

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Medicina

ESTUDO FUNCIONAL *IN VITRO* DE FIBROBLASTOS SINOVIAIS DE PACIENTES
COM ARTRITE REUMATOIDE, OSTEOARTRITE E GRUPO CONTROLE APÓS
ESTIMULAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TNF-ALFA,
INTERLEUCINA-1BETA E INTERLEUCINA-33

Camilla Ribeiro Lima Machado

Belo Horizonte – MG

2015

Camilla Ribeiro Lima Machado

**ESTUDO FUNCIONAL *IN VITRO* DE FIBROBLASTOS SINOVIAIS DE
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, OSTEOARTRITE E GRUPO
CONTROLE APÓS ESTIMULAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
TNF-ALFA, INTERLEUCINA-1BETA E INTERLEUCINA-33**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Saúde do Adulto (área de Ciências Clínicas)

Orientador: Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Co-orientadora: Profa. Adriana Maria Kakehasi

Belo Horizonte

2015

Machado, Camilla Ribeiro Lima.
M149e Estudo funcional in vitro de fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite e grupo controle após estimulação com diferentes concentrações de TNF-alfa, Interleucina-1beta e Interleucina-33 [manuscrito]. / Camilla Ribeiro Lima Machado. -- Belo Horizonte: 2015. 66f.: il.
Orientador: Marcus Vinícius Melo de Andrade.
Coorientador: Adriana Maria Kakehasi.
Área de concentração: Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Artrite Reumatoide. 2. Osteoartrite. 3. Fibroblastos. 4. Membrana Sinovial. 5. Fator de Necrose Tumoral alfa. 6. Interleucinas. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Andrade, Marcus Vinícius Melo de. II. Kakehasi, Adriana Maria. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WE 346

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós Graduação

Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitora de Pesquisa

Profa. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor

Prof. Humberto José Alves

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO

Coordenadora

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenador

Prof. Paulo Caramelli

Colegiado

Representantes Docentes

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Profa. Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Prof. Gilda Aparecida Ferreira

Prof. Rosângela Teixeira

Prof. Paulo Caramelli

Profa. Valéria Maria de Azeredo Passos

“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

A Deus, uma força maior, na qual me apoio sempre em todos os momentos da minha vida.

Agradeço a minha mãe, meu porto seguro, pelos abraços nas horas difíceis, pelo carinho e amor. Ao meu pai, pelas palavras sábias, por acreditar em mim e por me mostrar que os sonhos podem ser realizados. Eles são meu exemplo de vida.

A minha irmã Raíssa, tão meiga e carinhosa, por todos os momentos de convívio.

Ao Jonatã pela paciência, por todo o incentivo e amor.

Ao meu orientador, Prof. Marcus Vinicius Melo de Andrade, pela paciência, confiança e por me ensinar a fazer ciência com ética.

À minha co-orientadora, Profa. Adriana Maria Kakehasi, pelo exemplo de ética, dedicação e competência.

Ao Prof. José Renan da Cunha Melo por ter me recebido no laboratório.

Ao Dr. Gustavo Resende e à Ângela Cunha, por me apoiarem e contribuírem durante a realização do projeto.

À toda equipe do Laboratório Lineu Freire Maia.

A todos ortopedistas que abdicaram da sua rotina para colaborarem com a coleta das amostras.

Aos pacientes, por aceitarem fazer parte desta pesquisa.

A CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Introdução: Artrite reumatoide e osteoartrite são doenças crônicas que se manifestam por alterações articulares inflamatórias, estruturais e funcionais. No ambiente sinovial, os fibroblastos sinoviais estão implicados no ciclo sinovite-dano estrutural, através da produção de citocinas inflamatórias e de enzimas degradadoras de cartilagem, as metaloproteinases (MMPs).

Objetivos: Avaliar a produção de IL-6, MMP-1 e MMP-3 e a ativação das vias de sinalização intracelular após estímulo por IL33, TNF-alfa e IL-1 beta em fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite e grupo controle sem atrite.

Metodologia: Fibroblastos sinoviais foram cultivados de tecido e de líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite e grupo controle sem atrite. Após 22 horas de estímulo com TNF-alfa 1; 5; 10 e 50 ng/ml, IL-1beta 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1 ng/ml e IL-33 1; 3; 10; 30; 100 ng/ml, procedeu-se dosagens de IL-6, MMP-1 e 3, por ELISA. No lisado celular as MAPKs foram avaliadas pela fosforilação quinases JNK, p38, ERK1/2 e o fator de transcrição: NF-κB estimulados com TNF-alfa 10 ng/ml, IL-1beta 0,1 ng/ml e IL-33 100ng/ml por 15 e 30 minutos através da técnica de *Western Blot*.

Resultados: As culturas de fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite e grupo controle sem atrite não estimuladas tiveram produção basal de MMP -1, MMP-3 e IL-6, e nas células estimuladas em concentrações crescentes com os agonista TNF-alfa e IL-1beta induziram a produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após 22 horas. Após a estimulação por TNF-alfa e IL-1beta foi observada fosforilação de ERK1/2 e NF-kB. O estímulo com IL-33 não induziu a produção de IL-6, MMP-1 e -3 em pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite e grupo controle sem atrite, mesmo em concentrações até 100 ng/ml. O seu discreto aumento na fosforilação de ERK1/2 e NF-κB em artrite reumatoide e osteoartrite, não foi suficiente para induzir a produção de metaloproteinases e IL-6.

Conclusões: Fibroblastos sinoviais exerceram papel efetor na sinovite e no dano estrutural da artrite reumatoide e osteoartrite. O comportamento dos fibroblastos sinoviais humanos em resposta ao estímulo com IL-1beta e TNF-alfa pareceu ser mediado pelas vias ERK1/2 e NF-kB, representando oportunidade de estudos sobre novos alvos terapêuticos.

Palavras chaves: artrite reumatoide, osteoartrite, fibroblastos, cultura de células, fisiopatologia, sinalização intracelular.

ABSTRACT

Introduction: Rheumatoid arthritis and osteoarthritis are chronic joint diseases that are manifested by inflammatory, structural and functional articular changes. In synovial environment, synovial fibroblasts are involved in estrututal-synovitis damage cycle through production of inflammatory cytokines and cartilage degrading enzymes, metalloproteinases (MMPs).

Objectives: To evaluate the production of IL-6, MMP-1 and MMP-3 and the activation of intracellular signaling pathways after stimulation by IL33, TNF-alpha and IL-1 beta in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and control group without arthritis.

Methodology: Fibroblasts were cultured synovial tissue and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and controls without arthritis. After 22 hours of stimulation with TNF-alpha 1; 5; 10 and 50 ng/ml, IL-1beta 0.1; 0.2; 0.3; 0.5 and 1 ng/ml and IL-33 1; 3; 10; 30; 100 ng/ml proceeded dosages of IL-6, MMP-1 and 3 by ELISA. The cell lysate of MAPK was evaluated by the phosphorylation kinases JNK, p38, ERK1/2 and transcription factors (NF-kB) stimulated with TNF-alpha 10 ng/ml, IL-1beta 0,1 ng/ml and IL-33 100 ng/ml for 15 and 30 minutes by Western blot technique.

Results: Cultures of synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and control group without arthritis, the non-stimulated cells had basal production of MMP-1, MMP-3 and IL-6, and the stimulated cells with increasing concentrations of TNF-alpha and IL-1beta agonists induced production of MMP-1, MMP-3 and IL-6 after 22 hours. After stimulation by TNF-alpha and IL-1beta was observed phosphorylation of ERK1/2 and NF-kB. Stimulation with IL-33 did not induce IL-6, MMP-1 and -3 production in patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and control group without arthritis, even at concentrations up to 100 ng/mL. In addition, this slight increase in the phosphorylation of ERK1/2 and NF-kB in rheumatoid arthritis and osteoarthritis, was not sufficient to induce the production of metalloproteinase and IL-6.

Conclusion: Synovial fibroblasts exert effector role in synovitis and structural damage of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. The behavior of human synovial fibroblasts in response to stimulation with IL-1beta and TNF-alpha seems to be mediated by pathways ERK1/2 and NF-kB, representing opportunity to study of new therapeutic targets.

Key words: rheumatoid arthritis, osteoarthritis, fibroblasts, cell culture, pathophysiology, intracellular signaling.

LISTA DE ABREVIATURAS

AR: artrite reumatoide

ARL: líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide

ERK1/2: proteína quinase de regulação de sinal extracelular 1 e 2

ELISA: *enzyme linked immuno sorbent assay*

Fig.: figura

FS: fibroblastos sinoviais

IL: interleucina

JNK: c-jun N-terminal quinase

LabLFM: Laboratório Lineu Freire-Maia

MAP quinase/MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos

µg/mcg: microgramas

ml: mililitros

mM: milimolar

MMP: metaloproteinase

N: normal

NF-KB: fator de transcrição nuclear kappa-B

ng: nanogramas

NS: não estimulado

PBS: tampão fosfato-salino

OA: osteoartrite

OAL: líquido sinovial de pacientes com osteoartrite

OAM: membrana sinovial de pacientes com osteoartrite

SA: grupo controle sem artrite

SAM: membrana sinovial do grupo controle sem artrite

TBS: tampão tris salino

TNF α : fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Análise por microscopia óptica e de inversão de cultura de fibroblastos sinoviais de paciente com artrite reumatoide na sétima passagem.....31
- Figura 2.** Produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAM na nona passagem com TNF-alfa e IL-1beta por 22 horas.....37
- Figura 3.** Ativação das proteínas fosforiladas de ERK 1/2 (a) e NF-κB (b) após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAM na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 15 e 30 minutos.....38
- Figura 4.** Produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAL na nona passagem com TNF-alfa e IL-1beta por 22 horas.....41
- Figura 5.** Ativação das proteínas fosforiladas de ERK 1/2 (a) e NF-κB (b) após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAL na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 15 e 30 minutos.....42
- Figura 6.** Produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de ARL na nona passagem com TNF-alfa e IL-1beta por 22 horas.....45
- Figura 7.** Ativação das proteínas fosforiladas de ERK 1/2 (a) e NF-κB (b) após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de ARL na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 15 e 30 minutos.....46

Figura 8. Produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de SAM na nona passagem com TNF-alfa e IL-1beta por 22 horas.....49

Figura 9. Ativação das proteínas fosforiladas de ERK 1/2(a) e NF-κB (b) após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de SAM na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 15 e 30 minutos.....50

Figura 10. Produção média de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAM e OAL na nona passagem com TNF-alfa e IL-1beta por 22 horas.....53

Figura 11. Ativação das proteínas fosforiladas de ERK ½ de cultura de fibroblastos sinoviais humanos na nona passagem de OAM (a) e OAL (b), e NF-κB em OAM (c) e OAL (d), após estimulação com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 15 e 30 minutos.....54

Figura 12. Produção basal de MMP -1 (a), MMP-3 (b) e IL-6 (c) sem estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de SAM, ARL, OAM e OAL.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de membrana sinovial de osteoartrite na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas.....	36
Tabela 2. Concentração de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de líquido sinovial de osteoartrite na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas.....	40
Tabela 3. Concentração de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de líquido sinovial de artrite reumatoide na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas.....	44
Tabela 4. Concentração de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de membrana sinovial do grupo controle sem artrite na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas.....	48
Tabela 5. Concentração média de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de membrana sinovial e líquido sinovial de osteoartrite na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas.....	52
Tabela 6. Concentração basal média de MMP -1, MMP-3 e IL-6 de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAM, OAL, ARL e SAM na nona passagem.....	55

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. JUSTIFICATIVA	21
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	22
ARTIGO	25
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica crônica de origem auto-imune que acomete preferencialmente as articulações sinoviais, em geral, com padrão simétrico. As manifestações extra-articulares não são incomuns e incluem anemia, nódulos subcutâneos, ceratoconjuntivite seca, vasculite cutânea e fibrose pulmonar.^{1,2} Acomete 0,5% a 2% da população, tem distribuição mundial e ocorre em ambos os sexos, com predominância feminina (2-4 mulheres para cada homem). Pacientes com AR apresentam morbidade e mortalidade aumentadas em relação à população geral, sendo que um terço dos pacientes não se encontrarão aptos ao trabalho após 10 anos de doença e estima-se que a sobrevivência esteja diminuída em uma década. Pacientes com AR apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de doença cardiovascular, em parte explicado pelo processo inflamatório sistêmico persistente.³ Diversos mediadores inflamatórios se correlacionam de modo que a via final leva a inflamação persistente que causa a destruição de cartilagem e do tecido ósseo.¹ Manifestações ao longo do curso da doença podem levar a deformidade articular, gerando a incapacidade funcional e acometimento hematológico, neurológico, pulmonar ou cardiovascular.⁴

A osteoartrite (OA) é a doença articular mais frequente e comum na população mundial. Ela pode causar incapacidade funcional, onerando sobremaneira os sistemas de saúde, acrescentando-se o fato de que o fenômeno de envelhecimento mundial aumenta sua prevalência, representando 30% a 40% das consultas.⁵ Fatores de risco como gênero, idade, trauma, uso excessivo, genética e obesidade contribuem para iniciar o processo de lesão nos diferentes componentes da articulação.⁶ Já é bem estabelecido que a membrana sinovial, o osso subcondral e a cartilagem são os três principais tecidos atingidos pelos mecanismos patológicos da OA.⁷ Eventos chave que ocorrem na cartilagem incluem o desbalanço metabólico e o surgimento de sinalizadores de degradação, estimulados por cascatas de citocinas, e a produção de mediadores inflamatórios.⁷ Estudos epidemiológicos se concentram basicamente na análise de prevalência e incidência de OA de mãos, joelhos e quadris. Em geral, pode-se dizer que OA de mãos e joelhos é mais frequente em mulheres e de quadris é mais prevalente em homens, embora pareça progredir mais rapidamente nas mulheres.⁸ Suas manifestações clínicas incluem edema articular, limitação dos movimentos, rigidez e deformidade na articulação.^{9,10,11} Diferentemente AR, a inflamação sinovial na OA geralmente é encontrada próxima a áreas com osso e cartilagem patologicamente danificados. Esta inflamação pode liberar proteinases e citocinas capazes de acelerar a destruição articular.⁶

Os fibroblastos sinoviais (FS) são células mesenquimais com características distintas de outras linhagens de fibroblastos.¹² Nas articulações sinoviais, essas células asseguram a integridade estrutural e dinâmica, controlando a composição do fluido sinovial e da matriz extracelular. Entretanto, na AR, FS sofrem hiperplasia e assumem comportamento patogênico, tornando-se importante componente do *pannus* reumatoide. O *pannus* é um tecido de granulação vascular composto de células de proliferação sinovial, pequenos vasos sanguíneos e células inflamatórias. Ele causa destruição do tecido articular localizado entre a membrana sinovial e cartilagem.¹³

Os FS são as principais produtoras locais de interleucina 6 (IL-6) e potenciais produtores de IL-33.^{12,14} Da mesma forma, produzem grandes quantidades de metaloproteinases (MMPs), enzimas proteolíticas ativadas nos processos de remodelamento tecidual de natureza fisiológica e patológica. As MMPs mais importantes no dano articular da AR são as colagenases (MMP-1, MMP-13) e a estromelina (MMP-3).¹⁵ Os fatores indutores da produção de MMPs incluem citocinas, fatores de crescimento, ligantes dos receptores Toll-símile (*Toll-like receptors* – TLR), e espécies reativas de oxigênio. Os estímulos para a produção das MMPs são transmitidos ao núcleo através da via de sinalização das MAP quinases (MAPKs), para as quais pelo menos três grupos foram identificados em mamíferos: proteína quinase de regulação de sinal extracelular (ERK) 1 e 2, c-Jun N-terminal quinase/proteína quinase ativada por estresse (JNK/SAPK) 1 e 2, e proteínas p38 α , β , γ e δ .¹⁶ O fator de transcrição NF- κ B está envolvido na regulação das respostas inflamatórias em pacientes com AR, também é um importante contribuinte para a produção de IL-6 e interleucina-8 (IL-8) em fibroblastos. Uma vez demonstrada a presença do receptor ST2 em fibroblastos e sabendo-se que a ligação ao seu receptor deflagra a ativação das vias intracelulares de sinalização, via MAPKs – p38, ERK e JNK, hipotetiza-se que a produção de MMPs e citocinas por fibroblastos ativados por IL-33 possa ser um importante mecanismo fisiopatológico em AR e que isso se faça através da ativação dessas vias de sinalização.¹⁷

As alterações histológicas observadas na membrana sinovial na OA incluem geralmente, características indicativas de uma "sinovite inflamatória de baixo grau", tais como a hiperplasia sinovial, infiltração de macrófagos e linfócitos, neoangiogênese e fibrose.¹⁸ Embora a patogênese da OA não seja totalmente compreendida, e sua fisiopatologia como em AR é multifatorial e complexa, a invasão dos FS na sinóvia parece ser uma das características da doença¹⁹, desempenhando um papel essencial como células efetoras na destruição da articulação através da produção de metaloproteinases.²⁰ Estudos indicam o importante papel do FS na degradação da cartilagem desta doença através da produção de mediadores

inflamatórios e catabólicos.¹⁹⁻²¹ O fator de necrose tumoral alfa (TNF - α) e interleucina- 1 beta (IL - 1 β) estão elevados em OA e desempenham importantes papéis na sua patogênese.²² Alterações de eventos apoptóticos em células sinoviais, regulam a composição do tecido e da homeostase. Estas alterações levam à ativação de células sinoviais e contribuem para a inflamação e hiperplasia sinovial.²¹

Um estudo demonstrou que os níveis de IL-33 no soro e líquido sinovial na AR foram maiores do que na OA.²³ Estes achados sugerem que a IL-33 possa ser um bom biomarcador para a AR, como também um potencial alvo terapêutico devido seu papel pró-inflamatório.²⁴ Cria-se, entretanto, grande expectativa no caso da AR, visto que as evidências relacionam potencial participação da IL-33 na fisiopatologia da doença, mas por outro lado, também apontam para uma conexão com a aterosclerose, ainda com resultados controversos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a produção de IL-6, MMP-1 e MMP-3 e a ativação das vias de sinalização intracelular após estímulo em diferentes concentrações de IL33, TNF-alfa e IL-1 beta em fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide (AR), osteoartrite (OA) e grupo controle sem artrite (SA).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a produção basal de IL-6, MMP-1 e -3 em culturas de fibroblastos sinoviais não estimuladas de pacientes com AR, OA e SA.
- Avaliar a curva dose-resposta da produção de IL-6, MMP-1 e -3 após estímulo com IL33, TNF-alfa e IL-1 beta em culturas de fibroblastos sinoviais de pacientes com AR, OA e SA;
- Avaliar a ativação da MAP quinase, ERK1/2 e do fator de transcrição, NF- κ B, após estímulo com IL33, TNF-alfa e IL-1 beta em culturas de fibroblastos sinoviais de pacientes com AR, OA e SA;
- Comparar a produção de IL-6, MMP-1 e -3 e a ativação de ERK1/2 e NF- κ B após estímulo com IL33, TNF-alfa e IL-1 beta em fibroblastos sinoviais de membrana e líquido sinovial provenientes de pacientes com OA.

3. JUSTIFICATIVA

Os mecanismos envolvidos na ativação de FS na AR e OA, na produção e secreção de citocinas e metaloproteinases ainda não são bem compreendidos. Este projeto pretende contribuir para a elucidação dos mecanismos que participam da produção de citocina IL-6 e metaloproteinases em FS humanos em cultura através da estimulação *in vitro* com TNF-alfa e IL-1 beta recombinantes e o estímulo com IL-33. O estudo visa determinar se os FS de pacientes com AR, OA e SA respondem de maneira semelhante. O melhor entendimento dessas repostas pode abrir novas perspectivas terapêuticas em AR. Toda esta metodologia já vem sendo utilizada no Laboratório Lineu Freire-Maia. Recentemente a aluna de mestrado, Rafaela Bicalho Viana Macedo apresentou dissertação de mestrado que padronizou e caracterizou as culturas de FS. Outro estudante de mestrado, Gustavo Gomes Resende, está estudando os FS na artrite psoriásica.

Em continuidade à essa linha de pesquisa, pretende-se contribuir para o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença reumatoide e outras doenças articulares inflamatórias, permitindo a identificação de biomarcadores e potenciais alvos terapêuticos. Acreditamos que a elucidação das vias reguladoras será parte importante do plano de desenvolvimento futuro de terapias mais eficazes, específicas e seguras.

De acordo com as diretrizes do Programa de Pós-graduação em Ciências Clínicas Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da UFMG, a dissertação será apresentada sob a forma de artigo científico. A formatação da dissertação segue as orientações contidas no “Guia para redação e apresentação de monografias, dissertações e teses”.²⁵

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010; vol. 376 (9746): p.1094-108.
2. Gibofsky A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Manag Care*. 2012; vol. 18 (13): p. 295-302.
3. Pincus T, et al. Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis Rheum*. 1984; vol. 27 (8): p. 864–72.
4. MRC P, MB B, AM K, MAP C. Artrite Reumatoide. In: Carvalho MAP, Lanna CCD, Bertolo MB, Ferreira GA. *Reumatologia Diagnóstico e Tratamento*. Quarta edição ed. São Paulo: AC Farmacêutica/ GEN- Grupo Editorial Nacional; 2014.
5. Seda H, Seda AC. Osteoartrose. São Paulo: Sociedade Brasileira de Reumatologia. [Citado 2006 Abr12]. Disponível em: <http://www.reumatologia.com.br/orient09.htm>. Acesso em 21 de setembro de 2015.
6. Krasnokutsky S, Attur M, Palmer G, Samuels J, Abramson SB. Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008; vol. 16 (3): S1-3.
7. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum*. 2001; vol. 44 (6): p. 1237-47.
8. Kellgren JH, Laurence JS. Osteo-arthrosis and disk degeneration in an urban population. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1958; vol. 17 (4): p. 388-397.
9. Neogi T. Clinical significance of bone changes in osteoarthritis *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*. 2012; vol. 4: p. 259–267.

10. Lee S, Kim TN, Kim SH. Knee osteoarthritis is associated with increased prevalence of vertebral fractures despite high systemic bone mineral density: a cross-sectional study in an Asian population. *Modern Rheumatology*. 2014; vol. 24: p. 172–181.
11. Goldsmith GM, Aitken D, Cicuttini FM, Wluka AE, Winzenberg T, Ding CH, Jones G, Sharman JE. Osteoarthritis bone marrow lesions at the knee and large artery characteristics. *Osteo- arthritis Cartilage*. 2014; vol. 22: p. 91–94.
12. Firestein G, Bartok B. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*. 2010; vol. 233 (1): p. 233–255.
13. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nature Reviews Rheumatology*. 2013; vol. 9 (1): p. 24-33.
14. Kunisch E, Chakilam S, Gandesiri M, Kinne RW. IL-33 regulates TNF- α dependent effects in synovial fibroblasts. *International Journal of Molecular Medicine*. 2012; vol. 29 (4): p. 530–540.
15. Hammaker DR, Boyle DL, Chabaud-Riou M, Firestein GS. Regulation of c-Jun N-Terminal Kinase by MEKK-2 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology*. 2004; vol. 172 (3): p. 1612-8.
16. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology*. 2008; vol. 47 (4): p. 409-14.
17. Verri WA Jr, Souto FO, Vieira SM, Almeida SC, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010; vol. 69 (9): p. 1697-703.
18. C.R. Scanzello, S.R. Goldring, The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis, *Bone*. 2012; vol. 51: p. 249–257.

19. R. Kurose, H. Kakizaki, H. Akimoto, N. Yagihashi, T. Sawai, Pathological findings from synovium of early osteoarthritic knee joints with persistent hydarthrosis, *International Journal of Rheumatic Diseases*. 2014.
20. D. Sieghart, M. Liszt, A. Wanivenhaus, H. Broll, H. Kiener, B. Klosch, et al., Hydrogen sulphide decreases IL-1beta-induced activation of fibroblast-like synoviocytes from patients with osteoarthritis, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2015; vol. 19: p. 187–197.
21. Haibin Li, Mingxing Lei, Can Yu, Yonggang Lv, Yang Song, Li Yang. Mechano growth factor-E regulates apoptosis and inflammatory responses in fibroblast-like synoviocytes of knee osteoarthritis, *International Orthopaedics*. 2015; p. 1-7.
22. Nagahara M, Waguri-Nagaya Y, Yamagami T et al. TNFalpha induced aquaporin 9 in synoviocytes from patients with OA-and RA. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; vol. 49: p. 898–906.
23. Han GW, Zeng LW, Liang CX, et al. Serum levels of IL-33 is increased in patients with ankylosing spondylitis. *Clinical Rheumatology*. 2011; vol. 30: p. 1583–8.
24. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen induced arthritis by activating mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; vol. 105 (31): p. 10913–8.
25. Souza MSL. Guia para redação e apresentação de monografias, dissertações e teses. 3^a ed. Souza MSL, editor. Belo Horizonte: COOPMED Editora Médica; 2005.

ARTIGO: ESTUDO FUNCIONAL IN VITRO DE FIBROBLASTOS SINOVIAIS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, OSTEOARTRITE E GRUPO CONTROLE APÓS ESTIMULAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TNF-ALFA, INTERLEUCINA-1BETA E INTERLEUCINA-33

Camilla Ribeiro Lima Machado¹, Gustavo Gomes Resende², Rafaela Bicalho Viana Macedo³, Vanuza Chagas do Nascimento⁴, Ângela Soares da Cunha Castello Branco⁵, Adriana Maria Kakehasi⁶, Marcus Vinicius Melo de Andrade⁷

1. Mestranda pelo Programa de Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.
2. Médico, especialista em Reumatologia. Mestrando pelo Programa de Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
3. Médica, especialista em Reumatologia. Mestre pelo Programa de Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
4. Mestranda pelo Programa de Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.
5. Bióloga, técnica do Laboratório Lineu Freire Maia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.
6. Professora Adjunta, Departamento do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.
7. Professor Associado, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

Pesquisa desenvolvida com fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Liga Pan-Americana Contra o Reumatismo (PANLAR).

Autor responsável:

Marcus Vinicius Melo de Andrade

Avenida Alfredo Balena, 190 – sala 290

Santa Efigênia

Belo Horizonte – MG

CEP 30130-100

E-mail: andradem@medicina.ufmg.br

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse

RESUMO

Introdução: Artrite reumatoide e osteoartrite são doenças crônicas que se manifestam por alterações articulares inflamatórias, estruturais e funcionais. No ambiente sinovial, os fibroblastos sinoviais estão implicados no ciclo sinovite-dano estrutural, através da produção de citocinas inflamatórias e de enzimas degradadoras de cartilagem, as metaloproteinases (MMPs).

Objetivos: Avaliar a produção de IL-6, MMP-1 e MMP-3 e a ativação das vias de sinalização intracelular após estímulo por IL33, TNF-alfa e IL-1 beta em fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite e grupo controle sem atrite.

Metodologia: Fibroblastos sinoviais foram cultivados de tecido e de líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite e grupo controle sem atrite. Após 22 horas de estímulo com TNF-alfa 1; 5; 10 e 50 ng/ml, IL-1beta 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1 ng/ml e IL-33 1; 3; 10; 30; 100 ng/ml, procedeu-se dosagens de IL-6, MMP-1 e 3, por ELISA. No lisado celular as MAPKs foram avaliadas pela fosforilação quinases JNK, p38, ERK1/2 e o fator de transcrição: NF-κB estimulados com TNF-alfa 10 ng/ml, IL-1beta 0,1 ng/ml e IL-33 100ng/ml por 15 e 30 minutos através da técnica de *Western Blot*.

Resultados: As culturas de fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite e grupo controle sem atrite não estimuladas tiveram produção basal de MMP -1, MMP-3 e IL-6, e nas células estimuladas em concentrações crescentes com os agonista TNF-alfa e IL-1beta induziram a produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após 22 horas. Após a estimulação por TNF-alfa e IL-1beta foi observada fosforilação de ERK1/2 e NF-κB. O estímulo com IL-33 não induziu a produção de IL-6, MMP-1 e -3 em pacientes com artrite reumatoide, osteoartrite e grupo controle sem atrite, mesmo em concentrações até 100 ng/ml. O seu discreto aumento na fosforilação de ERK1/2 e NF-κB em artrite reumatoide e osteoartrite, não foi suficiente para induzir a produção de metaloproteinases e IL-6.

Conclusões: Fibroblastos sinoviais exerceram papel efetor na sinovite e no dano estrutural da artrite reumatoide e osteoartrite. O comportamento dos fibroblastos sinoviais humanos em resposta ao estímulo com IL-1beta e TNF-alfa pareceu ser mediado pelas vias ERK1/2 e NF-κB, representando oportunidade de estudos sobre novos alvos terapêuticos.

Palavras chaves: artrite reumatoide, osteoartrite, fibroblastos, cultura de células, fisiopatologia, sinalização intracelular.

ABSTRACT

Introduction: Rheumatoid arthritis and osteoarthritis are chronic joint diseases that are manifested by inflammatory, structural and functional articular changes. In synovial environment, synovial fibroblasts are involved in estrututal-synovitis damage cycle through production of inflammatory cytokines and cartilage degrading enzymes, metalloproteinases (MMPs).

Objectives: To evaluate the production of IL-6, MMP-1 and MMP-3 and the activation of intracellular signaling pathways after stimulation by IL33, TNF-alpha and IL-1 beta in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and control group without arthritis.

Methodology: Fibroblasts were cultured synovial tissue and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and controls without arthritis. After 22 hours of stimulation with TNF-alpha 1; 5; 10 and 50 ng/ml, IL-1beta 0.1; 0.2; 0.3; 0.5 and 1 ng/ml and IL-33 1; 3; 10; 30; 100 ng/ml proceeded dosages of IL-6, MMP-1 and 3 by ELISA. The cell lysate of MAPK was evaluated by the phosphorylation kinases JNK, p38, ERK1/2 and transcription factors (NF-kB) stimulated with TNF-alpha 10 ng/ml, IL-1beta 0,1 ng/ml and IL-33 100 ng/ml for 15 and 30 minutes by Western blot technique.

Results: Cultures of synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and control group without arthritis, the non-stimulated cells had basal production of MMP-1, MMP-3 and IL-6, and the stimulated cells with increasing concentrations of TNF-alpha and IL-1beta agonists induced production of MMP-1, MMP-3 and IL-6 after 22 hours. After stimulation by TNF-alpha and IL-1beta was observed phosphorylation of ERK1/2 and NF-kB. Stimulation with IL-33 did not induce IL-6, MMP-1 and -3 production in patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and control group without arthritis, even at concentrations up to 100 ng/mL. In addition, this slight increase in the phosphorylation of ERK1/2 and NF-kB in rheumatoid arthritis and osteoarthritis, was not sufficient to induce the production of metalloproteinase and IL-6.

Conclusion: Synovial fibroblasts exert effector role in synovitis and structural damage of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. The behavior of human synovial fibroblasts in response to stimulation with IL-1beta and TNF-alpha seems to be mediated by pathways ERK1/2 and NF-kB, representing opportunity to study of new therapeutic targets.

Key words: rheumatoid arthritis, osteoarthritis, fibroblasts, cell culture, pathophysiology, intracellular signaling.

INTRODUÇÃO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica de etiologia autoimune. Afeta cerca de 1% da população mundial. Apesar dos avanços terapêuticos, a AR continua apresentando necessidades não atendidas.^{1,2} Na AR, a membrana sinovial (MS) é sede das alterações anatômicas e onde os fibroblastos e macrófagos sinoviais compõem a camada mais superficial de revestimento (lining cell layer).¹

Na AR, os fibroblastos sinoviais (FS) ativados são detectados precocemente na camada de revestimento da MS, sendo um dos tipos celulares dominantes nos locais de invasão da cartilagem e do osso adjacente, apresentando um fenótipo caracterizado por baixa susceptibilidade à apoptose e crescimento independente da ancoragem.^{2,3}

Na membrana sinovial reumatoide, as camadas superficiais passam das usuais três a quatro camadas de células para até dez, onde macrófagos e fibroblastos são células inflamatórias efetoras, produzindo citocinas, quimiocinas e metaloproteinases (MMPs). Agregados linfóides e proliferação vascular (angiogênese) são comumente encontrados.⁵ A divisão do trabalho celular no processo destrutivo articular não é bem definida. Embora as citocinas clássicas em AR, IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sejam produzidas por macrófagos ativados, os fibroblastos são principal fonte de MMPs e IL-6.⁵ Os FS apresentam características únicas, com capacidade invasiva não vista em outras linhagens de fibroblastos, explicada em parte pelo forte estímulo inflamatório local. Em culturas de FS, a produção de IL-6 aumenta consideravelmente com estímulo por IL-1 e TNF- α de maneira dependente de NF- κ -B.⁴ Os FS exercem papel crucial na lesão articular na AR ao produzirem grandes quantidades de colagenases (MMP-1, MMP-13) e a estromelisina (MMP-3).⁵

Estudos comparando AR e OA, relataram níveis mais elevados de IL-33 no soro e no líquido sinovial de AR, comparando-se com pacientes com OA.^{6,7} No entanto, em outro estudo, a expressão local de IL-33 na sinóvia foi bastante variada em AR e OA, não se observando diferença de expressão de IL-33 no tecido entre os grupos, sugerindo que a sinóvia reumatoide inflamada não representa a principal fonte de níveis elevados de IL-33 no soro e na articulação.⁸ Além dos FS poderem constituir fonte importante de IL-33 na sinóvia reumatoide, essas células também expressam o receptor ST2.⁹ Até o momento há poucos trabalhos disponíveis comparando as respostas *in vitro* de FS provenientes de pacientes com AR e OA, assim como a influência da IL-33 na resposta dos FS nas diferentes doenças.

Os mecanismos envolvidos na ativação de FS na AR e OA, na produção e secreção de citocinas e metaloproteinases ainda não são bem compreendidos. Este trabalho visa contribuir

para a elucidação dos mecanismos que participam da produção de citocina IL-6, metaloproteinases, e ativação das vias de sinalização intracelular (MAP quinases) em FS humanos em cultura através da estimulação *in vitro* com TNF-alfa e IL-1beta recombinantes, e IL-33. Além de determinar se os fibroblastos sinoviais de pacientes com AR, OA e controles respondem de forma semelhante ou diferente com e sem estes estímulos.

MÉTODOS

Culturas de fibroblastos sinoviais humanos

Foram obtidos fibroblastos sinoviais a partir de amostras de líquido sinovial de pacientes com AR que preenchiam os critérios do Colégio Americano de Reumatologia de 1987 ou do Colégio Americano de Reumatologia/Liga Europeia contra o Reumatismo de 2010.^{10,11} Para a comparação dos resultados de líquido e membrana sinovial foram obtidas de pacientes com OA diagnosticados seguindo ACR de 1986.¹² Pacientes sem doença reumática, submetidos a procedimentos ortopédicos para correções de lesões ligamentares agudas nas articulações dos joelhos formaram o grupo controle (SAM).

As amostras obtidas foram de pacientes com diagnóstico de artrite reumatoide e osteoartrite na faixa etária acima dos 40 anos de ambos os sexos, que apresentaram com doença em atividade e que tiveram indicação de submeter-se a infiltração intra-articular e a artroplastia. Não estabilizamos uma faixa etária mínima para o grupo controle. Não houve distinção de raça, cor ou nível socioeconômico. Não foram admitidos pacientes em que se suspeitasse de artrite séptica ou que tinham alguma condição que contraindicasse o procedimento (ex: infecção de pele em local próximo a articulação afetada, uso de anticoagulantes orais ou conhecida presença de distúrbios de coagulação). Também não foram admitidos pacientes com articulações que já tivessem sido submetidos a artroplastia total ou outro procedimento intra-articular nos últimos 12 meses.

Os pacientes envolvidos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (nº ETIC 0637.0.203.00-10), antes de qualquer procedimento do estudo.

Para a obtenção de amostras de líquido sinovial de AR (ARL), pacientes com indicação de artrocentese para infiltração de corticoides foram convidados a ceder o material aspirado previamente à infiltração para realização dos experimentos.

A coleta do aspirado foi feita em seringas estéreis heparinizadas (Heparina sódica 5000UI/

0,25mL) e, imediatamente após a coleta, o material foi encaminhado de forma asséptica para o Laboratório Lineu Freire Maia (LabLFM) na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

No LabLFM as amostras foram diluídas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco, n° cat.12800-017) e centrifugadas na velocidade de 1200 rotações por minuto (rpm), por 15 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado. O material depositado, constituído por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos sinoviais, foi acondicionado em frascos para culturas de células juntamente com meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*, Sigma n° cat. F-0643), 1% de solução estreptomicina/penicilina/anfotericina B (Gibco, n° cat. 15245-012) e 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco, n° cat. 11140-050). Toda a manipulação foi feita em capela de fluxo laminar (VECO) empregando-se técnica asséptica.

Para a obtenção das amostras de tecido/membrana sinovial, pacientes com OA e os SA submetidos à artroplastia de joelho ou quadril doaram o excedente sinovial ressecado. Para as amostras de OA de líquido e membrana, logo antes de começar a artroplastia recolheu-se o líquido e no momento da cirurgia, recolheu-se a membrana, ou seja, células provenientes dos mesmos pacientes. Após a coleta, o fragmento removido tanto de amostras com OA como de controles, foi transportado ao laboratório imerso em meio DMEM, em frascos estéreis a 4°C. Na amostra cirúrgica, a sinóvia foi separada das estruturas cartilagenosas e adiposas adjacentes e o conteúdo sinovial foi cortado em pedaços de dois milímetros com uma tesoura cirúrgica esterilizada. Após, seguiu-se incubação com colagenase tipo IV (Sigma n° cat. C5138) a 0,1% em meio DMEM *overnight* em agitação de 100 rpm a 37°C. Ao término da digestão com colagenase, o material foi centrifugado e o sedimento transferido para garrafa de cultura imerso em meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução estreptomicina/penicilina/anfotericina B e 1% de aminoácidos não essenciais. Toda a manipulação foi feita em capela de fluxo laminar (VECO) empregando-se técnica asséptica.

Cultivo celular

As células foram cultivadas em frascos para cultura em meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução estreptomicina/penicilina/anfotericina B e 1% de aminoácidos não essenciais. As culturas foram mantidas em estufa de cultura de células a 37°C e 5% de CO₂ com troca do meio de cultura a cada três dias e sempre que se detectava alteração no pH, traduzido por mudança na cor do meio.

Após atingir confluência, as células foram lavadas com PBS, submetidas à remoção enzimática com solução de tripsina a 0,05 % em EDTA 0,02 % (Trypsin-EDTA, Gibco n° cat. 25300-062) a 37°C durante quatro minutos e semeadas em quatro garrafas de mesmo tamanho. Esse processo foi realizado de quatro a oito vezes para as culturas humanas.

As culturas foram avaliadas por microscopia invertida diariamente para avaliação do crescimento e morfologia celular, além da averiguação do estado de contaminação.

Para os experimentos, foram utilizadas culturas humanas na 9ª passagem.

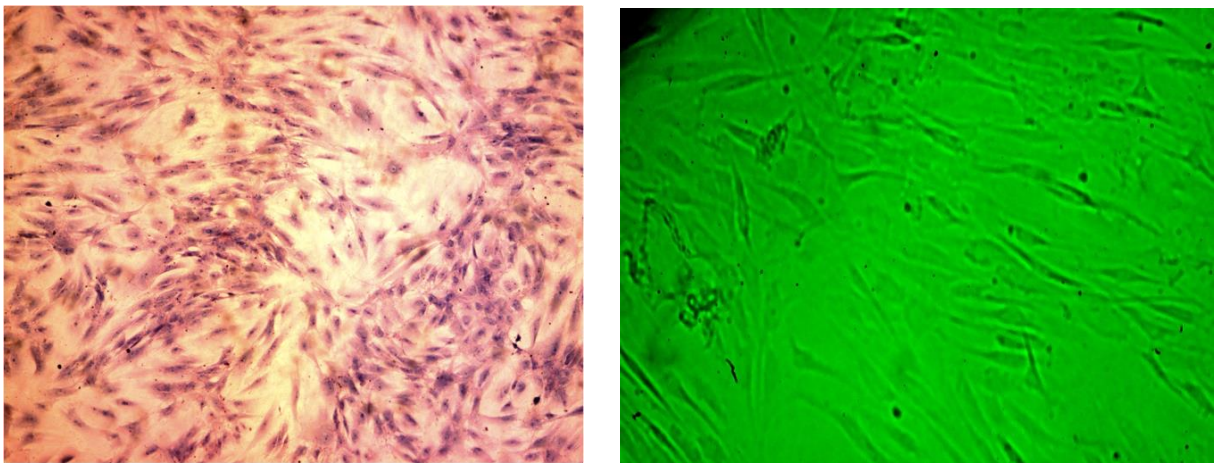


Figura 1. Análise por microscopia óptica e de inversão de cultura de fibroblastos sinoviais de paciente com artrite reumatoide na sétima passagem. a) Coloração por Hematoxilina e Eosina. Aumento de 10 vezes. b) Fibroblastos sinoviais sem coloração. Aumento 40 vezes.

Estímulo

As células foram transferidas às placas de cultura (150.000 células/poço) com 24 poços e mantidas por 24 horas imersas em meio DMEM enriquecido com 1% de soro fetal bovino e 1% de solução estreptomicina/penicilina/anfotericina B e mantidos na incubadora a 37°C e 5% de CO₂ para, então, serem estimuladas com IL-33, TNF-alfa e IL-1 beta.

Para cada experimento foram preparadas quatro placas de cultura de células de 24 poços cada. Alguns poços foram utilizados para o grupo controle, sem estimulação, na qual foi feita apenas a troca do meio. O processo de estimulação teve início com a retirada do meio DMEM em cada poço seguido pela lavagem com PBS por duas vezes com substituição por novo DMEM enriquecido com 1% de soro fetal bovino e 1% de solução estreptomicina/penicilina/anfotericina B. A escolha das doses de cada agonista (TNF-alfa, IL-1 beta e IL-33) para a construção da curva dose-resposta baseou-se em dados da literatura (13,14,15,16) e experimentos prévios realizados no nosso laboratório. Além das células sem estímulo (NS), cada poço recebeu IL-33 nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 ng/mL, TNF-alfa nas concentrações 1; 5; 10 e 50 ng/mL e IL-1 beta nas concentrações 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1 ng/ml. Após 22 horas de estímulo com estes agonistas, o sobrenadante foi colhido para a detecção da IL-6, MMP 1 e 3. As amostras foram estocadas em freezer -80°C até o momento das dosagens. Todas as dosagens foram feitas através da técnica de ELISA.

Para a detecção da ativação das vias de sinalização, os estímulos foram realizados com as seguintes doses de TNF-alfa 10 ng/ml, IL-1 beta 1 ng/ml e IL-33 100 ng/ml, durante 15 e 30 minutos e células não estimuladas (NS). Após o tempo de estimulação, as culturas foram lavadas com solução de PBS, pH 7,4 a 4° C e submetidas à lise celular, por 3 minutos, pela adição de 400 µL de solução de tampão de lise (25mM Tris [2-Amino-2hidroximetil-propano-1,3-diol], pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 5 mM pirofosfato de sódio; 1 mM ortovanato de sódio; 10 mM fluoreto de sódio; 10% glicerol; 1 mM PMSF [fluoreto de fenilmetilsulfonilo]; 25 mcg/ml leupeptina; 25 mcg/ml aprotinina; 2 mcg/ml pepstatina; 1 tablete de inibidor de protease – Complete (Roche) a 4° C. Após a lise celular, as placas foram raspadas com a ajuda de uma espátula de borracha para remoção dos fragmentos das células aderidas ao fundo de cada poço. A seguir, foi realizado a determinação da concentração de proteínas nas amostras pelo método de Bradford e carregado em cada poço dos géis a quantidade de 45 mcg de proteína para eletroforese.

No lisado celular foram determinadas por Western Blotting (Invitrogen) as proteínas fosforiladas: ERK1/2 e o fator de transcrição: NF-κB.

ELISA

As concentrações de IL-6, MMP-1 e -3 no sobrenadante das células foram medidas pela técnica de ELISA de acordo com o seguinte protocolo. Inicialmente uma placa de 96 poços (Mikrotestplat 96 well, Sarstedt, catálogo 821581) foi sensibilizada com um anticorpo primário por 18 horas a temperatura ambiente. Toda a solução dos poços foi aspirada e a placa foi lavada 3 vezes com o tampão de lavagem. A seguir foi adicionado o tampão diluente padrão (Soro fetal bovino a 1% em PBS 1X (*Albumin, bovine serum, Fraction V, approx. 99%*)) por 1 hora. Realizou-se novamente o processo de lavagem. Em seguida o padrão e as amostras foram colocados em seus respectivos poços e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Repetiu-se o processo de lavagem. Logo, adicionou-se a anticorpo conjugado com biotina em cada poço com exceção dos poços do *blank* e a placa foi novamente incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Realizou-se novamente o processo de lavagem. Em seguida, adicionou-se a solução de streptavidina-HRP em cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Repetiu-se o processo de lavagem. O cromógeno foi adicionado e a incubação foi realizada por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Neste momento foi adicionado a solução de ácido sulfúrico 2 N para parar a reação. A espectrofotometria foi realizada em um leitor de placas com um filtro de comprimento de onda calibrado a 450 nm. Com os valores fornecidos pelo leitor foi possível determinar a concentração de cada proteína nas amostras. Todas as dosagens foram feitas conforme recomendações do fabricante (R&D System).

Western Blotting

A dosagem das proteínas fosforiladas ERK 1/2 e o fator de transcrição NF- κ B foram realizadas pela técnica de *Western Blotting*. Foram utilizados géis de SDS-poliacrilamida (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1.0X12 well, Invitrogen, catálogo NP0322BOX) nas quais as amostras já prontas foram carregadas juntamente com o padrão de peso molecular. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich, 0,45 μ m Pore Size, Invitrogen, catálogo LC2001*) e incubada com o tampão de bloqueio (TBS 1X com *tween 20* e leite em pó 4 %) por 1 hora à temperatura ambiente, logo foi realizada a lavagem com TBS 1X com 0.1% de *tween 20* (TBST) por 3 vezes a cada 5 minutos. Adicionou-se o anticorpo primário anti-fosfo-tirosina sob baixa agitação permanecendo pernoite a 4°C. Repetiu-se o processo de lavagem e

logo incubou-se a membrana com o anticorpo secundário *anti-rabbit* IgG sob baixa agitação à temperatura ambiente por 1 hora. Novamente repetiu-se o processo de lavagem e a leitura foi realizada através do Kodak Image Station 4000R.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa SPSS 19.0. Os casos em que houve distribuição normal para a diferença das produções de MMP-1, -3 e IL-6 de cada estímulo (TNF-alfa, IL-1 beta e IL-33) com as amostras não estimuladas utilizou-se o teste *T-student*, e para os casos em que a distribuição das diferenças não foi normal, utilizou-se o teste Wilcoxon. Para a análise da produção basal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Para todos os casos considerou-se o nível de significância igual a 0,1.

RESULTADOS

Após o cultivo celular e os estímulos com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 avaliamos a produção de IL-6, MMP-1, -3 e a ativação das vias de sinalização. Para a realização dos experimentos para as dosagens de citocinas, foram utilizadas amostras de onze pacientes: quatro com OA, quatro controles e três com AR. Para avaliar a ativação das proteínas fosforiladas da MAPK, ERK1/2 e do fator de transcrição (NF- κ B) em fibroblastos sinoviais, utilizamos no total de nove pacientes, três com OA, três controles e três com AR.

Produção de metaloproteinases -1, -3 e IL-6 e vias de sinalização ativadas em fibroblastos sinoviais humanos de OAM

Na Tabela 1 e na Figura 2 está demonstrada a produção de MMP-1, MMP-3 e IL-6 após estimulação da cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAM com TNF-alfa, IL-1 beta e IL-33 após 22 horas. Observa-se que concentrações crescentes de TNF-alfa e IL-1 beta induziram a produção de MMP-1, MMP-3 e IL-6 de uma maneira dose-dependente. É importante destacar que mesmo os fibroblastos sinoviais não estimulados produzem MMP-1, MMP-3 e IL-6 (Tabela 1), e que o estímulo com TNF-alfa e IL-1 beta foi capaz de aumentar esta liberação para concentrações muito elevadas. Comparando-se os estímulos de TNF-alfa e

IL-1 beta, IL-1 beta induziu uma maior liberação de MMP-1, MMP-3 e IL-6, em concentrações de até 0,1 ng/ml (Figura 2). A produção de MMP-3, basal e após estímulo, foi maior em relação à produção de IL-6 e de MMP-1. O estímulo com IL-33 não induziu a produção de IL-6, MMP-1 e -3. No entanto, observamos uma redução da produção de IL-6 com concentrações de IL33 iguais ou superiores a 10 ng/ml.

Na figura 3, observa-se a fosforilação da MAPK ERK 1/2 (Fig. 3a), e do fator de transcrição NF- κ B (Fig. 3b), após estímulo com TNF-alfa, IL-1beta, e IL-33 nas concentrações de 10, 1 e 100 ng/ml. Na figura 3a, observa-se aumento na fosforilação de ERK 1/2 após 15 (aumento de 1,7 vezes) e 30 min (aumento de 4 vezes) de estímulo com TNF-alfa em relação ao controle não estimulado. IL-1beta ativou a fosforilação de ERK1/2 mais intensamente que TNF-alfa, com aumento da fosforilação após 15 e 30 min, de 5,2 e 6,2 vezes, respectivamente. Estes dados de ativação são compatíveis com uma maior produção de metaloproteinases e IL-6 após estímulo com IL-1beta. IL-33 aumentou discretamente a fosforilação de ERK1/2 aos 30 min, 1,4 vezes maior em relação ao controle, mas esta ativação não foi suficiente para induzir a produção de metaloproteinases e IL-6.

A fosforilação de NF- κ B aumentou após estímulo com TNF-alfa (15 min, 10,1 vezes e 30 min, 15 vezes), com IL-1beta (15 min, 11,1 vezes e 30 min 14,8 vezes), e IL-33 (15 min, 2,1 vezes e 30 min, 4,7 vezes) (Fig. 3b). O pico de ativação de NF- κ B foi maior com 15 min após estímulo com TNF-alfa, diferentemente de ERK1/2 (Fig. 3b). A ativação do fator de transcrição NF- κ B por IL-33 não traduziu em aumento de produção de metaloproteinases e IL-6.

Tabela 1. Concentração de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de membrana sinovial de osteoartrite na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas.

Amostra	Concentração média [ng/ml]								
	MMP-1			MMP-3			IL-6		
OAM	Média	Sd/n	valor p	Média	Sd/n	valor p	Média	Sd/n	valor p
NS	2,6	0,7	-	8,7	3,6	-	2,1	0,6	-
TNF-alfa 1ng/ml	12,3	4,1	0,068*	20,8	8,8	0,068*	5,1	1,6	0,224
TNF-alfa 5ng/ml	18,0	4,2	0,124	36,6	13,3	0,246	11,8	2,6	0,091
TNF-alfa 10ng/ml	20,1	4,0	0,086	46,7	17,9	0,068*	16,0	3,7	0,110
TNF-alfa 50ng/ml	22,2	4,0	0,065	80,8	28,1	0,238	29,7	10,8	0,068*
NS	2,1	0,6	-	7,3	2,8	-	4,6	1,1	-
IL-1beta 0,1 ng/ml	26,7	5,5	0,094	285,5	53,7	0,074	94,7	15,8	0,055
IL-1beta 0,2 ng/ml	26,2	5,8	0,109	384,6	83,4	0,102	118,6	24,0	0,089
IL-1beta 0,3 ng/ml	28,5	4,8	0,055	466,3	87,1	0,073	173,3	22,4	0,029
IL-1beta 0,5 ng/ml	25,2	5,1	0,088	548,3	94,2	0,060	226,9	27,1	0,024
IL-1beta 1 ng/ml	27,5	5,9	0,107	685,1	122,1	0,066	347,4	21,9	0,004
NS	2,6	0,9	-	7,3	3,0	-	2,0	0,4	-
IL-33 1 ng/ml	2,3	0,7	0,636	6,0	2,4	0,144*	1,8	0,5	0,207
IL-33 3 ng/ml	2,4	0,2	0,715*	13,7	3,7	0,292	1,7	0,6	0,147
IL-33 10 ng/ml	2,1	0,5	0,603	6,8	2,6	0,538	1,5	0,5	0,071
IL-33 30 ng/ml	2,2	0,6	0,546	6,2	2,4	0,273*	1,4	0,5	0,016
IL-33 100 ng/ml	1,9	0,5	1*	7,6	3,3	0,715*	1,6	0,5	0,073

OAM= membrana sinovial osteoartrite; NS= não estimulado; IL-6= interleucina 6; MMP 1e -3= metaloproteinase 1 e 3; IL-33= interleucina 33; IL-1 beta= interleucina 1 beta;

*= teste Wilcoxon

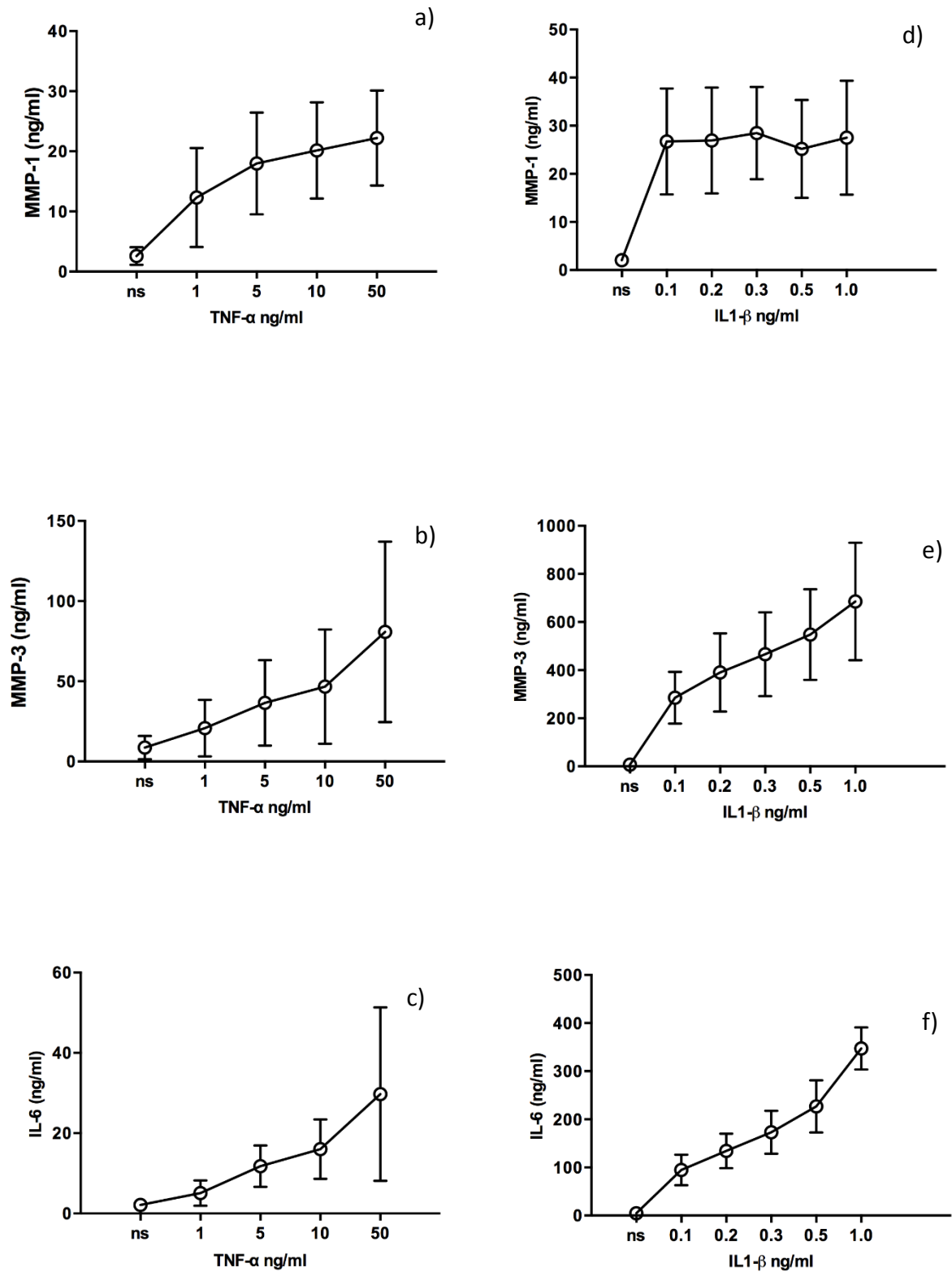


Figura 2. Produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAM na nona passagem com TNF-alfa e IL-1beta por 22 horas. IL-6: interleucina 6; MMP 1e -3: metaloproteinase 1 e 3; IL-1 beta: interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNF α : fator de necrose tumoral α ; ns: não estimulado; OAM: membrana sinovial de osteoartrite.

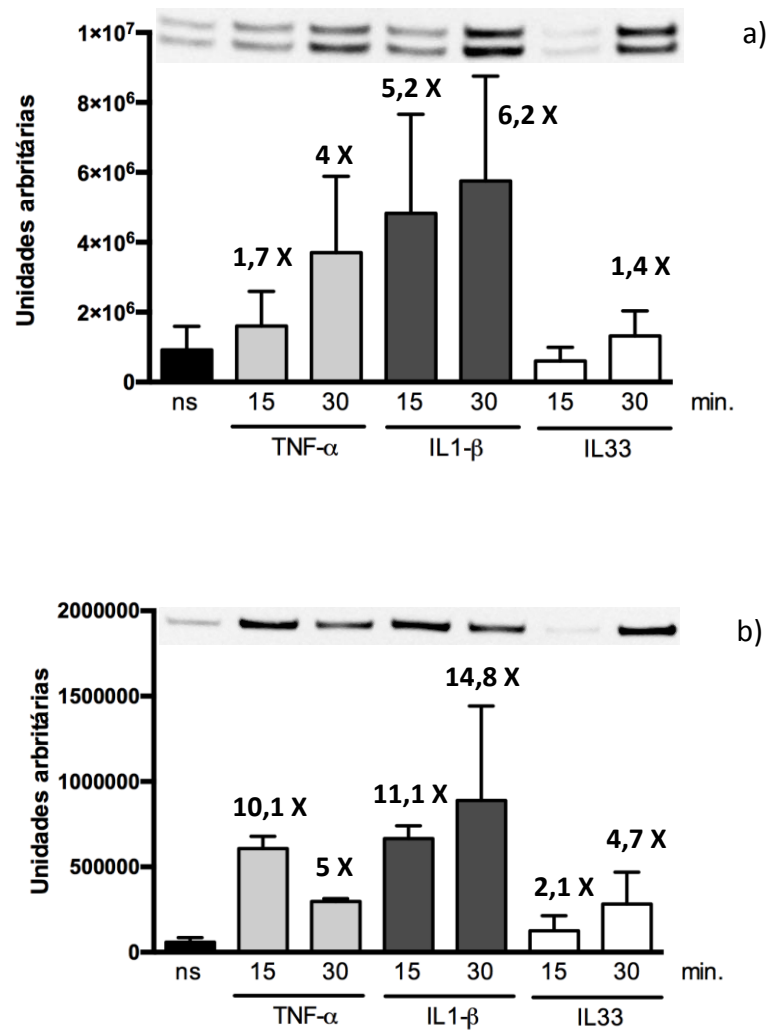


Figura 3. Ativação das proteínas fosforiladas de ERK 1/2 (a) e NF-κB (b) após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAM na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 15 e 30 minutos. IL-1 beta: interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNFα: fator de necrose tumoral α; ns: não estimulado

Produção de metaloproteinases -1, -3 e IL-6 e vias de sinalização ativadas em fibroblastos sinoviais humanos de OAL

Na Tabela 2 e figura 4, observa-se a produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAL com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas. As liberações de MMP-1, -3 e IL-6 foram induzidas por concentrações crescentes de TNF-alfa até 10 ng/ml de maneira dose-dependentes. Entretanto na concentração de 50 ng/ml, TNF-alfa reduziu a produção de IL-6. Comparando-se os estímulos de TNF-alfa e IL-1beta, a IL-1beta induziu uma maior produção de MMP-1, -3 e IL-6 com concentrações de até 0,3 ng/ml (Fig. 4). Na tabela 2, observa-se que mesmo os fibroblastos sinoviais não estimulados produzem MMP-1, MMP-3 e IL-6, e que o estímulo com TNF-alfa e IL-1beta foi capaz de

aumentar esta liberação para concentrações muito elevadas. A produção de MMP-3, basal e após estímulo, foi maior em relação à produção de IL-6 e de MMP-1. O estímulo com IL-33 não induziu a produção de IL-6, MMP-1 e -3, mesmo utilizando-se concentrações elevadas de até 100ng/ml.

A figura 5 representa a fosforilação da MAPK ERK 1/2 (Fig. 5a) e do fator de transcrição NF- κ B (Fig. 5b) após o estímulo com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 (concentrações de 10, 1 e 100 ng/ml). Observa-se um pequeno aumento da fosforilação de ERK1/2 após o estímulo com TNF-alfa por 30 min, 1,1 vezes em relação ao controle NS (Fig. 5a). A IL-1 beta ativou mais intensamente a fosforilação de ERK1/2 que TNF-alfa após o estímulo, com 15 min aumentou 5,3 vezes e 30 min, 3,1 vezes. A IL-33 não aumentou a fosforilação de ERK1/2, como também não induziu a produção de metaloproteinases e IL-6. Na figura 5b, o estímulo com TNF-alfa após 15 min aumentou a fosforilação de NF- κ B 1,7 vezes e a IL-1 beta após 15 min, 3,9 vezes. O pico de ativação de NF- κ B foi maior com 15 min após estímulo com TNF-alfa, diferentemente de ERK1/2 (Fig. 5b). A IL-33 não ativou o fator de transcrição NF- κ B, como também não manifestou aumento de produção de metaloproteinases e IL-6.

Tabela 2. Concentração de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de líquido sinovial de osteoartrite na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas.

Amostra	Concentração média [ng/ml]								
	MMP-1			MMP-3			IL-6		
OAL	Média	Sd/n	valor p	Média	Sd/n	valor p	Média	Sd/n	valor p
NS	6,7	2,2	-	34,1	9,5	-	4,7	0,8	-
TNF-alfa 1ng/ml	9,5	2,2	0,084	366,2	161,4	0,144*	31,0	7,5	0,146
TNF-alfa 5ng/ml	10,6	2,2	0,116	264,8	111,8	0,144*	57,5	12,8	0,119
TNF-alfa 10ng/ml	12,5	2,5	0,090	464,2	207,0	0,273*	74,4	17,6	0,133
TNF-alfa 50ng/ml	12,5	2,5	0,068*	1326,1	650,4	0,465*	48,4	16,0	0,248
NS	8,1	2,7	-	153,1	49,4	-	6,0	1,4	-
IL-1beta 0,1 ng/ml	12,6	3,0	0,056	581,5	158,9	0,153	98,5	14,4	0,068*
IL-1beta 0,2 ng/ml	12,9	2,6	0,079	535,1	108,6	0,065	117,5	17,3	0,043
IL-1beta 0,3 ng/ml	10,6	3,2	0,174	584,6	113,5	0,070	149,6	22,6	0,048
IL-1beta 0,5 ng/ml	11,8	2,4	0,068*	757,1	151,1	0,080	203,5	28,6	0,039
IL-1beta 1 ng/ml	10,7	2,3	0,405	645,3	44,1	0,001	277,4	63,1	0,121
NS	10,6	3,9	-	101,4	36,7	-	13,0	4,3	-
IL-33 1 ng/ml	8,6	2,9	0,344	78,7	28,0	0,285	10,7	3,4	0,287
IL-33 3 ng/ml	9,9	3,6	0,144*	96,3	31,8	0,730	10,7	3,6	0,216
IL-33 10 ng/ml	8,5	2,8	0,398	101,3	39,6	0,995	10,2	3,5	0,180
IL-33 30 ng/ml	8,8	3,1	0,322	115,2	45,8	0,543	8,9	3,0	0,205
IL-33 100 ng/ml	8,2	2,6	0,412	113,9	47,4	0,648	10,3	3,8	0,196

OAL= líquido sinovial de osteoartrite; NS= não estimulado; IL-6= interleucina 6; MMP 1e -3= metaloproteinase 1 e 3; IL-33= interleucina 33; IL-1 beta= interleucina 1 beta; TNF α : fator de necrose tumoral α .

*= teste Wilcoxon

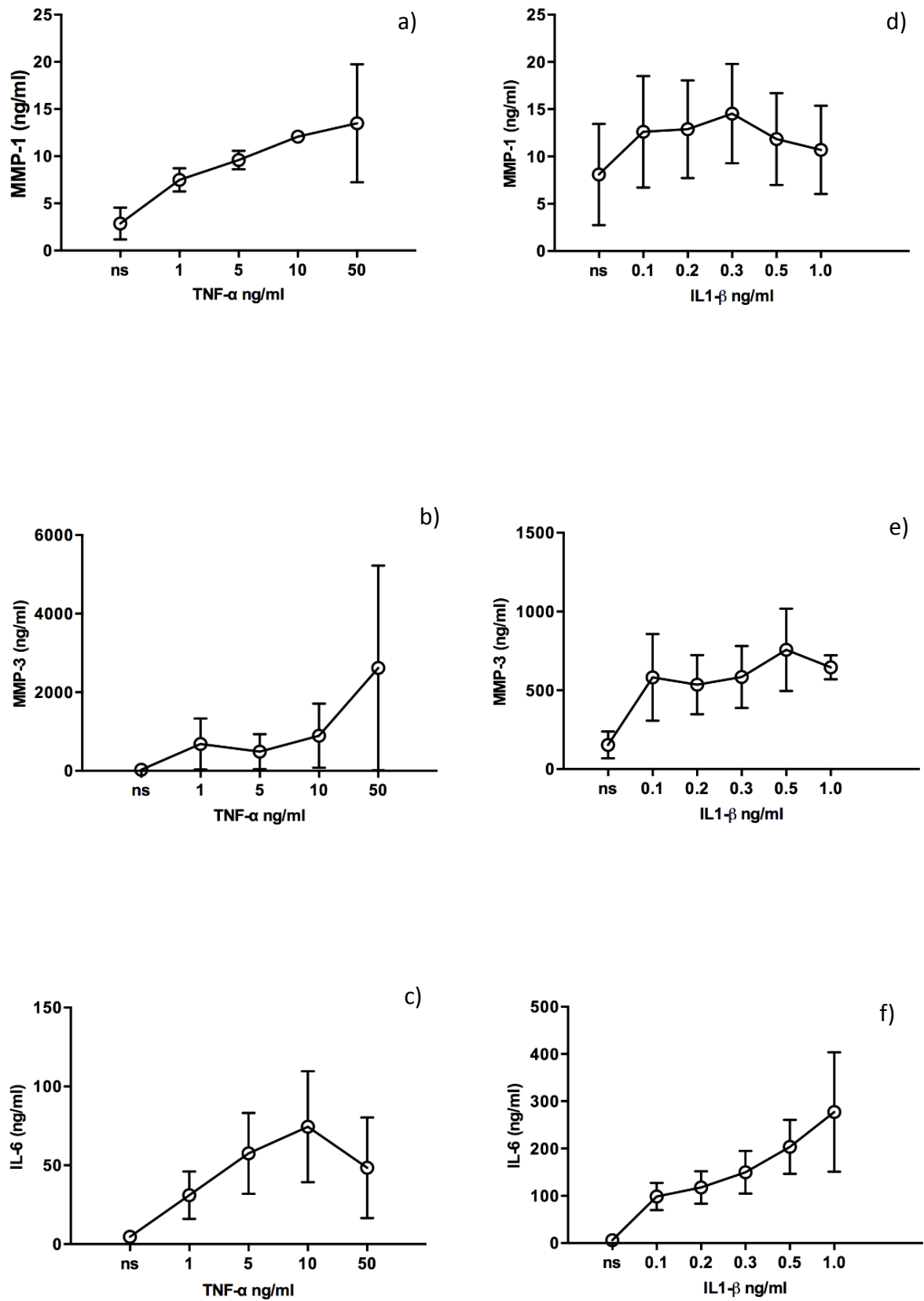


Figura 4. Produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAL na nona passagem com TNF-alfa e IL-1beta por 22 horas.

IL-6: interleucina 6; MMP 1e -3: metaloproteinase 1 e 3; IL-1 beta: interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNF α : fator de necrose tumoral α ; ns: não estimulado; OAL: líquido sinovial de osteoartrite.

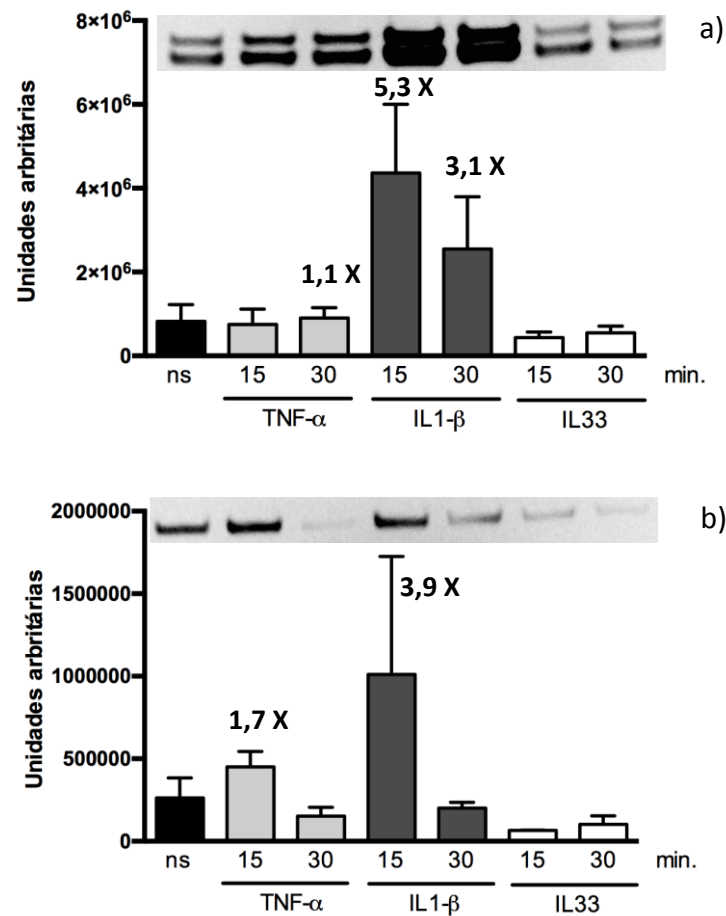


Figura 5. Ativação das proteínas fosforiladas de ERK 1/2 (a) e NF-κB (b) após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAL na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 15 e 30 minutos. IL-1 beta: interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNFα: fator de necrose tumoral α; ns: não estimulado

Produção de metaloproteinases -1, -3 e IL-6 e vias de sinalização ativadas em fibroblastos sinoviais humanos de ARL

Na tabela 3 e na figura 6 está demonstrada a produção de MMP-1, MMP-3 e IL-6 após estimulação da cultura de fibroblastos sinoviais humanos de ARL com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 após 22 horas. Observa-se que concentrações crescentes de TNF-alfa e IL-1 beta induziram a produção de MMP-1, MMP-3 e IL-6 de maneira dose-dependentes, com exceção da produção de MMP-1 que foi induzida por IL-1beta na concentração de até 0,1 ng/ml. Além disso, mesmo os fibroblastos sinoviais não estimulados produziram MMP-1, MMP-3 e IL-6 (Tabela 3), e o estímulo com TNF-alfa e IL-1beta aumentou esta liberação para concentrações muito elevadas. A produção de MMP-3, basal e após estímulo, foi maior em relação à produção de IL-6 e de MMP-1. O estímulo com IL-33 não induziu a produção de IL-6, MMP-

1 e -3. No entanto, observamos uma redução da produção de IL-6 em concentrações de 3 ng/ml e 10 ng/ml de IL33.

Na figura 7, observa-se a fosforilação da MAPK, ERK 1/2 (Fig. 7a), e do fator de transcrição, NF- κ B (Fig. 7b), após estímulo com TNF-alfa, IL-1beta, e IL-33 nas concentrações de 10, 1 e 100ng/ml. Na figura 7a, observa-se aumento na fosforilação de ERK1/2 após o estímulo de TNF-alfa com 15 (aumento de 1,9 vezes) e 30 min (aumento de 3,8 vezes) em relação ao controle não estimulado. A IL-1beta ativou fosforilação de ERK1/2 mais intensamente que TNF-alfa, com aumento da fosforilação após 15 min de 8,1 vezes e 30 min, 12,7 vezes. Estes dados de ativação são compatíveis com uma maior produção de metaloproteinases e IL-6 após estímulo com IL-1beta. A IL-33 aumentou discretamente a fosforilação de ERK1/2 (15 min, 1,2 vezes e 30 min, 1,05 vezes) em relação ao controle, mas esta ativação não foi suficiente para induzir a produção de metaloproteinases e IL-6.

Na figura 7b, a fosforilação do fator de transcrição NF- κ B aumentou após ativação com TNF-alfa (15 min, 9,2 vezes e 30 min, 7,9 vezes), com IL-1beta (15 min, 38 vezes e 30 min, 47 vezes). O pico de ativação de NF- κ B foi levemente maior com 15 min após estímulo com TNF-alfa diferentemente de ERK1/2 (Fig. 7b). A IL-33 não ativou o fator de transcrição NF- κ B, como também não manifestou aumento de produção de metaloproteinases e IL-6.

Tabela 3. Concentração de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de líquido sinovial de artrite reumatoide na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas.

Amostra	Concentração média [ng/ml]								
	MMP-1			MMP-3			IL-6		
ARL	Média	Sd/n	valor p	Média	Sd/n	valor p	Média	Sd/n	valor p
NS	2,5	0,8	-	17,0	4,8	-	6,6	1,5	-
TNF-alfa 1ng/ml	3,5	0,8	0,085	20,4	7,0	0,629	9,5	2,5	0,229
TNF-alfa 5ng/ml	9,1	1,9	0,109*	32,6	11,1	0,337	15,9	4,1	0,174
TNF-alfa 10ng/ml	11,2	2,1	0,116	37,4	11,4	0,239	19,8	5,2	0,177
TNF-alfa 50ng/ml	12,8	2,2	0,093	55,6	18,9	0,275	38,4	11,9	0,220
NS	2,0	0,7	-	12,7	3,8	-	6,8	1,2	-
IL-1beta 0,1 ng/ml	11,6	2,5	0,132	134,3	24,1	0,075	77,4	7,4	0,030
IL-1beta 0,2 ng/ml	12,7	2,5	0,110	197,0	39,8	0,098	99,3	9,9	0,029
IL-1beta 0,3 ng/ml	12,2	2,4	0,112	232,5	48,0	0,104	117,0	10,2	0,020
IL-1beta 0,5 ng/ml	12,1	2,2	0,107	265,3	56,7	0,109*	154,0	13,3	0,021
IL-1beta 1 ng/ml	13,1	2,3	0,091	408,6	109,2	0,162	234,3	19,6	0,109*
NS	2,2	0,9	-	13,5	3,8	-	6,3	1,5	-
IL-33 1 ng/ml	2,0	0,8	0,312	13,0	3,8	0,684	6,0	1,6	0,285
IL-33 3 ng/ml	1,6	0,8	0,127	11,7	3,7	0,457	5,6	1,4	0,053
IL-33 10 ng/ml	2,0	0,7	0,627	11,1	3,7	0,426	5,2	1,5	0,001
IL-33 30 ng/ml	1,5	0,8	0,285*	10,1	3,3	0,276	5,7	1,7	0,285
IL-33 100 ng/ml	2,0	0,5	0,750	11,1	3,8	0,489	5,9	1,8	0,555

ARL= líquido sinovial de artrite reumatoide; NS= não estimulado; IL-6= interleucina 6; MMP 1e -3= metaloproteinase 1 e 3; IL-33= interleucina 33; IL-1 beta= interleucina 1 beta; TNF α : fator de necrose tumoral α .
*= teste Wilcoxon

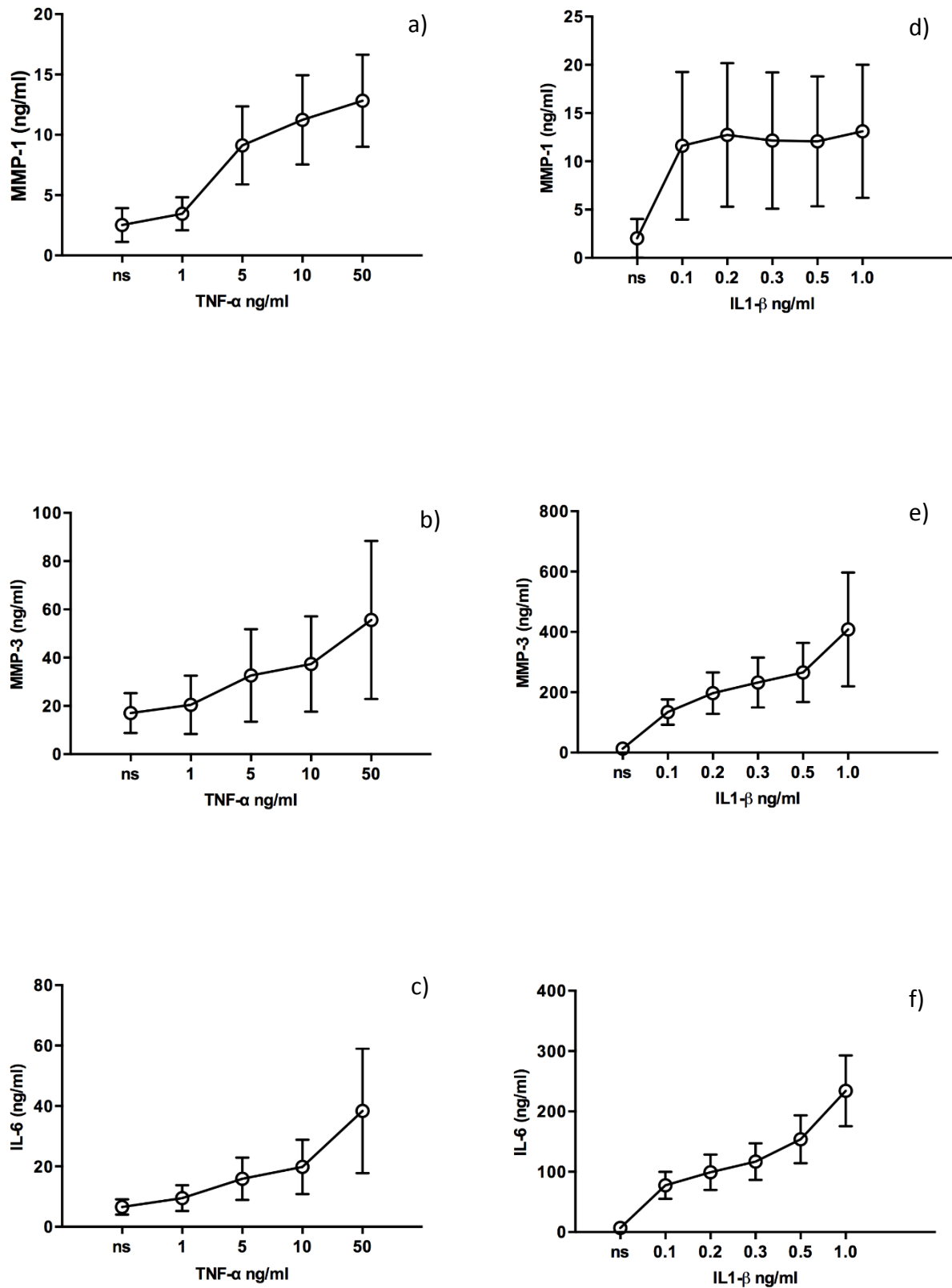


Figura 6. Produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de ARL na nona passagem com TNF-alfa e IL-1beta por 22 horas.

IL-6: interleucina 6; MMP 1e -3: metaloproteinase 1 e 3; IL-1 beta: interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNFα: fator de necrose tumoral α; ns: não estimulado; ARL: líquido sinovial de artrite reumatoide.

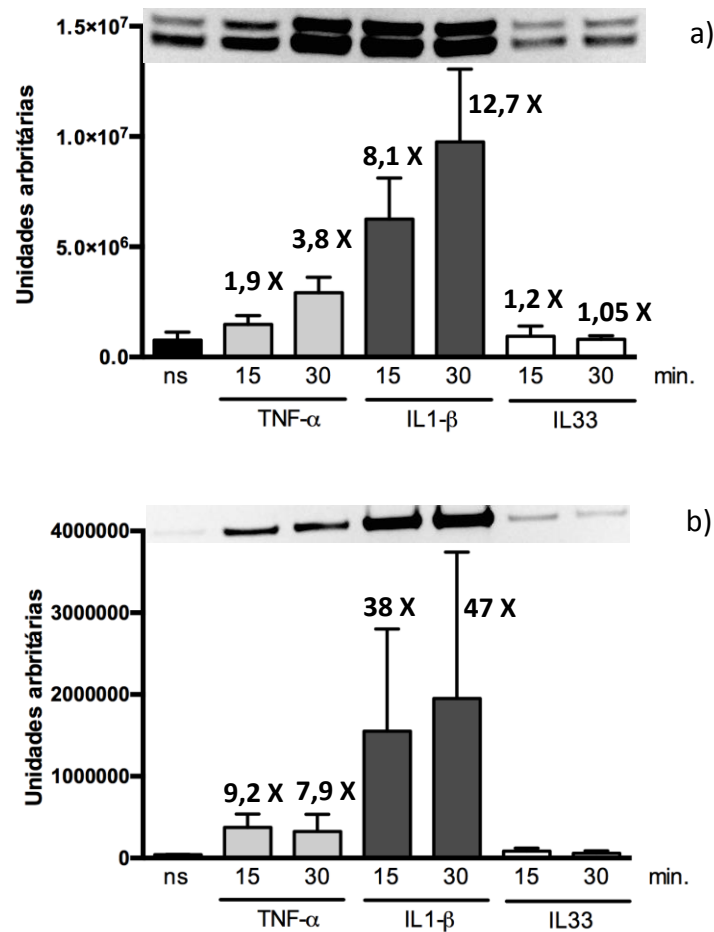


Figura 7. Ativação das proteínas fosforiladas de ERK 1/2 (a) e NF-κB (b) após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de ARL na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 15 e 30 minutos. IL-1 beta: interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNFα: fator de necrose tumoral α; ns: não estimulado

Produção de metaloproteinases -1, -3 e IL-6 e vias de sinalização ativadas em fibroblastos sinoviais humanos de SAM

De acordo com a tabela 4 e figura 8, observa-se a produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos do grupo controle SAM com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas. As liberações de MMP-1, -3 e IL-6 foram induzidas por concentrações crescentes de TNF-alfa até 10 ng/ml de maneira dose-dependentes (Fig. 8), entretanto na concentração de 50 ng/ml, TNF-alfa reduziu a produção de MMP-1 e IL-6. Comparando-se os estímulos de TNF-alfa e IL-1 beta, a IL-1 beta induziu uma maior produção de MMP-1, -3 e IL-6 com concentrações de até 0,1 ng/ml (Figura 8). Na tabela 4, observa-se que mesmo os fibroblastos sinoviais não estimulados produzem MMP-1, MMP-3 e IL-6, e que o estímulo com TNF-alfa e IL-1 beta foi capaz de aumentar esta liberação para concentrações muito elevadas. A produção de MMP-3, basal e após estímulo, foi maior em

relação à produção de IL-6 e de MMP-1. O estímulo com IL-33 não induziu a produção de IL-6, MMP-1 e -3, mesmo utilizando-se concentrações elevadas de até 100ng/ml. No entanto, observamos uma redução da produção de IL-6 com concentração de 3 ng/ml de IL33.

Na figura 9, observa-se a fosforilação da MAPK, ERK 1/2 (Fig. 9a), e do fator de transcrição, NF- κ B (Fig. 9b), após estímulo com TNF-alfa, IL-1beta, e IL-33 nas concentrações de 10, 1 e 100ng/ml. Na figura 9a, observa-se aumento na fosforilação de ERK 1/2 após 15 (aumento de 1,9 vezes) e 30 min (aumento de 6 vezes) em relação ao controle (não estimulado). A IL-1beta ativou a fosforilação de ERK1/2 mais intensamente que TNF-alfa, com aumento da fosforilação após 15 e 30 min, de 14,2 e 25,7 vezes, respectivamente. Estes dados de ativação são compatíveis com uma maior produção de metaloproteinases e IL-6 após estímulo com IL-1beta. A IL-33 aumentou discretamente a fosforilação de ERK1/2 aos 15 min e 30 min, de 1,2 vezes e 3 vezes maior em relação ao controle, mas esta ativação não foi suficiente para induzir a produção de metaloproteinases e IL-6.

A fosforilação de NF- κ B aumentou após estímulo com TNF-alfa (15 min, 3,1 vezes e 30 min, 3,5 vezes), com IL-1beta (15 min, 8,2 vezes e 30 min 4,9 vezes) (Fig. 3b). O pico de ativação de NF- κ B foi maior com 15 min após estímulo com TNF-alfa diferentemente de ERK1/2 (Fig. 3b). A IL-33 não ativou o fator de transcrição NF- κ B, como também não manifestou aumento de produção de metaloproteinases e IL-6.

Tabela 4. Concentração de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de membrana sinovial do grupo controle sem artrite na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas.

Amostra	Concentração média [ng/ml]								
	MMP-1			MMP-3			IL-6		
SAM	Média	Sd/n	valor p	Média	Sd/n	valor p	Média	Sd/n	valor p
NS	5,0	1,0	-	24,0	5,2	-	5,9	1,3	-
TNF-alfa 1ng/ml	13,3	2,8	0,137	68,9	18,8	0,246	24,3	8,4	0,068*
TNF-alfa 5ng/ml	19,7	3,0	0,066	93,1	21,0	0,122	59,9	19,9	0,255
TNF-alfa 10ng/ml	19,8	2,5	0,037	115,4	22,2	0,075	73,6	23,7	0,239
TNF-alfa 50ng/ml	16,9	1,7	0,033	164,1	50,2	0,068*	39,6	6,5	0,066
NS	3,5	0,5	-	19,9	5,8	-	3,4	0,7	-
IL-1beta 0,1 ng/ml	24,5	4,7	0,102	293,1	27,0	0,010	124,9	28,8	0,124
IL-1beta 0,2 ng/ml	20,9	3,4	0,079	351,6	27,7	0,068*	147,6	28,6	0,086
IL-1beta 0,3 ng/ml	17,7	2,8	0,083	497,4	68,6	0,033	180,5	30,2	0,060
IL-1beta 0,5 ng/ml	16,5	2,7	0,083	503,3	59,5	0,021	227,9	36,2	0,053
IL-1beta 1 ng/ml	15,2	2,2	0,065	683,4	74,7	0,017	305,3	42,5	0,037
NS	2,6	0,5	-	17,6	4,4	-	3,2	0,6	-
IL-33 1 ng/ml	2,7	0,5	0,325	16,3	4,5	0,185	3,2	0,6	0,964
IL-33 3 ng/ml	2,4	0,5	0,109*	16,8	5,2	0,702	1,7	0,5	0,068*
IL-33 10 ng/ml	2,2	0,4	0,152	16,1	5,0	0,472	3,1	0,6	0,547
IL-33 30 ng/ml	2,6	0,4	0,970	15,7	4,8	0,244	2,8	0,6	0,248
IL-33 100 ng/ml	2,7	0,5	0,740	15,5	4,0	0,171	3,2	0,6	0,878

SAM= membrana sinovial do grupo controle sem artrite; NS= não estimulado; IL-6= interleucina 6; MMP 1e - 3= metaloproteinase 1 e 3; IL-33= interleucina 33; IL-1 beta= interleucina 1 beta; TNF α : fator de necrose tumoral α .

*= teste Wilcoxon

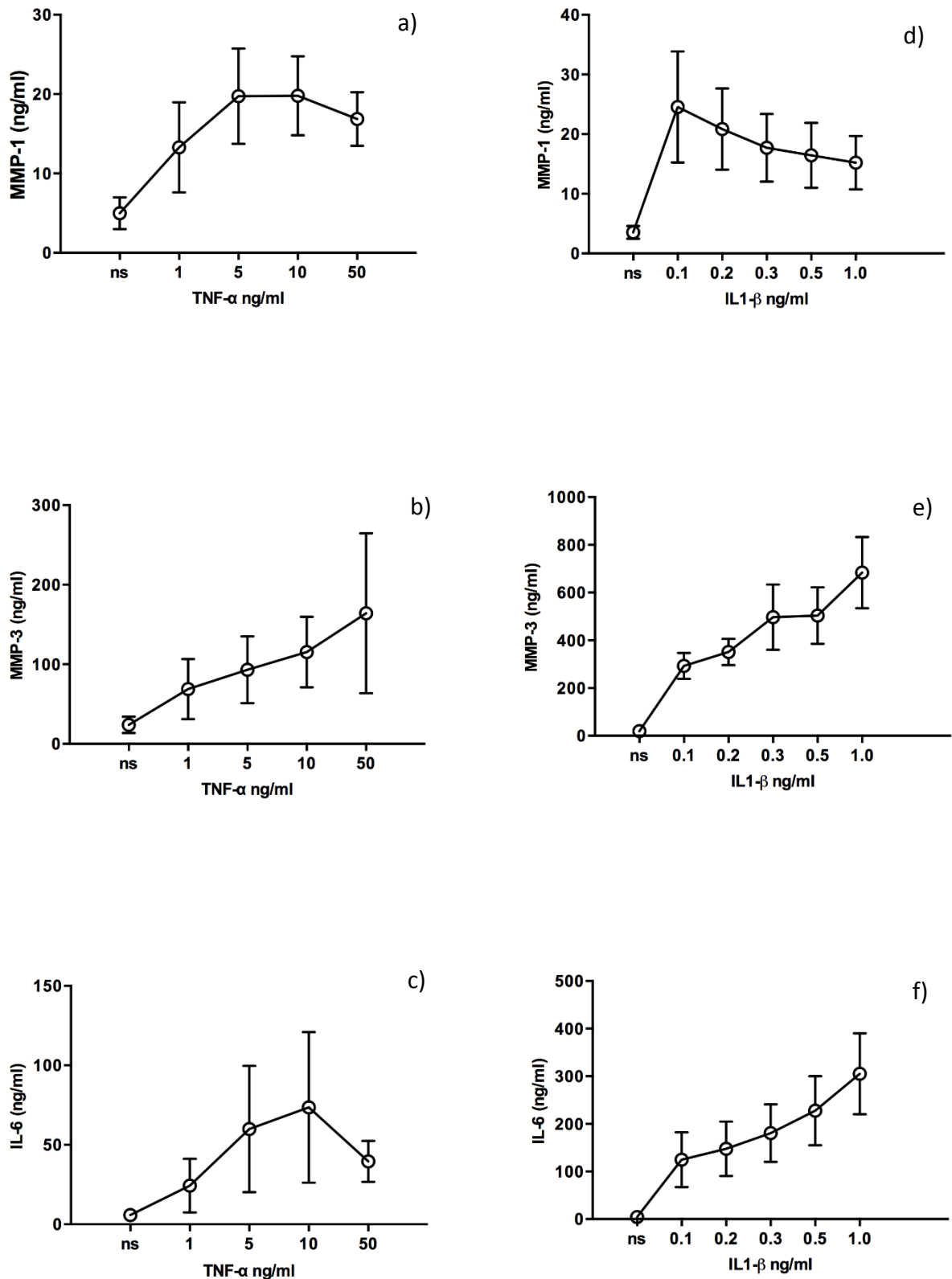


Figura 8. Produção de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de SAM na nona passagem com TNF-alfa e IL-1beta por 22 horas.

IL-6: interleucina 6; MMP 1e -3: metaloproteínase 1 e 3; IL-1 beta: interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNF α : fator de necrose tumoral α ; ns: não estimulado; SAM: membrana sinovial do grupo controle sem artrite

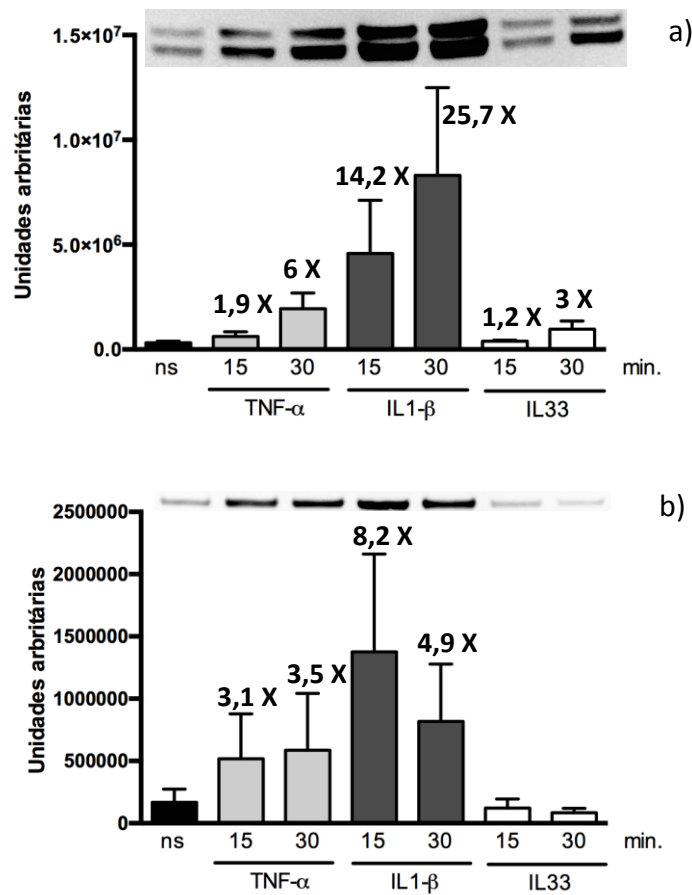


Figura 9. Ativação das proteínas fosforiladas de ERK 1/2(a) e NF-κB (b) após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de SAM na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 15 e 30 minutos. IL-1 beta: interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNFα: fator de necrose tumoral α; ns: não estimulado

Produção de metaloproteinases -1, -3 e IL-6 e vias de sinalização ativadas em fibroblastos sinoviais humanos de OAM versus OAL

A figura 10 e a tabela 5 está demonstrada a comparação das produções de MMP-1, MMP-3 e IL-6 após estimulação da cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAM e OAL com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 após 22 horas. Observa-se que as concentrações crescentes de até 10 ng/ml de TNF-alfa induziu a produção de MMP-1, MMP-3 e IL-6 de uma maneira dose-dependente nas duas amostras, o estímulo com a IL-1beta induziu uma maior liberação de MMP-1, MMP-3 e IL-6, em concentrações de até 0,1 ng/ml (Figura 10). Tanto em OAM como em OAL, os fibroblastos sinoviais não estimulados produziram MMP-1, -3 e IL-6, e o estímulo com TNF-alfa e IL-1beta foi capaz de aumentar esta liberação para concentrações muito elevadas. A IL-33 não induziu a produção de IL-6, MMP-1 e -3, mesmo utilizando-se concentrações de até 100ng/ml nas duas amostras. A produção em OAM e OAL de MMP-3,

basal e após estímulo, foi maior em relação a IL-6 e MMP-1. Além disso, observa-se que a produção das metaloproteinases e IL-6 no basal e quando induzidas por TNF-alfa e IL-1beta é maior em líquido que em membrana nos fibroblastos sinoviais de OA, mas sem significância estatística ($p > 0,05$).

Na figura 11, observa-se a fosforilação da MAPK, ERK 1/2 de OAM (Fig. 11a) e de OAL (Fig. 11b), e do fator de transcrição, NF- κ B, de OAM (Fig. 11c), e de OAL (Fig. 11d), após estímulo com TNF-alfa, IL-1beta, e IL-33 nas concentrações de 10, 1 e 100ng/ml, respectivamente. Na figura 11a, a fosforilação de ERK1/2 por TNF-alfa após 15 e 30 min em OAM, foi 1,8 vezes e 3,6 vezes, respectivamente, maior que em OAL. A IL-1beta ativou a fosforilação de ERK1/2, mais intensamente que TNF-alfa, tanto em células de membrana como de líquido sinovial (Fig. 11a e Fig. 11b). Após 15 min, a IL-1beta, ativou a fosforilação de ERK1/2 em OAM e OAL de forma semelhante e após 30 min a fosforilação aumentou duas vezes em OAM. Estes dados de ativação são compatíveis com uma maior produção de metaloproteinases e IL-6 após estímulo com IL-1beta. A IL-33 aumentou discretamente a fosforilação de ERK1/2 em OAM e em OAL não houve aumento, mas esta ativação não foi suficiente para induzir em nenhum dos dois tipos de células a produção de metaloproteinases e IL-6.

Comparando-se a fosforilação de NF- κ B em OAM (Fig. 11c) e OAL (Fig. 11d), sua ativação por TNF-alfa após 15 e 30 min, foi 5,9 vezes e 8,3 vezes respectivamente maior em OAM. O estímulo de IL-1beta aumentou ainda mais a fosforilação de NF- κ B em OAM após 15 e 30 min (2,8 vezes e 18,5 vezes), em relação a OAL. Apesar da IL-33 não ativar o fator de transcrição NF- κ B em células de OAL, e ativar razoavelmente em OAM, estas células não manifestaram aumento de produção de metaloproteinases e IL-6.

Tabela 5. Concentração média de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de membrana sinovial e líquido sinovial de osteoartrite na nona passagem com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 22 horas.

Estímulos	Concentração média [ng/ml]								
	MMP-1			MMP-3			IL-6		
	OAM	OAL	Valor p	OAM	OAL	Valor p	OAM	OAL	Valor p
NS	2,60	6,69	0,291	8,66	34,09	0,248	2,12	4,65	0,068
TNF-alfa 1ng/ml	12,32	9,50	0,602	20,79	366,23	0,144*	5,06	31,03	0,120
TNF-alfa 5ng/ml	17,97	10,57	0,388	36,59	264,78	0,144*	11,77	57,53	0,135
TNF-alfa 10ng/ml	20,15	12,54	0,432	46,74	464,20	0,144*	16,03	74,43	0,166
TNF-alfa 50ng/ml	22,20	12,50	0,307	80,83	1326,09	0,465*	29,75	48,39	0,203
NS	2,06	8,08	0,257	7,32	153,05	0,203	4,59	6,00	0,197
IL-1beta 0,1 ng/ml	26,71	12,62	0,261	285,50	581,46	0,164	94,73	98,52	0,915
IL-1beta 0,2 ng/ml	26,24	12,89	0,326	384,58	535,15	0,141	118,60	117,52	0,985
IL-1beta 0,3 ng/ml	28,47	10,56	0,346	466,30	584,65	0,259	173,25	149,63	0,711
IL-1beta 0,5 ng/ml	25,19	11,85	0,257	548,26	757,13	0,110	226,94	203,53	0,752
IL-1beta 1 ng/ml	27,50	10,70	0,242	685,06	645,34	0,893	347,43	277,41	0,656
NS	2,60	10,63	0,068*	7,26	101,39	0,258	2,01	13,05	0,249
IL-33 1 ng/ml	2,34	8,57	0,144*	6,02	78,66	0,252	1,76	10,68	0,222
IL-33 3 ng/ml	2,43	9,90	0,273*	13,73	96,32	0,280	1,66	10,75	0,274
IL-33 10 ng/ml	2,06	8,52	0,275	6,79	101,33	0,292	1,46	10,18	0,254
IL-33 30 ng/ml	2,16	8,77	0,287	6,15	115,16	0,298	1,41	8,90	0,246
IL-33 100 ng/ml	1,92	8,19	0,233	7,59	113,90	0,144*	1,65	10,33	0,144*

OAM= membrana sinovial osteoartrite; OAL= líquido sinovial osteoartrite NS= não estimulado; IL-6= interleucina 6; MMP 1e -3= metaloproteinase 1 e 3; IL-33= interleucina 33; IL-1 beta= interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNF α : fator de necrose tumoral α .

*= teste Wilcoxon

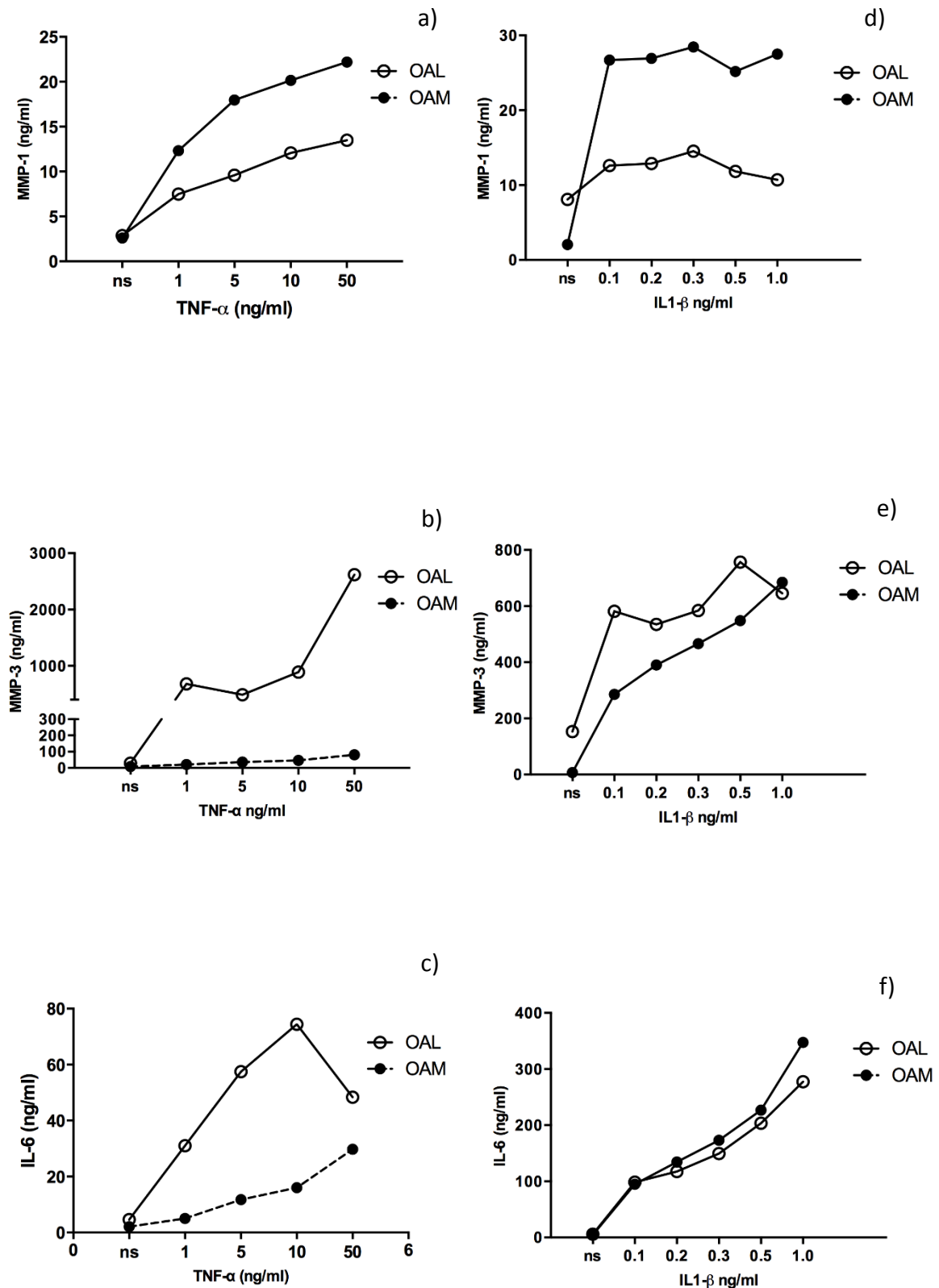


Figura 10. Produção média de MMP -1, MMP-3 e IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAM e OAL na nona passagem com TNF-alfa e IL-1beta por 22 horas. IL-6: interleucina 6; MMP 1e -3: metaloproteinase 1 e 3; IL-1 beta: interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNFα: fator de necrose tumoral α; ns: não estimulado; OAM: osteoartrite membrana; OAL: osteoartrite líquida

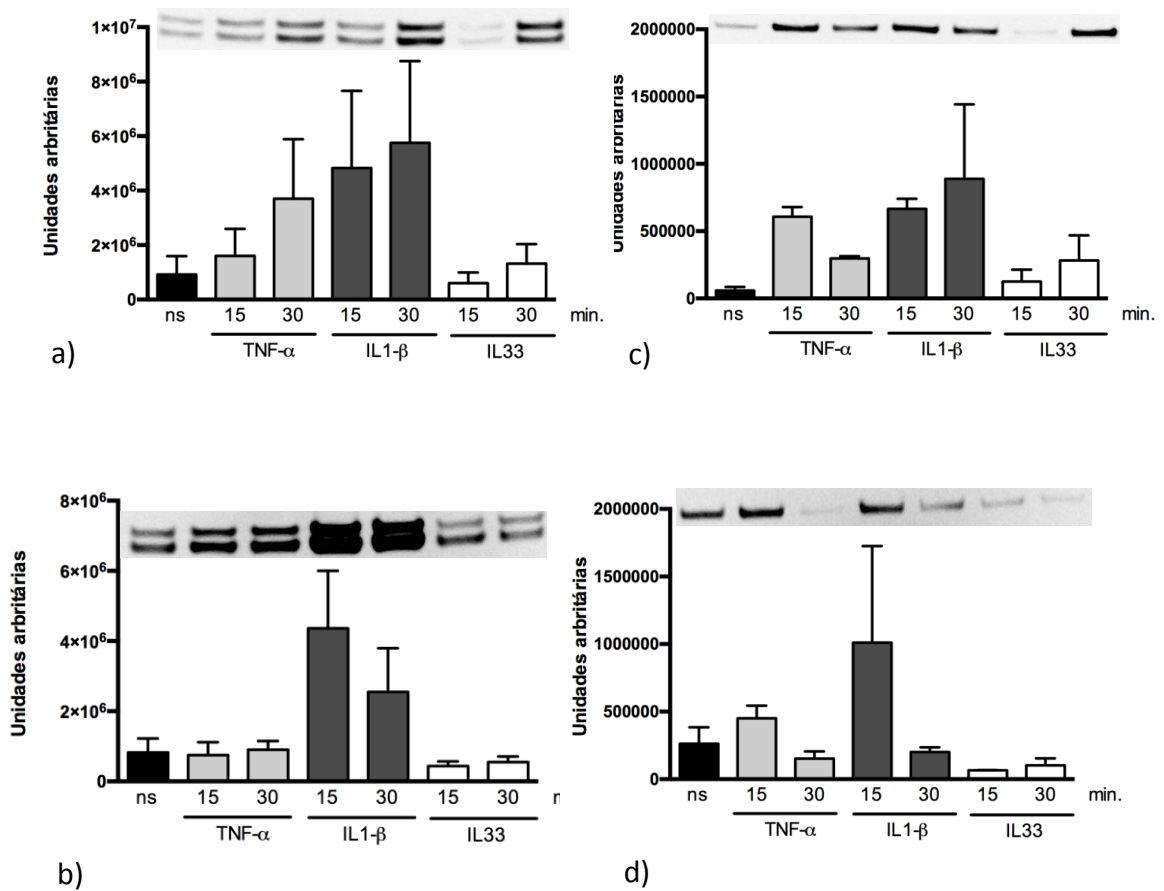


Figura 11. Ativação das proteínas fosforiladas de ERK 1/2 de cultura de fibroblastos sinoviais humanos na nona passagem de OAM (a) e OAL (b), e NF-κB em OAM (c) e OAL (d), após estimulação com TNF-alfa, IL-1beta e IL-33 por 15 e 30 minutos.

IL-1 beta: interleucina 1 beta; IL-33: interleucina 33; TNFα: fator de necrose tumoral α; ns: não estimulado

Produção basal de metaloproteinases -1, -3 e IL-6

Na tabela 6 e figura 12 comprovam a produção basal de MMP-1, MMP-3 e IL-6 da cultura de fibroblastos sinoviais humanos de SAM, ARL, OAM e OAL ($p < 0,05$). Observa-se que a produção de MMP-3 foi maior em relação a IL-6 e MMP-1. Além disso, em células não estimuladas de OAL, a liberação de MMP-1 (Fig. 12a) foi 3,5 vezes maior que em OAM, e 3,8 vezes maior que ARL. Em relação a produção de MMP-3 (Fig. 12b), as células de OAL produziram 10,8 vezes e 6,2 vezes a mais que em OAM e ARL, respectivamente. A produção de IL-6 em OAL (Fig. 12c) foi maior que em OAM, e ARL (2,7 vezes e 1,2 vezes).

Tabela 6. Concentração basal média de MMP -1, MMP-3 e IL-6 de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de OAM, OAL, ARL e SAM na nona passagem.

Amostras não estimuladas (NS)	MMP-1		MMP-3		IL-6	
	Média[ng/ml]	Sd/n	Média[ng/ml]	Sd/n	Média[ng/ml]	Sd/n
OAM	2,42	0,22	7,75	0,95	2,91	0,26
OAL	8,06	1,13	91,01	10,67	7,90	0,86
ARL	2,25	0,23	14,39	1,21	6,54	0,41
SAM	3,70	0,23	20,48	1,58	4,53	0,32
Valor p	P=0,241		P= 0,241		P=0,111	

IL-6: interleucina 6; MMP 1e -3: metaloproteinase 1 e 3; IL-1 beta: interleucina 1 beta; OAM: membrana sinovial osteoartrite; OAL: líquido sinovial osteoartrite; ARL: líquido sinovial artrite reumatoide; SAM: membrana sinovial grupo controle sem artrite.

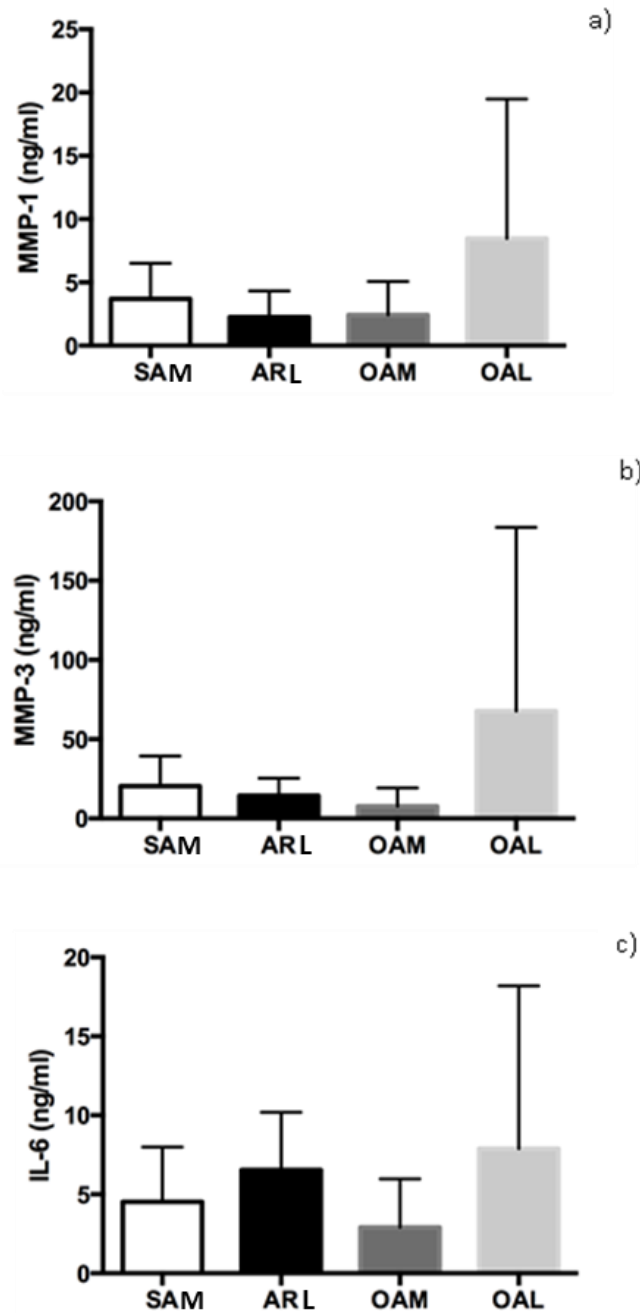


Figura 12. Produção basal de MMP -1 (a), MMP-3 (b) e IL-6 (c) sem estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de SAM, ARL, OAM e OAL.

IL-6: interleucina 6; MMP 1e -3: metaloproteinase 1 e 3; OAM: membrana sinovial osteoartrite; OAL: líquido sinovial osteoartrite; ARL: líquido sinovial artrite reumatoide; SAM: membrana sinovial grupo controle sem artrite

DISCUSSAO

Os fibroblastos sinoviais têm rendido importantes estudos sobre os mecanismos patogênicos da artrite reumatoide e osteoartrite. Avaliações anteriores demonstraram que essas células humanas se tornam quiescentes e pouco adequadas para estudo após a nona passagem,¹⁷ deste modo, as avaliações funcionais dos FS neste trabalho ocorreram na nona passagem.

Os primeiros estudos com estas células datam do início da década de 70 e, logo a seguir, surgiram as primeiras observações da atividade dessas células na AR.^{18,19} Os FS são as células mais comuns nos locais de erosão articular, sabidamente detentores de grande capacidade destrutiva sobre a cartilagem, invadindo o tecido ósseo e cartilaginoso através da produção de MMP. Na AR, essas células adquirem fenótipo autônomo, se tornam resistentes à apoptose e contribuem para a hiperplasia sinovial, além de produzir citocinas e quimiocinas, exacerbando o processo inflamatório local.²⁰

Conforme foi observado, estas células se comportaram como expressivos produtores de IL-6, citocina central na AR.^{21,22} O bloqueio da IL-6 nessa doença tem se mostrado efetivo na redução dos sintomas e das deformidades articulares.²³ Ao contrário à IL-6, cuja ação no ambiente inflamatório da AR já foi amplamente demonstrada, recentemente a IL-33 tem despertado atenção como uma possível citocina chave na fisiopatologia da AR e mediadora do processo inflamatório desta doença.²⁴ Observações em humanos e em estudos experimentais têm demonstrado o potencial papel da IL-33 e de seu receptor ST2 como mediadores da patogênese da AR.^{25,26} Estudos evidenciaram níveis séricos de IL-33 e sST2 significativamente maiores em pacientes com AR em relação a controles saudáveis.²⁷ Já foi demonstrado que IL-33, agindo através da ligação ao receptor ST2, participa da ativação de macrófagos, atua sobre a migração de neutrófilos e promove a degranulação de mastócitos mediada por autoanticorpos *in vitro* e na sinóvia reumatoide *in vivo*.^{28,29} Recentemente, um estudo mostrou que a IL-33 atua como um repressor de transcrição e citocinas extracelulares em fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide.³⁰ De acordo com os nossos resultados o estímulo com IL-33 reduziu a produção de IL-6 em pacientes com AR e OA. Demonstrando-se que talvez essa citocina não seja um mero reflexo do ambiente inflamatório da ambas doenças mas que, pelo o contrário, possa exercer um papel ativo na redução da sinovite. Esses resultados corroboram a importância dos FS na AR e fornecem indícios de que a atuação sobre o complexo FS-IL-33 pode favorecer o controle dos sintomas e do dano estrutural, além de vislumbrar um possível alvo terapêutico no tratamento desta grave doença. Contrariamente à redução da produção da IL-6, o estímulo com a IL-33 não alterou a

produção de MMP-1 e -3 em pacientes com AR, OA e controles. Além disso, o discreto aumento na fosforilação de ERK1/2 e NF-κB em AR e OA foi insuficiente para induzir a produção de metaloproteinases e IL-6. Apesar deste resultado, não existem estudos relacionados ao efeito prolongado da IL-33 em fibroblastos sinoviais. Os efeitos crônicos dessa citocina em mastócitos humanos e de murinos parecem desempenhar um papel de proteção através desta ativação celular.³¹ A exposição a longo prazo de mastócitos de humanos e murinos saudáveis com IL-33 resulta em uma redução de substâncias geradas na ativação dos mastócitos. Além disso a capacidade da IL-33 em modificar a ativação dos mastócitos tem sido recentemente um tema de investigação devido a relatos de elevados níveis de IL-33 nos pulmões de asmáticos e tecidos afetados de pacientes com artrite reumatoide.³¹

Os fibroblastos sinoviais apresentam características inflamatórias e estão envolvidas em vários aspectos fisiopatológicos da AR e OA. Elas secretam enzimas envolvidas na degradação de cartilagem (MMP-1 e MMP-3) e citocinas como a IL-6 na qual possui efeitos estimulantes em células do sistema imune.³² Além disso essas células respondem a várias citocinas incluindo a IL-1beta e TNF-alfa.³³ Este estudo confirma a produção de MMP-1, -3 e IL-6 em pacientes com AR e OA, fortalecendo o papel determinante exercido por essas células na sinovite e no dano estrutural. E a partir do momento em que essas células foram estimuladas com concentrações crescentes de TNF-alfa e IL-1 beta, ocorreu-se um aumento da produção de MMP-1, -3 e IL-6. A maior produção da MMP-3 em relação à MMP-1 torna provável que esta enzima tenha papel mais relevante na inflamação e destruição articular. Em OAL e SAM, o estímulo com concentração mais elevada de TNF-alfa mostrou uma baixa produção de IL-6. Sabe-se que TNF-alfa tem múltiplas funções em controlar imunidade e inflamação³⁴ e, como um de seus efeitos é a mediação da morte celular por apoptose,³⁵ é possível que nesta concentração, o TNF-alfa tenha induzido a apoptose celular nestes FS, explicando-se a baixa produção de IL-6.

Os FS respondem a citocinas através da ativação de múltiplas vias de sinalização intracelular, incluindo ERK, JNK e p38 e o fator de transcrição NFκ-B.^{36,37} As ativações destas vias podem resultar na proliferação e expressão exagerada de múltiplas citocinas incluindo IL-1 β^{2,38,39}, IL-6⁴⁰ e TNF-alfa³⁹⁻⁴¹, bem como a secreção de metaloproteinases, que contribuem para a destruição de tecidos.⁴² Da mesma forma, nosso estudo confirma que o aumento da produção de MMP-1, -3 e IL-6 nas culturas de fibroblastos sinoviais de AR, OA e controles, parecem ser mediadas pela ativação de ERK1/2 e NF-κB, após a estimulação por TNF-alfa e IL-1 beta. A semelhança ultraestrutural entre os FS humanos de líquido e tecido AR foi demonstrada pelo

nosso grupo através da identificação de corpúsculos lamelares no citoplasma dos FS humanos oriundos de líquido e de tecido sinovial. Esses corpúsculos são estruturas específicas dos fibroblastos da membrana sinovial, encontrados somente nas células da camada íntima, e representam organelas de armazenamento de substância surfactante, importante componente do líquido sinovial.⁴³ A análise morfológica comparativa mostrou que fibroblastos sinoviais humanos provenientes do tecido e do líquido articular exibiam morfologia semelhante às microscopias óptica e eletrônica. Observou-se, além da presença dos corpúsculos lamelares, citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e complexos de Golgi exuberantes, caracterizando-as como células com alta atividade funcional e grande capacidade adesiva.⁴³

A análise funcional através do nível de expressão de metaloproteinases -1, -3 e IL-6 quando induzidas por IL-1 beta, foram semelhantes funcionalmente em ambas as células de AR.^{44,45}

Da mesma forma, o estudo mostrou a semelhança funcional entre as células de líquido e membrana sinovial de pacientes com OA através da produção de MMP-1, -3, IL-6 e ativação das vias fosforiladas, ERK1/2 e NF-kB.

Os FS da AR mostraram ter um comportamento bem reprodutivo e consistente na produção das metaloproteinases 1, -3 e IL-6 como também na ativação das proteínas fosforiladas, ERK1/2 e NF-kB. Além disso, na doença reumatoide as células demonstraram desempenho semelhante nas produções de IL-6, MMPs 1 e 3 em relação aos estímulos de TNF-alfa e IL-1 beta. Estudos apontam que estes FS apresentam características únicas, com capacidade invasiva não vista em outras linhagens de fibroblastos, explicada em parte pelo forte estímulo inflamatório local⁴ Deste modo, acredita-se que a eficiência destes estímulos esteja relacionada com o comportamento mais inflamatório e agressivo desta doença.

Nosso estudo tem limitações, o tamanho amostral faz com que os resultados obtidos ainda aguardem possível generalização.

Conclusão

Os fibroblastos sinoviais exercem papel efetor na sinovite e no dano estrutural da AR e OA. O comportamento dessas células em resposta ao estímulo com IL-1beta e TNF-alfa pareceu ser mediado pelas vias ERK1/2 e NF-kB, representando oportunidade de estudos sobre novos alvos terapêuticos.

A análise funcional de fibroblastos sinoviais de pacientes com OA demonstraram que membrana e líquido sinovial são semelhantes.

A IL33 participa da fisiopatologia da AR provocando redução da produção de IL-6 pelas

células estimuladas com IL-33. Esses dados auxiliam no entendimento da fisiopatologia dessa doença e fornecem novas perspectivas de tratamento para esses pacientes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*. 2010; vol. 233 (1): p. 233-55.
2. Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends in Molecular Medicine*. 2010; vol. 16 (10): p. 458-68.
3. Niedermeier M, Pap T, Korb A. Therapeutic opportunities in fibroblasts in inflammatory arthritis. *Best Practice & Research: Clinical Rheumatology*. 2010; vol. 24 (4): p. 527-40.
4. Firestein G, Bartok B. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*. 2010; vol. 233 (1): p. 233–255.
5. Hammaker DR, et al. Regulation of c-Jun N-Terminal Kinase by MEKK-2 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2004; vol. 17 (3), p. 1612-8.
6. Matsuyama Y, Okazaki H, Tamemoto H, et al. Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2010; vol. 37: p. 18–25.
7. Mu R, Huang HQ, Li YH, et al. Elevated serum interleukin 33 is associated with autoantibody production in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*. 2010; vol. 37: p. 2006–13.
8. Dominique Talabot-Ayera, et al. Distinct serum and synovial fluid interleukin (IL)-33 levels in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis and osteoarthritis. *Joint Bone Spine*. 2012; 79 (1): p. 32–37.

9. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, et al. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Korean Medical Science*. 2011; vol. 26 (9): p. 1132-9.
10. 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 & Rheumatology*. 1988; vol. 31 (3): p. 315-24.
11. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatology*. 2010; vol. 62 (9): p. 2569-81.
12. Altman R, Asch E, Bloch D, et al. Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis: classification of osteoarthritis of the knee. *Arthritis & Rheumatology*. 1986; vol. 29: p. 1039-49.
13. Hee-Jin Yun, Wan-Hee Yoo, Myung-Kwan Han, Young-Rae Lee, Jong-Suk Kim, Sang-Il Lee. Epigallocatechin-3-gallate suppresses TNF- α -induced production of MMP-1 and -3 in rheumatoid arthritis synovial Wbroblasts. *Rheumatology International*. 2008; vol. 29: p. 23-29
14. Yun Jung Choi, Won-Seok Lee, Eun-Gyeong Lee, Myung-Soon Sung and Wan-Hee Yoo. Sulforaphane Inhibits IL-1 β -Induced Proliferation of Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts and the Production of MMPs, COX-2, and PGE2. *Inflammation*. 2014; vol. 37, (5): p. 1496-503.
15. Elke Kunisch, Muktheshwar Gandesiri, Renee' Fuhrmann, Andreas Roth, Rando Winter, Raimund W Kinne. Predominant activation of MAP kinases and pro-destructive/pro-inflammatory features by TNF α in early-passage synovial fibroblasts via TNF receptor-1: failure of p38 inhibition to suppress matrix metalloproteinase-1 in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2007; vol. 66: p. 1043-1051.

16. Jung MY¹, Smrž D, Desai A, Bandara G, Ito T, Iwaki S, Kang JH, Andrade MV, et al. IL-33 induces a hyporesponsive phenotype in human and mouse mast cells. *The Journal of Immunology*. 2013; vol. 190 (2): p. 531-8.
17. Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods in Molecular Medicine* 2007; vol. 135: p. 365-75.
18. Council NR. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Eighth ed. Washington, dC: The National Academies Press. 2011.
19. Bornschlögl T. How filopodia pull: What we know about the mechanics and dynamics of filopodia. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 2013; vol. 70 (10): p. 590-603
20. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nature Reviews Rheumatology*. 2013; vol. 9 (1): p. 24-33.
21. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood*. 1989; vol. 74 (1): p. 1-10.
22. Le Goff B, Blanchard F, Berthelot JM, Heymann D, Maugars Y. Le Goff B, Blanchard F, Berthelot JM, Heymann D, Maugars Y. Role for interleukin-6 in structural joint damage and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2010; vol. 77 (3): p. 201-5.
23. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science*. 2007; vol. 315 (5814): p. 1006-10.
24. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Journal of Natural Medicines*. 2009; vol. 15 (12): p. 1414-20.
25. Hammaker D, Sweeney S, Firestein GS. Signal transduction networks in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2003; vol. 62 (2): p. 86-9.

26. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nature Reviews Rheumatology*. 2013; vol. 9 (1): p. 24-33.
27. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, et al. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Korean Medical Science*. 2011; vol. 26 (9): p. 1132-9.
28. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Journal of Natural Medicines*. 2009; vol. 15 (12): p. 1414-20.
29. Verri WA Jr, Souto FO, Vieira SM, Almeida SC, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2010; vol. 69 (9): p. 1697-703.
30. Lee EJ, So MW, Hong S, Kim YG, Yoo B, Lee CK. Interleukin-33 acts as a transcriptional repressor and extracellular cytokine in fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine*. 2016; vol. 77: p. 35-43
31. Jung MY1, Smrž D, Desai A, Bandara G, Ito T, Iwaki S, Kang JH, Andrade MV, et al. IL-33 induces a hyporesponsive phenotype in human and mouse mast cells. *The Journal of Immunology*. 2013; vol. 190 (2): p. 531-8.
32. Guerne, P. A., Zuraw, B. L., Vaughan, J. H., Carson, D. A., and Lotz, M. *Journal of Clinical Investigation*. 1989; vol. 83: p. 585–592.
33. Manicourt, D.-H., Fujimoto, N., Obata, K., and Thonar, E.-M. A. *Arthritis & Rheumatology*. 1995; vol. 38: p. 1031–1039.
34. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*. 2008; vol. 117: p. 244–79.

35. Park HH, Lo YC, Lin SC, Wang L, Yang JK, Wu H. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annual Review of Immunology*. 2007; vol. 25: p. 561–86
36. Sweeney SE, Firestein GS. Mitogen activated protein kinase inhibitors: where are we now and where are we going? *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2006; vol. 65 (3): p. 83–8.
37. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*. 2008; vol. 47: p. 409–14.
38. Bucala R, Ritchlin C, Winchester R, Cerami A. Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *The Journal of Experimental Medicine*. 1991; vol. 173: p. 569–74.
39. Jung YO, et al. Synergism of toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and TLR6 ligation on the production of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in a spontaneous arthritis animal model of interleukin (IL)-1 receptor antagonist-deficient mice. *Immunology Letters*. 2009; vol. 123: p. 138–43.
40. Firestein GS, Zvaifler NJ. How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? *Arthritis & Rheumatology*. 1990; vol. 33: p. 768–73.
41. Roelofs MF, et al. Type I interferons might form the link between toll-like receptor (TLR) 3/7 and TLR4-mediated synovial inflammation in rheumatoid arthritis (RA). *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2009; vol. 68: p. 1486–93.
42. Pap T, Meinecke I, Muller-Ladner U, Gay S. Are fibroblasts involved in joint destruction? *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2005; vol. 64(4): p. 52–4.
43. Vandenaabeele F, De Bari C, Moreels M, Lambrichts I, Dell'Accio F, Lippens PL, et al. Morphological and immunocytochemical characterization of cultured fibroblast-like cells derived from adult human synovial membrane. *Archives of Histology and Cytology*. 2003; vol. 66 (2): p. 145-53.

44. Joong Kyong Ahn, HyungJin Kim, JaeJoon Lee, Eun-Kyung Bae, Hoon-Suk Cha, and Eun-Mi Koh. Phenotypic Characterization and Invasive Properties of Synovial Fluid-Derived Adherent Cells in Rheumatoid Arthritis. *Inflammation*. 2008; vol. 31 (6).

45. Stebulis, J. A., R. G. Rossetti, F. J. Atez, and R. B. Zurier. Fibroblast-like synovial cells derived from synovial fluid. *The Journal of Rheumatology*. 2005; vol. 32: p. 301–306.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo representa importante passo para o fortalecimento da linha de pesquisa “Estudo de Mediadores e Reguladores da Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica”. Propiciou a ampliação dos estudos com cultura de células, com foco voltado para a artrite reumatoide e osteoartrite.

O estudo ampliou o conhecimento sobre a funcionalidade dos FS. Através da avaliação funcional, a dosagem de IL-6 e MMP 1e 3 confirmou o estado ativo e central dessas células na artrite reumatoide e osteoartrite, e o comportamento destas células em resposta ao estímulo com IL-1beta e TNF-alfa mostrou ser mediado pelas vias ERK1/2 e NF-kB, representando oportunidade de estudos sobre novos alvos terapêuticos.

O desafio atual é ampliar essas dosagens nos FS de todas as fontes aqui discutidas, para maior robustez no estudo das produções de MMP-1, -3 e IL-6 e da ativação das vias de sinalização celular, avaliar os efeitos de inibidores farmacológicos das vias de sinalização das MAP quinases, JAK/STAT, PI3 quinase e dos fatores de transcrição (NF-kB, ATF e AP1) em fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide e osteoartrite, a fim de detectar potenciais alvos terapêuticos. E estudar os efeitos da exposição prolongada da IL-33 em fibroblastos sinoviais de pacientes com AR e OA na produção de IL-6, MMP -1 e -3 e nas vias de sinalização ativadas.

Pretende-se contribuir com a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos das doenças articulares crônicas para que, no futuro, esses dados possam ser utilizados para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e específicas.



FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO FUNCIONAL IN VITRO DE FIBROBLASTOS SINOVIAIS HUMANOS
APÓS ESTIMULAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TNF-ALFA,
INTERLEUCINA-1BETA E INTERLEUCINA-33 EM PACIENTES COM ARTRITE
REUMATOIDE, OSTEOARTRITE E GRUPO CONTROLE

CAMILLA RIBEIRO LIMA MACHADO

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, área de concentração CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO.

Aprovada em 15 de dezembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Marcus V Andrade

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade - Orientador
UFMG

Adriana Maria Kakehasi

Profa. Adriana Maria Kakehasi - Coorientadora
UFMG

Silvana Maria Elói Santos

Profa. Silvana Maria Elói Santos
UFMG

Flávio Almeida Amaral

Prof. Flávio Almeida Amaral
UFMG

Belo Horizonte, 15 de dezembro de 2015.