signaling on PI3K/AKT pathway.

### **Methods:**

FLS were isolated from the joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA). Expression of GRPR in FLS was investigated by immunocytochemistry and western blot (WB). FLS treated with GRP and/or RC-3095 (GRP antagonist), and/or Ly294002 (inhibitor of PI3K/AKT pathway) were assessed for proliferation by sulforhodamine B assay over a three-day period, and for invasion using a Matrigel-coated transwell system over 24 hours. Akt phosphorylation was assessed by WB.

### **Results:**

GRPR protein was detected in FLS by immunocytochemistry and WB. Exposure to GRP increased FLS invasion by nearly two-fold, compared with untreated cells ( $p < 0.05$ ), while RC-3095 reversed that effect ( $p < 0.001$ ). GRP also increased phosphorylated AKT expression in FLS. When Ly294002 was added with GRP, it prevented the GRP-induced increased cell invasiveness ( $p < 0.001$ ).

### **Conclusion:**

GRPR was expressed on FLS and mediates the GRP-induced increased invasiveness. This effect occurs at least in part through the AKT activation. Further understanding of the GRP/GRPR pathway could be relevant in the development of FLS-targeted therapy for RA.

**Key Words:** Gastrin-releasing peptide receptor, RC-3095, Fibroblasts-like synoviocyte, rheumatoid arthritis, PI3K/AKT pathway.

## INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a common chronic autoimmune disease in which joint damage is associated with a chronic synovitis characterized by hyperplastic synovial tissue. The fibroblast-like synoviocytes (FLS) has a central role in disease pathogenesis and joint damage (1, 2).

FLS in the arthritic joint environment is altered to a tumor-like behavior, such as insensibility to undergo apoptosis, increased proliferation, enhanced migratory and invasive capabilities. FLS have been shown to play a pivotal role in initiating and perpetuating joint inflammation and in contributing with cartilage and bone destruction (2).

FLS invasive properties *in vitro* have been correlated to radiographic erosive changes and histological joint damage in RA patients (3). Erosive changes and joint damage correlate with poor outcomes, including increased disability and joint deformities. Hence, inhibition of FLS invasiveness could lead to improved RA outcomes (3).

Several neuropeptides have been investigated concerning their potential involvement in RA, including substance P, vasoactive intestinal peptide, neuropeptide Y (4). Another neuropeptide studied is the gastrin-releasing peptide (GRP), which present different biological activities as neuroendocrine regulation, gastrointestinal secretion, cell proliferation (5). In addition, GRP plays an important role in development and regulation of the immune response by acting in immune cells that express GRPR as lymphocytes, neutrophils, macrophages and endothelial cells (6). GRP effects are mediated by gastrin-releasing peptide receptor (GRPR), a member of the G protein coupled receptors (5). There are evidences that GRPR is found in chondrocytes and synovial membrane of murine experimental arthritis (7, 8) and GRP in joint fluid of RA patients (4).

RC-3095 is a selective GRPR antagonist with reported anti-inflammatory properties in murine models of gastritis, uveitis and sepsis (5). Our group has demonstrated anti-inflammatory and reduced joint damage with RC-3095 in different arthritis experimental models, indicating a possible role of the GRP/GRPR pathway on FLS (7), (9). However, very little is known about the mechanisms involved in this process.

GRPR signaling is related with activation of PI3K/AKT, a pathway considered as an important mediator of cell survival and proliferation (10). Previous works have shown that AKT stimulates cell invasiveness, by increasing cell motility and

metalloproteinases production (11). Moreover, it has been demonstrated in human FLS a relation between AKT activation and cell resistance to undergo apoptosis (12). Based on these observations, the aim of this study was to investigate a possible role of the GRP/GRPR pathway in FLS from CIA arthritis, as well as the involvement of the PI3K/AKT in GRPR signaling in these cells.

## **MATERIALS AND METHOD**

### **FLS isolation from mice with collagen-induced arthritis (CIA) and culture.**

DBA1/J mice were induced to CIA as previously described (7). When animals reached the highest scores, the joints were collected and incubated with collagenase I (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich) for 1 hour at 37°C. The supernatant was collected and centrifuged at 1100rpm for 10 minutes and the pellet was re-suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM-HG), supplemented with 15% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin and 0.125% gentamicin (Gibco). Afterwards, FLS cells were transferred to a plate for culture at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The initial culture was monitored daily until 70-90% of confluence and then cells were detached with trypsin-EDTA (Gibco) and transferred to a culture flask. FLS were used for experiments after five passages.

### **Immunocytochemistry microscopy**

FLS were cultured in 6-well plates to 10 to 20% of confluence, washed with saline buffer phosphate (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15min at room temperature. For permeabilization and antigen access, cells were incubated with citrate buffer for 1h at 62.5°C, washed with PBS and incubated with hydrogen peroxide 5% in methanol (Merk). Nonspecific antibody reaction was blocked with 5% skim milk in PBS. Subsequently, the samples were incubated with anti-GRPR (1:100, Abcam) overnight at 4°C in gentle agitation. After washing with PBS, cells were incubated for 1h with the secondary antibody anti-rabbit HRP-conjugated (1:100, EMD Millipore) at room temperature. The detection was achieved using the DAB-MAP Detection Kit (DAKO). Bright field images were captured with a camera linked to microscope to ascertain protein expression.

### **Protein extraction**

To verify the GRPR expression, FLS were plated ( $1 \times 10^5$  cells/culture flask) and were maintained in culture for 48 hours. Then, these cells were washed twice with PBS, scratched and transferred into centrifuge tubes followed by spin centrifugation at 4°C. The supernatant was removed. Cells were mixed with RIPA buffer and the lysate were kept on ice for 10 minutes followed by a centrifugation at 13000 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatants were collected and the protein concentration was determined using the Bradford assay.

### **Immunoblot**

Protein extracts (45 µg) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 10% and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, in which the remaining binding sites were blocked with 5% skim milk in Tris buffer saline 0.1% Tween-20 (TBST) pH 7.4. Then the membranes were incubated overnight with the specific antibody GRPR (1:500, Abcam), anti-pAKT (1:1000, Sigma-Aldrich) or anti-GAPDH (1:5000, Sigma-Aldrich) as a constitutive protein for normalization. Band detection was accomplished with anti-IgG rabbit antibodies coupled with horseradish peroxidase (1:80000, Sigma-Aldrich) and visualized by enhanced electrochemiluminescence Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). Quantification on immunoblot images was performed with the integrated density function of ImageJ (Bethesda). To evaluate pAKT protein expression, cells were plated in the same concentration and after 24 hours cells were maintained in serum-free medium overnight. FLS were then treated with GRP (10 µM) for 5-30 minutes and then protein was extracted to perform WB.

### **Proliferation assay**

FLS proliferation was determined by sulforhodamine B (SRB) assay. Semi-confluent (70-90%) cultures of FLS were harvested with trypsin-EDTA digestion and re-suspended in DMEM-HG. Cells were added to 96-well plates at a density of  $5 \times 10^3$ /well. FLS were allowed to adhere over 24 hours, after they were treated with different concentrations of GRP (0.1 µM – 10 µM) (Sigma-Aldrich) or RC-3095 (10 µM – 0.05 µM) (Sigma-Aldrich) for 24, 48 and 72 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Cell monolayers were fixed with 0.1% paraformaldehyde for 15 minutes. When completely dried, 50 µL of SRB was added for 30 minutes, washed two times with 1% acetic acid.

The bound dye wash dissolved in 10 mM tris base solution and the absorbance of each well measured at 565 nm in a plate spectrophotometer (Spectra Max).

### **Invasion assay**

FLS invasion assay was performed as previously reported (3) with minor modifications. Cells were placed in duplicate at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells in 500  $\mu$ l in the upper compartment of the Matrigel-coated transwell system (BD Bioscience). GRP (10  $\mu$ M), RC-3095 (1  $\mu$ M) or Ly294002 (10  $\mu$ M) (PI3K inhibitor) were added to the upper compartment. The treatments were added alone or together, in this case, first RC-3095 or Ly294002 were added and after 30 minutes or 1 hour, respectively, GRP treatment was added. DMEM-HG supplemented with 15% SFB was added to the lower compartment as a chemoattractant. Plates were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. Non-invading cells and the Matrigel layer were removed from the upper surface of inserts with swabs and the invading cells on the lower surface were stained with Crystal Violet. The total area of inserts was photographed using a camera coupled in an inverted microscope (Olympus) and the total number of invading cells was counted with the program Image Pro Express (Media Cybernetics).

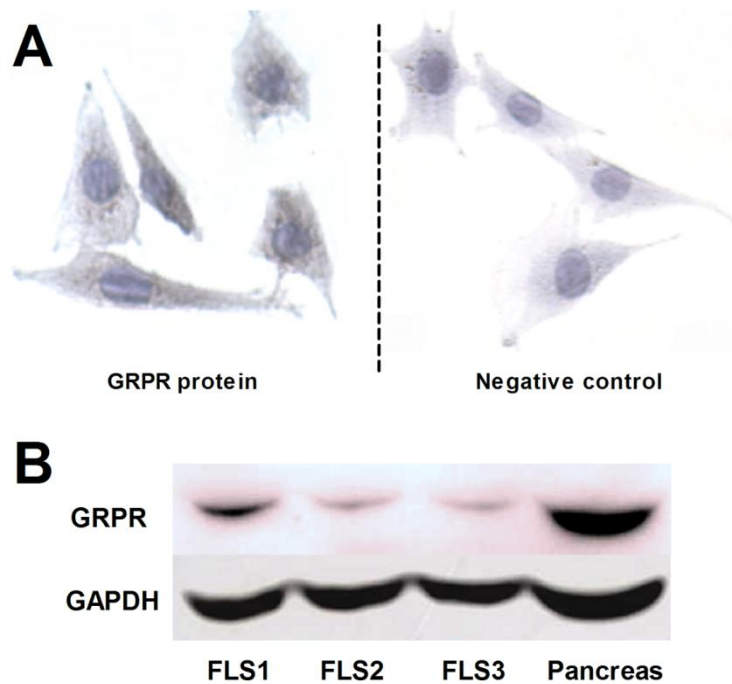
### **STATISTICAL ANALYSIS**

Data are presented as mean or mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed by using Generalized Estimating Equation (GEE), accounting for repeated measurements on the same cell culture, followed by Bonferroni in SPSS version 18.0. Statistical difference was considered when  $p < 0.05$  (13).

### **RESULTS**

#### **GRPR is expressed by FLS**

GRPR protein was detected in FLS with characteristic punctate membrane pattern by immunocytochemistry (Figure 1A). That observation was further confirmed by WB (Figure 1B).

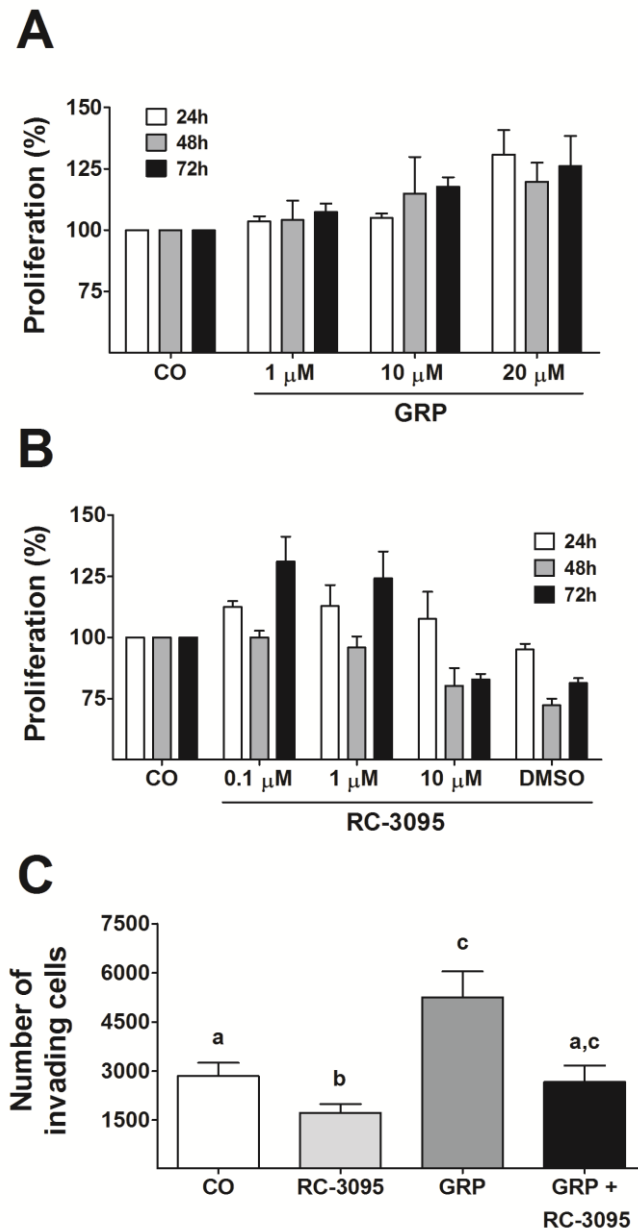


**Figure 1: Expression of GRPR in FLS.** A) Immunocytochemistry showed a strong and positive stain for GRPR in FLS (magnification, x40). B) Western blot analysis of GRPR expression in cell lysate from FLS isolated from three different mice and from pancreatic tissue as a positive control. GRPR = gastrin-releasing peptide receptor. FLS = fibroblast-like synoviocyte from DBA/1J mice with collagen-induced arthritis.

### **The involvement of GRP and RC-3095 in the FLS invasive behavior**

GRP and RC-3095 treatments did not affect FLS proliferation, although higher concentrations of RC-3095 were associated with a trend for higher cytotoxicity. (Figure 2A and 2B).

GRP (10  $\mu$ M) significantly increased FLS invasion by nearly two-fold compared with untreated cells ( $p < 0.02$ ), whereas RC-3095 had the opposite effect ( $p < 0.005$ ) and also prevented the GRP-induced increase in FLS invasiveness ( $p < 0.0001$ ; figure 2C).



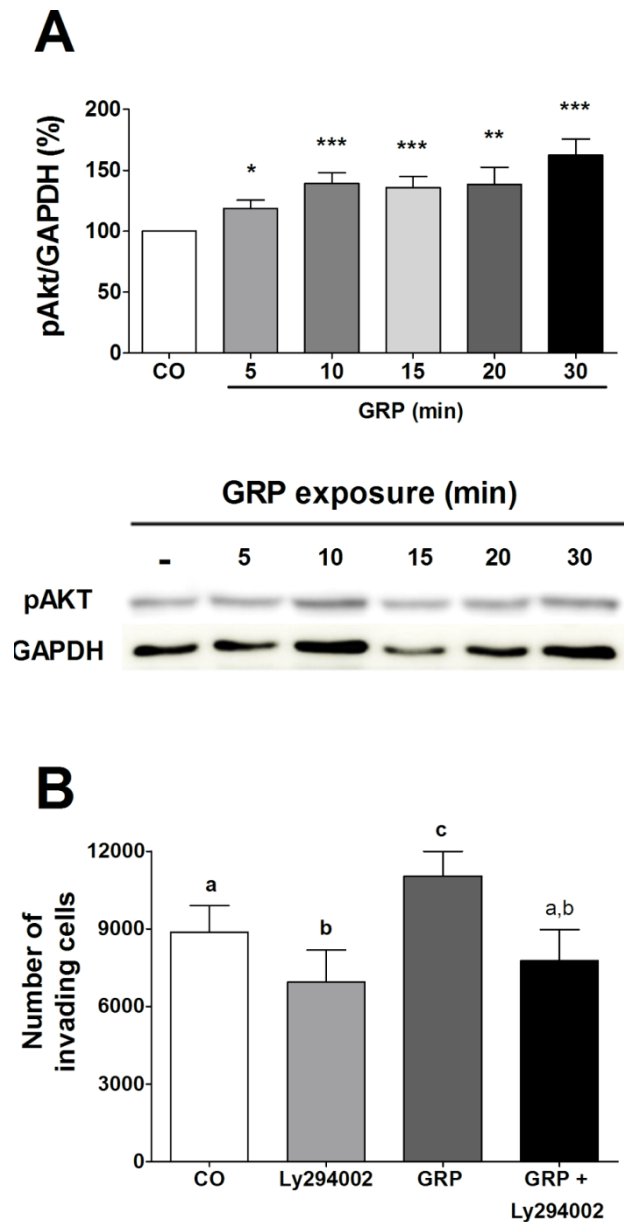
**Figure 2: The involvement of GRP and RC-3095 in FLS behavior.** A) FLS proliferation was determined by SRB assay after treatment with different concentrations of GRP (1 – 20  $\mu$ M) (n = 3) and B) RC-3095 (0.1 - 10  $\mu$ M) (n = 4) for 24, 48 and 72 hours. FLS invasion was determined by transwell Matrigel coated (n = 6). GRP significantly increased FLS invasion by nearly two-fold ( $5356 \pm 1027$ ) compared with FLS ( $288 \pm 532$ ), whereas RC-3095 completely prevented. Bars represent mean SEM; a)  $p < 0.02$  versus GRP;  $p < 0.05$  versus RC-3095; b)  $p < 0.001$  versus RC-3095;  $p < 0.001$  versus GRP+RC-3095. Data were analyzed by generalized estimating equation (GEE),



followed by Bonferroni statistical test. GRP = gastrin-releasing peptide; FLS = fibroblast like synovocytes.

### **GRP alters PI3K/AKT pathway**

AKT has been implicated in regulates mobility and invasiveness in various types of cells (12). Therefore, we investigated the role of AKT as a cell signalling mediators of the GRP-GRPR effect on FLS invasion. GRP increased AKT phosphorylation by 30%, with an effect detectable as early as 10 minutes (figure 3A and B). While Ly40092 prevented the GRP-induced increase in FLS invasion this that effect ( $p < 0.001$ ); figure 3C. Finally, GRP+Ly40092 promotes a reduction of invasiveness compared with GRP ( $p < 0,001$ ).



**Figure 3: Effect of GRP in PI3K/AKT pathway.** A) FLS invasion assay (n = 4). GRP significantly increased FLS invasion compared with untreated cells, whereas Ly294002 present opposite effect. Bars represent mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed by generalized estimating equation followed by Bonferroni. a)  $p < 0,008$  versus Ly294002;  $p < 0.026$  versus GRP; b)  $p < 0.001$  versus GRP; c)  $p < 0,001$  versus GRP+Ly294002. Data were analyzed by generalized estimating equation followed by Bonferroni statistical test. GRP = gastrin-releasing peptide; FLS = fibroblast like synovocytes. B) Immunoblot of pAKT after treatment with GRP in different times in FLS. GRP treatment increased expression of pAKT in time dependent way (n = 5). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  versus CO.

## DISCUSSION

FLS have a central role in RA pathogenesis and *pannus* formation and secrete diverse cytokines, chemokines and matrix metalloproteinases that can induce cartilage and bone erosion (14). The *in vitro* invasive properties of FLS have been shown to correlate with histology damage in rodent models (3) and with radiographic damage in RA (15). In previous studies we demonstrated the *in vivo* anti-inflammatory and immunomodulatory effects of RC-3095 by the modulation of GRPR in arthritis mouse model. RC-3095 also reduced joint damage and bone erosions raising the possibility of a direct effect on FLS (7, 9).

In the present study, we demonstrated for the first time the presence of GRPR in FLS and that GRP-GRPR pathway affects behavior of FLS by increasing its invasiveness through PI3K/AKT signaling. These discoveries provide new insight into the possible mechanisms of the arthritis-ameliorating effect of RC-3095. In the immunologic system some cell lines express GRPR, including macrophages, T cells and neutrophils (6). GRPR is also expressed in articular chondrocytes and in some cells of the inflammatory infiltrate in mouse models of arthritis (8).

At the same time, the GRPR agonist (GRP) expression is increased in chondrocytes (8), in serum and in synovial fluid of patients with RA (4). In addition, Grimsholm et al shown that GRP levels correlates with IL-6 concentration in fluid synovial, leading to the interpretation that this neuropeptide is associated with disease activity in RA (4). Although little is known about how the release of GRP into synovial fluid occurs, one possibility is that GRP is produced by non-neuronal cells as neutrophils in the synovial tissue (8). In this study, we observed that GRP exposure resulted in increased FLS invasiveness, whereas RC-3095, a specific GRPR antagonist, could revert this effect, indicating that the GRP/GRPR pathway seems to be involved in the altered behavior of these cells. These results suggest that GRP can activate FLS invasiveness in joints leading to a destruction of cartilage and bone. This is important because a correlation between *in vitro* invasive properties of FLS with radiographic erosion and damage in patients with RA and with histologic damage in rats with PIA has been described (3).

There are many mechanisms that could be involved in FLS invasiveness stimulated by GRP. One of these may be the AKT pathway activation. We present evidences that GRP treatment could trigger the pAKT on FLS. This pathway induces different effects on the cell, including resistance to apoptosis, enhanced proliferation and invasiveness.

Also, AKT activation protects FLS to undergo apoptosis (12). In parallel it was related that GRP is able to activate phosphorylation of AKT in lung epithelial cells (10). This is the first study to demonstrate the relationship between GRP and AKT pathway in FLS invasiveness. Based on that, we can infer that GRP/GRPR signaling on FLS could stimulate invasion and apoptotic resistance. It is tempting to propose that GRP/GRPR is an attractive target to treat rheumatology arthritis.

## CONCLUSION

We have demonstrates GRPR expression in FLS and that exogenous GRP are able to activate FLS invasion through AKT pathway. Since the pathway GRP/GRPR can be a new attractive target to treatment of AR.

## REFERENCES

1. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care* 2012;18:S295-302.
2. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:24–33.
3. Laragione T, Brenner M, Sherry B, Gulko PS. CXCL10 and its receptor CXCR3 regulate synovial fibroblast invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:3274–83.
4. Grimsholm O, Rantapää-Dahlqvist S, Forsgren S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R416-26.
5. Petronilho F, Danielski LG, Roesler R, Schwartzmann G, Dal-Pizzol F. Gastrin-releasing peptide as a molecular target for inflammatory diseases: an update. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2013;12:172–7.
6. Zhou S, Potts EN, Cuttitta F, Foster WM, Sunday ME. Gastrin-releasing peptide blockade as a broad-spectrum anti-inflammatory therapy for asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:2100–2105.
7. Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, Meurer L, Brenol JCT, Roesler R, et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:2956–2965.

8. Grimsholm O, Guo Y, Ny T, Rantapää-Dahlqvist S, Forsgren S. Are neuropeptides important in arthritis? Studies on the importance of bombesin/GRP and substance P in a murine arthritis model. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:525–38.
9. Oliveira PG, Brenol C V., Edelweiss MI, Brenol JCT, Petronilho F, Roesler R, et al. Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides* 2008;29:1726–1731.
10. Liu X, Carlisle DL, Swick MC, Gaither-Davis A, Grandis JR, Siegfried JM. Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. *Exp Cell Res* 2007;313:1361–72.
11. Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* 2009;21:470–6.
12. García S, Liz M, Gómez-Reino JJ, Conde C. Akt activity protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis by inhibition of Bid cleavage.
13. Wang M, Wang M, Wang, Ming. Generalized Estimating Equations in Longitudinal Data Analysis: A Review and Recent Developments. *Adv Stat* 2014;2014:1–11.
14. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:24–33.
15. Tolboom TC, Helm-Van Mil AH van der, Nelissen RG, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1999–2002.



## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O presente trabalho demonstrou pela primeira vez a expressão do peptídeo liberador da gastrina em fibroblastos murinos. Não obstante, sugeriu-se que a ativação deste receptor está relacionada com o aumento do dano articular, visto que o peptídeo liberador da gastrina provoca um aumento da invasividade dos fibroblastos sinoviais.

Dessa forma, visando um novo alvo para o tratamento da AR sugere-se que mais estudos sejam realizados para que o envolvimento da via GRP/GRPR na AR seja melhor elucidado.

## **8. PERSPECTIVAS**

Na continuidade deste trabalho pretendemos investigar no nosso grupo de pesquisa:

- A expressão do GRPR em fibroblastos humanos.
- O envolvimento do GRP sobre o comportamento destas células.
- Possíveis vias intracelulares que estejam envolvidas após a ativação/inibição do receptor de GRP.



## 9. REFERÊNCIAS

1. Senna ER, Barros AL De, Silva EO, Costa IF, Pereira L V, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol* 2004;31:594–597.
2. Dennis G. J, Holweg CT, Kummerfeld SK, Choy DF, Setiadi AF, Hackney JA, et al. Synovial phenotypes in rheumatoid arthritis correlate with response to biologic therapeutics. *Arthritis Res Ther* 2014;16:R90.
3. Turner JD, Filer A. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 2015;27:175–182.
4. Epstein FH, Harris ED. Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 1990;322:1277–1289.
5. Krishnan LL, Suarez-Almazor ME. Evidence-based rheumatology practice. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:117–23.
6. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205–2219.
7. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2012;vol.51:v3-11.
8. Lefevre S, Meier FMP, Neumann E, Muller-Ladner U. Role of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des* 2015;21:130–41.
9. Anastasi A, Erspamer V, Bucci M. Isolation and amino acid sequences of alytesin and bombesin, two analogous active tetradecapeptides from the skin of European discoglossid frogs. *Arch Biochem Biophys* 1972;148:443–446.
10. Tokita K, Katsuno T, Hocart SJ, Coy DH, Llinares M, Martinez J, et al. Molecular Basis for Selectivity of High Affinity Peptide Antagonists for the Gastrin-releasing Peptide Receptor. *J Biol Chem* 2001;276:36652–36663.
11. Heasley LE. Autocrine and paracrine signaling through neuropeptide receptors in human cancer. *Oncogene* 2001;20:1563–1569.
12. Schwartzmann G, DiLeone LP, Horowitz M, Schunemann D, Cancelli A, Pereira AS, et al. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. *Invest New Drugs* 2006;24:403–412.
13. Roesler R, Henriques J a P, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target for psychiatric and neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006;5:197–204.

14. Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, Meurer L, Brenol JCT, Roesler R, et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:2956–2965.
15. Oliveira PG, Brenol C V., Edelweiss MI, Brenol JCT, Petronilho F, Roesler R, et al. Effects of an antagonist of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *Peptides* 2008;29:1726–1731.
16. García S, Liz M, Gómez-Reino JJ, Conde C. Akt activity protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas-induced apoptosis by inhibition of Bid cleavage. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R33.
17. Malemud CJ. Intracellular Signaling Pathways in Rheumatoid Arthritis. *J Clin Cell Immunol* 2013;4:160.
18. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. In: *The Lancet*. Vol 376.; 2010:1094–1108.
19. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2016.
20. Senna ER, Barros ALP De, Silva EO, Costa IF, Pereira LVB, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol* 2004;31:594–7.
21. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2005;4:130–6.
22. Birnbaum H, Pike C, Kaufman R, Marynchenko M, Kidolezi Y, Cifaldi M. Societal cost of rheumatoid arthritis patients in the US. *Curr Med Res Opin* 2010;26:77–90.
23. Costa J de O, Almeida AM, Guerra Junior AA, Cherchiglia ML, Andrade EIG, Acurcio F de A. Tratamento da artrite reumatoide no Sistema único de Saúde, Brasil: gastos com infliximabe em comparado com medicamentos modificadores do curso da doença sintéticos, 2003 a 2006. *Cad Saúde Pública* 2014;30:283–295.
24. McWilliams DF, Varughese S, Young A, Kiely PD, Walsh DA. Work disability and state benefit claims in early rheumatoid arthritis: the ERAN cohort. *Rheumatol* 2014;53:473–481.
25. Pereira IA, Mota LMH da, Cruz BA, Brenol CV, Fronza LSR, Bertolo MB, et al. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia sobre o manejo de comorbidades em pacientes com artrite reumatoide. *Rev Bras Reumatol* 2012;52:483–495.
26. Feldmann M, Maini RN. Perspectives from masters in rheumatology and autoimmunity: Can we get closer to a cure for rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheumatol*

2015;67:2283–2291.

27. Castro-Santos P, Díaz-Peña R. Genética da artrite reumatoide: é necessário um novo impulso em populações latino-americanas. *Rev Bras Reumatol* 2016;56:171–177.

28. Holoshitz J. The rheumatoid arthritis HLA-DRB1 shared epitope. *Curr Opin Rheumatol* 2010;22:293–298.

29. Carlens C, Hergens MP, Grunewald J, Ekblom A, Eklund A, Höglund CO, et al. Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1217–1222.

30. Plenge RM. Recent progress in rheumatoid arthritis genetics: one step towards improved patient care. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21:262–271.

31. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21:279–83.

32. Song YW, Kang EH. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: Rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM* 2009;103:139–146.

33. Martin-Mola E, Balsa A, García-Vicuna R, Gómez-Reino J, González-Gay MA, Sanmartí R, et al. Anti-citrullinated peptide antibodies and their value for predicting responses to biologic agents: a review. *Rheumatol Int* 2016;36:1043–1063.

34. J.S. S, D. A, K. R. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: New insights from old clinical data? *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:235–243.

35. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 2008;152:415–422.

36. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7:429–442.

37. Smolen JS, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nat Publ Gr* 2015;11:276–289.

38. Scott PA, Kingsley GH, Smith CM, Choy EH, Scott DL. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and myocardial infarctions: comparative systematic review of evidence from observational studies and randomised controlled trials. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1296–304.

39. Schaffer D, Florin T, Eagle C, Marschner I, Singh G, Grobler M, et al. Risk of serious NSAID-related gastrointestinal events during long-term exposure: A systematic review. *Med J Aust* 2006;185:501–506.

40. Choo KJL, Simons E, Sheikh A. Glucocorticoids for the treatment of anaphylaxis: Cochrane systematic review. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2010;65:1205–1211.

41. Laurindo IMM, Ximenes AC, Lima FAC, Pinheiro GRC, Batistella LR, Bertolo MB, et al. Artrite reumatoide: diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Reumatol* 2004;44:435–442.
42. Gaffo A, Saag KG, Curtis JR. Treatment of rheumatoid arthritis. *Am J Heal Pharm* 2006;63:2451–2465.
43. Lopez-Olivo MA ngeles, Siddhanamatha HR, Shea B, Tugwell P, Wells GA, Suarez-Almazor ME. Methotrexate for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane database Syst Rev* 2014;6:CD000957.
44. Lahiri M, Dixon WG. Risk of infection with biologic antirheumatic therapies in patients with rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2015;29:290–305.
45. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:473–488.
46. Kimpel D. Effects of Abatacept in Patients with Methotrexate-Resistant Active Rheumatoid Arthritis: A Randomized Trial Kremer JM, Genant HK, Moreland LW, et al. *Year B Med* 2007;144:865–876.
47. JC E, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, DR C, et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. [MTX v RTX]. *N Engl J Med* 2004;350:2572–2581.
48. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:24–33.
49. Lowin T, Straub RH. Synovial fibroblasts integrate inflammatory and neuroendocrine stimuli to drive rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol* 2015;11:1069–1071.
50. Tolboom TC, Helm-Van Mil AH van der, Nelissen RG, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;52:1999–2002.
51. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Delgado M. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat Rev Immunol* 2007;7:52–63.
52. Sunday ME, Kaplan LM, Motoyama E, Chin WW, Spindel ER. Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab Invest* 1988;59:5–24.
53. Yu Z, Ananias HJK, Carlucci G, Hoving HD, Helfrich W, Dierckx RAJO, et al. An update of radiolabeled bombesin analogs for gastrin-releasing peptide receptor

- targeting. *Curr Pharm Des* 2013;19:3329–3341.
54. Gonzalez N, Moody TW, Igarashi H, Ito T, Jensen RT. Bombesin-related peptides and their receptors: recent advances in their role in physiology and disease states. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:58–64.
55. Cornelio DB, Roesler R, Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy. *Ann Oncol* 2007;18:1457–66.
56. Czepielewski RS, Porto BN, Rizzo LB, Roesler R, Abujamra AL, Pinto LG, et al. Gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) mediates chemotaxis in neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:547–52.
57. Grimsholm O, Rantapää-Dahlqvist S, Forsgren S. Levels of gastrin-releasing peptide and substance P in synovial fluid and serum correlate with levels of cytokines in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R416-26.
58. Grimsholm O, Guo Y, Ny T, Rantapää-Dahlqvist S, Forsgren S. Are neuropeptides important in arthritis? Studies on the importance of bombesin/GRP and substance P in a murine arthritis model. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:525–38.
59. Dal-Pizzol F, Leone LP Di, Ritter C, Martins MR, Reinke A, Pens Gelain D, et al. Gastrin-releasing peptide receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:84–90.
60. Song G, Satterfield MC, Kim J, Bazer FW, Spencer TE. Gastrin-releasing peptide (GRP) in the ovine uterus: regulation by interferon tau and progesterone. *Biol Reprod* 2008;79:376–386.
61. Pereira DV, Steckert AV, Petronilho FM, Petronilho F, Roesler R, Schwartzmann G, et al. Effects of an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor in an animal model of uveitis. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5300–5303.
62. Petronilho F, Araujo JH, Steckert A V, Rezin GT, Ferreira GK, Roesler R, et al. Effect of a gastrin-releasing peptide receptor antagonist and a proton pump inhibitor association in an animal model of gastritis. *Peptides* 2009;30:1460–1465.
63. Damin DC, Santos FS, Heck R, Rosito MA, Meurer L, Kliemann LM, et al. Effects of the gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 in a rat model of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2010;55:2203–10.
64. Nicholson KM, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002;14:381–95.
65. Toker A, Marmiroli S. Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. *Adv Biol Regul* 2014;55:28–38.

66. Malemud CJ. Intracellular Signaling Pathways in Rheumatoid Arthritis.
67. Liu X, Carlisle DL, Swick MC, Gaither-Davis A, Grandis JR, Siegfried JM. Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. *Exp Cell Res* 2007;313:1361–1372.
68. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care* 2012;18:S295-302.
69. Laragione T, Brenner M, Sherry B, Gulko PS. CXCL10 and its receptor CXCR3 regulate synovial fibroblast invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2011;63:3274–83.
70. Petronilho F, Danielski LG, Roesler R, Schwartsmann G, Dal-Pizzol F. Gastrin-releasing peptide as a molecular target for inflammatory diseases: an update. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2013;12:172–7.
71. Zhou S, Potts EN, Cuttitta F, Foster WM, Sunday ME. Gastrin-releasing peptide blockade as a broad-spectrum anti-inflammatory therapy for asthma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:2100–2105.
72. Liu X, Carlisle DL, Swick MC, Gaither-Davis A, Grandis JR, Siegfried JM. Gastrin-releasing peptide activates Akt through the epidermal growth factor receptor pathway and abrogates the effect of gefitinib. *Exp Cell Res* 2007;313:1361–72.
73. Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* 2009;21:470–6.
74. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 2013;9:24–33.