

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

ALLYSSON THIAGO CRAMER SOARES

Papel de SOCS2 no controle da inflamação e do dano articular na artrite experimental

Belo Horizonte

2021

ALLYSSON THIAGO CRAMER SOARES

Papel de SOCS2 no controle da inflamação e do dano articular na artrite experimental

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Fabiana Simão Machado

Orientador: Flávio Almeida Amaral

Belo Horizonte

2021

043

Soares, Allysson Thiago Cramer.

Papel de SOCS2 no controle da inflamação e do dano articular na artrite experimental [manuscrito] / Allysson Thiago Cramer Soares. – 2021.

80 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Fabiana Simão Machado. Orientador: Flávio Almeida Amaral.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Artrite Reumatoide. 3. Proteínas Supressoras da Sinalização de Citocina. I. Machado, Fabiana Simão. II. Amaral, Flávio Almeida. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ALLYSSON THIAGO CRAMER SOARES. Aos vinte e oito dias do mês de julho de 2021 às 09:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom Meetings”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Papel de SOCS2 no controle da inflamação e do dano articular na artrite experimental", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Fabiana Simão Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Waldiceu Verri Júnior (Universidade Estadual de Londrina), aprovado; Dr. Francisco Airton Castro da Rocha (Universidade Federal do Ceará), aprovado; Dra. Vanessa Pinho da Silva (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Luís Henrique Franco (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Flávio Almeida Amaral - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Fabiana Simão Machado - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de julho de 2021.

Waldiceu Verri Júnior
 Dr. Waldiceu Verri Júnior (Universidade Estadual de Londrina)

Francisco Rocha
 Dr. Francisco Airton Castro da Rocha (Universidade Federal do Ceará)

Vanessa Pinho da Silva
 Dra. Vanessa Pinho da Silva (UFMG)

Luís Henrique Franco
 Dr. Luís Henrique Franco (UFMG)

Flávio Almeida Amaral
 Dr. Flávio Almeida Amaral - Orientador (UFMG)

Fabiana Simão Machado
 Dra. Fabiana Simão Machado - Orientadora (UFMG)

Leda Quercia Vieira

Profª Leda Quercia Vieira
 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
 em Bioquímica e Imunologia

Agradecimentos:

Em primeiro lugar venho agradecer a Deus, por me proporcionar a experiência da vida, e a oportunidade de me encontrar na ciência a busca pelo descobrir e conhecer. Agradecer pela convivência com pessoas incríveis, no qual a companhia com cada uma delas me fez aprender, conhecer e compreender a importância do relacionamento interpessoal, seja aqueles criados no ambiente de laboratório, e por aqueles que se expandiram além “das pipetagens”.

Agradecer por aquela que hoje é minha companhia. A minha amável e doce esposa (Ana Carolina Cramer): Que foi o estímulo nos dias difíceis... a alegria nos dias de conquista... o amor em meio as tristezas dos experimentos frustrados, a paz que excede nos dias puxados. Agradecer por aqueles que são a base desde o nascimento... minha família. Principalmente ao meus pais, Adriana e Deli e a meu irmão Jonathan Cramer, que durante toda a minha jornada de vida, estudos e conquistas, foram a minha inspiração e incentivo para batalhar e buscar conquistar os meus sonhos.

Com eterna gratidão e honra, agradecer aos meus orientadores:

- Professora Fabiana Simão Machado, que ao longo desses 8 anos desde que entrei no laboratório (Iniciação Científica até o Doutorado), abriu as portas para mim, acreditou e investiu para que eu pudesse mergulhar ainda mais longe nos estudos e na pós graduação. Com ela aprendi que esperança nunca será frustrada... só depende de como estamos vendo a situação, para que a solução possa ser encontrada. Perseverança e cuidado: são as palavras que a definem para mim. Em meio aos problemas ela encontra a saída... em meio as dificuldades ela se torna o auxílio.
- Professor Flávio Almeida Amaral, que durante o doutorado me abraçou como aluno, e se tornou um grande amigo, direcionando e aconselhando durante o trabalho experimental e sempre que possível fora do ambiente de trabalho. Com ele aprendi que a dedicação e tranquilidade são duas qualidades importantes durante a pós graduação e na vida... Pois dedicando irá conquistar seus objetivos e sonhos... e com a tranquilidade saberá equilibrar os momentos difíceis e o tempo para não se sufocar diante das adversidades.

Aos amigos que fizeram parte de toda essa caminhada, que apoiaram e incentivaram na minha dedicação aos estudos. Aos amigos de laboratório que serviram de companheirismo e exemplo ao longo desses anos, no auxílio aos experimentos e noites não dormidas em prol de descobertas e conhecimento. Obrigado aqueles da “velha guarda”, irmãos que ficarão para sempre

no coração, a eles meus agradecimentos, Bruno Cabral, Diego Rodney, Renata Monti, Pollyana Maria, Andréia Barroso, Fátima Brant, Lísia Esper, Cynthia Honorato e Ronan Campos. Aos novos colegas de laboratório, que me ajudaram, e proporcionaram colaboração e momentos de descontração durante todos esses anos: Katherinne Manrique, Paulo Gaio, Rayane Rabelo, Mariana Rates, Rafaela, César, Natália e Samuel Porto (LIDIN) e Amanda, Daiane, Vivian, Brenda, Peter e Paula (Reumatex).

Aos colegas e laboratórios que colaboraram durante esse tempo, dos grupos da Imunofar, LIMHO e Reumatex. Aos técnicos que participaram de forma fundamental para que todos os utensílios pudessem ser disponibilizados para a pesquisa: Jacqueline, Frankcinéia, Ilma e Hermes.

Ao CEUA e aos animais que são a base da pesquisa e que sem eles nada seria possível de ser realizado e conduzido para a chegada nessa etapa.

Aos professores da banca examinadora, Luís Franco, Vanessa Pinho, Francisco Rocha, Waldiceu Verri, pela disponibilidade e participação, que desde já, contribuíram com conhecimento e opiniões para o aprimoramento na realização deste trabalho.

Às todas as agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, que foram fundamentais no financiamento e para a realização de toda a pesquisa.

Ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, ao Instituto de Ciências Biológicas e a todos prestadores de serviços da UFMG, que de uma forma importante, colaboraram para que chegássemos juntos até aqui.

Att,

Allysson Cramer

“O coração do sábio adquire o conhecimento,
e o ouvido dos sábios busca a ciência.”

Provérbios 18:15 ARC

Resumo

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença crônica articular que pode levar a danos irreversíveis através do processo inflamatório exacerbado nas articulações, incluindo ossos e cartilagem. Apesar de terapias atuais têm revolucionado o tratamento da AR, como os imunobiológicos bloqueadores da atividade de citocinas e de vias de sinalização intracelular, muitos pacientes não são responsivos, além de apresentarem elevado risco de infecções e desenvolvimento de tumores. Supressores de sinalização de citocinas (SOCS) são proteínas endógenas que regulam a sinalização de citocinas, homeostase e patogênese em várias doenças. No entanto, a interseção entre a fisiopatologia da AR e as vias de sinalização SOCS2 não estão bem elucidadas. No presente estudo, investigamos o papel de SOCS2 durante o desenvolvimento de um modelo experimental de artrite induzida por antígeno (AIA) induzida com albumina sérica bovina metilada (mBSA). Em camundongos do tipo selvagem (WT), a expressão de SOCS2 na articulação foi reduzida na fase inicial da artrite, com aumento progressivo em tempos posteriores ao desenvolvimento de AIA. No pico da inflamação, os camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram um número reduzido de células na cavidade articular. Entretanto, na fase tardia da AIA, os camundongos SOCS2^{-/-} exibiram aumento na adesão e acúmulo de neutrófilos, macrófagos, células T CD4⁺, células T duplo positivas (CD4⁺CD8⁺) e células T duplo negativas (CD4⁻CD8⁻) no espaço intra-articular quando comparados aos animais WT, associados ao maior dano articular, perda de proteoglicanos e nocicepção. Esplenócitos de animais SOCS2^{-/-} tiveram níveis elevados de IL-17 e IFN- γ na fase tardia após serem reestimulados com mBSA. A inflamação persistente nos animais SOCS2^{-/-} pode ser explicada por uma falha no processo de sua resolução, uma vez que, a deficiência de SOCS2, resultou em menor número de neutrófilos apoptóticos e redução da eferocitose na articulação. *In vitro*, macrófagos SOCS2^{-/-} têm menor capacidade eferocítica em relação aos macrófagos WT. Além disso, o tratamento com a molécula pró-resolutiva LXA₄ não alterou a capacidade eferocítica nos macrófagos SOCS2^{-/-} quando comparados com macrófagos WT. Assim, demonstrando que SOCS2 desempenha um papel fundamental no controle da resposta inflamatória articular e seu potencial como um novo alvo terapêutico para doenças inflamatórias articulares.

Palavras-chave: Artrite Reumatoide, Artrite Induzida por Antígeno, SOCS2.

Abstract

Rheumatoid Arthritis (RA) is a chronic joint disease that can lead to irreversible damage through the exacerbated inflammatory process in the joints, including bone and cartilage. Although current therapies have revolutionized the treatment of RA, such as immunobiological blockers of cytokine activity and intracellular signaling pathways, many patients are not responsive, in addition to presenting a high risk of infections and tumor development. Cytokine signaling suppressors (SOCS) are endogenous proteins that regulate cytokine signaling, homeostasis and pathogenesis in various diseases. However, the intersection between RA pathophysiology and SOCS2 signaling pathways is not well elucidated. In the present study, we investigated the role of SOCS2 during the development of an experimental model of antigen-induced arthritis (AIA) induced with methylated bovine serum albumin (mBSA). In wild-type (WT) mice, the co-expression of SOCS2 was reduced during the development of AIA. At the peak of inflammation, SOCS2^{-/-} mice showed a reduced number of cells in the joint cavity. However, in the late phase of AIA, SOCS2^{-/-} mice exhibited increased adhesion and infiltration of neutrophils, macrophages, CD4⁺ T cells, double positive T cells (CD4⁺ CD8⁺) and double negative T cells (CD4⁻ CD8⁻) associated with greater joint damage, loss of proteoglycans and nociception. SOCS2^{-/-} splenocytes showed high levels of IL-17 and IFN- γ after being restimulated with mBSA. Despite similar levels of lipoxin (LXA₄) in WT and SOCS2^{-/-} mice, SOCS2 deficiency resulted in fewer apoptotic neutrophils and reduced efferocytosis. Efferocytosis capacity was decreased in SOCS2^{-/-} macrophages, and pretreatment with LXA₄ did not alter efferocytic capacity when compared to WT macrophages. The present study demonstrated the vital role of SOCS2 during development and resolution during AIA. Therefore, SOCS2 could be a new therapeutic target for inflammatory joint diseases.

Key-words: Rheumatoid Arthritis, Antigen Induced Arthritis, SOCS2.

SUMARIO

1	<u>INTRODUÇÃO</u>	10
1.1	ARTRITE REUMATÓIDE	10
1.2	DIAGNÓSTICO E TERAPIAS CONVENCIONAIS / BIOLÓGICAS	12
1.3	SUPRESSOR DA SINALIZAÇÃO DE CITOCINAS (SOCS).....	16
1.4	MECANISMOS E FUNÇÕES DE SOCS2	19
1.5	RESPOSTA IMUNOLÓGICA E RESOLUÇÃO NA AIA	21
1.6	MODELO EXPERIMENTAL DE INFLAMAÇÃO ARTICULAR INDUZIDA POR ANTÍGENO	25
2	<u>OBJETIVOS</u>	28
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	<u>MATERIAL E METODOS</u>	29
3.1	ANIMAIS.....	29
3.2	IMUNIZAÇÃO E DESAFIO DA ARTRITE INDUZIDA POR ANTÍGENO	29
3.3	AVALIAÇÃO DE NOCICEPÇÃO MECÂNICA ATRAVÉS DE VON FREY DIGITAL	29
3.4	HISTOLOGIA.....	30
3.5	WESTERN BLOTTING	30
3.6	CITOMETRIA DE FLUXO	31
3.7	MICROSCOPIA INTRAVITAL DA CAVIDADE ARTICULAR.....	33
3.8	ELISA E DOSAGEM DE ANTICORPOS ANTI-MBSA	33
3.9	DOSAGEM DE LIPOXINA A ₄	34
3.10	CULTURA DE ESPLÊNOCITOS	34
3.11	ANÁLISES DE APOPTOSE E EFEROCITOSE DE NEUTRÓFILOS	35
3.12	ISOLAMENTO DE NEUTRÓFILOS E ENSAIO DE QUIMIOTAXIA	35
3.13	ENSAIO DE EFEROCITOSE <i>IN VITRO</i>	36
3.14	CULTURA PRIMÁRIA DE MACRÓFAGOS	36
3.15	EXTRAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES	37
3.16	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
4	<u>RESULTADOS</u>	39
4.1	EXPRESSÃO DE SOCS2 É REDUZIDA DURANTE O PICO DO INFILTRADO CELULAR EM CAMUNDONGOS WT INDUZIDOS COM AIA	39
4.2	A DEFICIÊNCIA DE SOCS2 RESULTA NO PROLONGAMENTO DO PERFIL INFLAMATÓRIO DURANTE A AIA.....	40

4.3	SOCS2 CONTROLA O INFILTRADO CELULAR E DANO NO TECIDO SINOVIAL NA FASE TARDIA DA AIA	43
4.4	A AUSÊNCIA DE SOCS2 NÃO ALTERA A FIBROSE NO TECIDO SINOVIAL.....	47
4.5	A AUSÊNCIA DE SOCS2 ESTÁ ASSOCIADA COM UM MAIOR ACÚMULO DE CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA NA FASE TARDIA DA AIA.....	49
4.6	SOCS2 É IMPORTANTE NO CONTROLE DA ADESÃO DE LEUCÓCITOS DURANTE A FASE TARDIA DA AIA, E ISSO É ASSOCIADO AO CONTROLE DOS NÍVEIS DE CXCL1	51
4.7	CÉLULAS DA IMUNIDADE ADQUIRIDA ESTÃO AUMENTADAS NA FASE TARDIA DA AIA	53
4.8	OS ESPLÊNOCITOS DE CAMUNDONGOS SOCS2 ^{-/-} SÃO MAIS RESPONSIVOS À REESTIMULAÇÃO DO ANTÍGENO.....	55
4.9	SOCS2 REGULA A VIABILIDADE DE NEUTRÓFILOS ATRAVÉS DA APOPTOSE E EFEROCITOSE	56
4.10	MACRÓFAGOS DERIVADOS DA MEDULA SÃO CAPAZES DE EXPRESSAR E LIBERAR SOCS2 ATRAVÉS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES APÓS ESTÍMULO COM LPS	60
5	<u>DISCUSSÃO.....</u>	<u>62</u>
6	<u>CONCLUSÕES</u>	<u>67</u>
	<u>ANEXO I (Aprovação CEUA – Comissão de ética no uso de animais)</u>	<u>69</u>
	<u>ANEXO II (Artigo escrito).....</u>	<u>70</u>
8	<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>71</u>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite Reumatóide

As doenças autoimunes são classificadas como uma desordem da resposta imune contra o próprio corpo, onde estão implicadas mais de 80 desordens inflamatórias. Quando a auto-reatividade “fisiológica” de baixo nível, que é importante para a seleção de linfócitos e homeostase do sistema imune, passa para um nível alto que se manifesta com liberação de autoanticorpos circulantes e de células autoreativas infiltradas no tecido, gera uma autoimunidade patogênica acarretando em lesão tecidual e consequências clínicas (THEOFILOPOULOS; KONO; BACCALA, 2017). A prevalência dessas doenças é de cerca de 7-9% na população mundial, afetando preferencialmente as mulheres, no auge da vida e causam morbidade e mortalidade significativas. Estas doenças são divididas em órgãos específicos, por exemplo, diabetes tipo I, Esclerose Múltipla, doenças inflamatórias intestinais, Miastenia Gravis e sistêmicas como Lúpus Eritematoso Sistêmico, Síndrome de Sjögren e Artrite Reumatoide (AR) (THEOFILOPOULOS; KONO; BACCALA, 2017).

Dentre as várias doenças autoimunes, a AR é denominada uma doença crônica inflamatória das articulações, capaz de causar danos na cartilagem e nos ossos, causando intensa dor, rigidez, inchaço e incapacitação dos membros afetados, além de poder afetar outros órgãos do corpo (CHAUDHARI; RIZVI; SYED, 2016; SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016; VAN DER WOUDE; VAN DER HELM-VAN MIL, 2018). A AR afeta aproximadamente 1% da população mundial, sendo pelo menos o dobro de mulheres em relação aos homens. Embora possa ocorrer em qualquer idade, o pico de incidência é na idade de 50 anos (VAN DER WOUDE; VAN DER HELM-VAN MIL, 2018). Estima-se na América do Sul uma prevalência de 0,48%, tendo o Brasil e Colômbia com as menores taxas de 0,22% e 0,24% respectivamente (GERMANO *et al.*, 2020). No entanto, na fisiopatologia da AR ainda não se sabe a forma como a autoimunidade sistêmica avança para a inflamação articular (CATRINA *et al.*, 2017).

Estudos têm sugerido que a AR é um distúrbio heterogêneo causado por uma resposta autoimune anormal desencadeada pelas complexas interações de fatores genéticos e não genéticos como: (A) Fatores de risco genéticos (60% do risco) que incluem genes de susceptibilidade, por exemplo, o antígeno leucocitário humano, HLA-DRB1, que são receptores de superfície para o

complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, importantes na apresentação de antígeno; proteínas importantes na função da célula T como a proteína tirosina fosfatase não receptora do tipo 22 (PTPN22), proteína associada ao linfócito T citotóxico – 4 (CTLA-4), receptor C-C da quimiocina 6 (CCR6), e o Cluster de diferenciação 40 (CD40) nas células B, e outros genes, bem como as modificações epigenéticas; (B) Fatores de risco não genéticos (40% do risco), que incluem infecções (*Prevotella copri*, *Epstein barr vírus*), tabagismo, inalação de poeira (cimento pulverizado, sílica, amianto, fibras de vidro e outros), alterações na microbiota e alimentação (ALETAHA; SMOLEN, 2018; VAN DER WOUDE; VAN DER HELM-VAN MIL, 2018; ZAMANPOOR, 2019).

A inflamação gerada na AR é caracterizada pela infiltração da membrana sinovial, onde os sintomas são consequências do estado de ativação e da grande quantidade de leucócitos infiltrados nas articulações sinoviais inflamadas. Dentre eles, podem-se citar os granulócitos, os macrófagos, os linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B (MCINNES; SCHETT, 2011). Estes leucócitos secretam citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina (IL)-17, IL-6 e IL-1 β , quimiocinas e diferentes proteases que são os principais mediadores contribuintes para a manutenção e progressão da AR (MCINNES; SCHETT, 2011). Essas citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF e IL-6, são capazes de ativar fatores importantes que medeiam sinais e sintomas da doença, incluindo dor, edema, e degradação de cartilagem e óssea, como é o caso das moléculas como o ativador do receptor do fator nuclear κ B ligante (RANKL), prostaglandinas e metaloproteinases de matriz. A estimulação por RANKL, TNF e IL-6 gera osteoclastos dentro da membrana sinovial e promove danos ósseos. Esses eventos moleculares e celulares resultam na expressão clínica da doença. Todo esse processo inflamatório é precedido pela ativação de células endoteliais que irão participar atividade do início da resposta inflamatória, bem como promover neovascularização (crescimento de novos vasos sanguíneos). A expansão de células sinoviais (sinoviócitos símile a fibroblasto – FLS) e macrófagos formam uma camada de revestimento sinovial hiperplásica. Essa membrana sinovial expandida e contendo um excessivo acúmulo de leucócitos é chamada de “*pannus*”, o qual invade o osso periarticular gerando erosões ósseas e degradação da cartilagem (ALETAHA; SMOLEN, 2018).

Os FLSs no revestimento sinovial também desempenham um papel fundamental ao produzir citocinas, que perpetuam a inflamação, e mediante a secreção de proteases que contribuem para a destruição da cartilagem. Os FLS na AR desenvolvem um fenótipo agressivo, que aumenta

a invasividade na matriz extracelular e agrava ainda mais o dano articular. Recentes avanços na compreensão da biologia da FLS mostraram que eles são capazes de regular respostas imunes inatas e adaptativas, expressão de integrinas como a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e alfa4-beta1, e a ativação de mecanismos de sinalização intracelular. Isso mostra também a importância dessas células na progressão do processo inflamatório (BARTOK; FIRESTEIN, 2010).

1.2 Diagnóstico e Terapias convencionais / biológicas

Os critérios de classificação da AR incluem o histórico das manifestações clínicas e os exames físicos realizados. Exames complementares como os testes sorológicos (fator reumatoide e níveis de anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos / anti-CCP) e exames por imagem, como radiografias e ressonância, corroboram com o desfecho clínico. Outros exames e estratégias podem ser usados para o diagnóstico de pacientes que apresentam artrite, afim de discriminar características inconclusivas referentes a outras patologias (ALETAHA; SMOLEN, 2018).

O desenvolvimento da AR pode afetar 1 ou algumas articulações. A inflamação na articulação se desenvolve gerando expansão do tecido mole intra-articular, com hipervascularização da membrana sinovial, e até a inflamação de tendões (tenossinovite) (ALETAHA; SMOLEN, 2018). Muitos diagnósticos vem mostrando avanços promissores na investigação da AR, através da identificação de genes associados com o desenvolvimento da doença, utilizando genômica funcional, e através de biomarcadores de auto-anticorpos anti-proteínas que sofreram modificações pós-traducionais (DING; OROZCO, 2019; KALINKOVICH; GABDULINA; LIVSHITS, 2018).

A abordagem atual para o tratamento da AR inclui intervenção precoce o quanto antes com o objetivo de atingir baixa atividade ou mesmo remissão da doença. Por ser uma doença crônica, as terapias hoje disponíveis controlam a sintomatologia da doença e suas consequências, impedindo a progressão das deformidades articulares. Além disso, a equipe médica busca prevenir ou tratar o acometimento de outros órgãos afetados pelo desenvolvimento da AR (SILVAGNI *et al.*, 2019).

O alvo das terapias é alcançar a remissão ou um estado de pelo menos baixa atividade da doença. Atualmente, existe hoje uma variedade de terapias médicas e alternativas para controlar a progressão da AR. As principais classes de drogas utilizadas são: drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs), antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), glicocorticóides,

e os imunobiológicos (CHATZIDIONYSIOU *et al.*, 2017). Novas drogas têm melhorado o arsenal terapêutico dos reumatologistas, fornecendo novas opções para os pacientes ao longo dos anos de pesquisas e descobertas (BORTOLUZZI *et al.*, 2018).

Dentre as terapias de primeira linha, o metotrexato é o DMARD mais comumente utilizado que vem sendo utilizado como terapia na AR, podendo incluir a combinação com glicocorticóide, bloqueando a ação de enzimas e proteínas importantes na viabilidade das células imunes, inibindo, assim, o processo inflamatório da AR (CRONSTEIN; AUNE, 2020). No entanto, estudos apontam que 40% a 50% dos pacientes alcançam remissão ou, pelo menos, baixa atividade da doença frente ao tratamento com o uso dos DMARDs. Além disso, essas drogas apresentam vários efeitos tóxicos gerando nodulose reumatoide, fibrose hepática, imunossupressão com predisposição a infecções oportunistas como Epstein Barr (ALETAHA; SMOLEN, 2018; CRONSTEIN; AUNE, 2020). Quando as terapias envolvendo DMARDs não apresentam grande eficiência ou melhoras nos sintomas, a aplicação de terapias direcionadas (Figura 1 e Tabela 1), como os imunobiológicos (por exemplo, inibidores de TNF) ou inibidores da Janus quinase (JAK) em combinação com o metotrexato, mostraram proporcionar até 75% desses pacientes afim de atingir o alvo de tratamento (ALETAHA; SMOLEN, 2018).

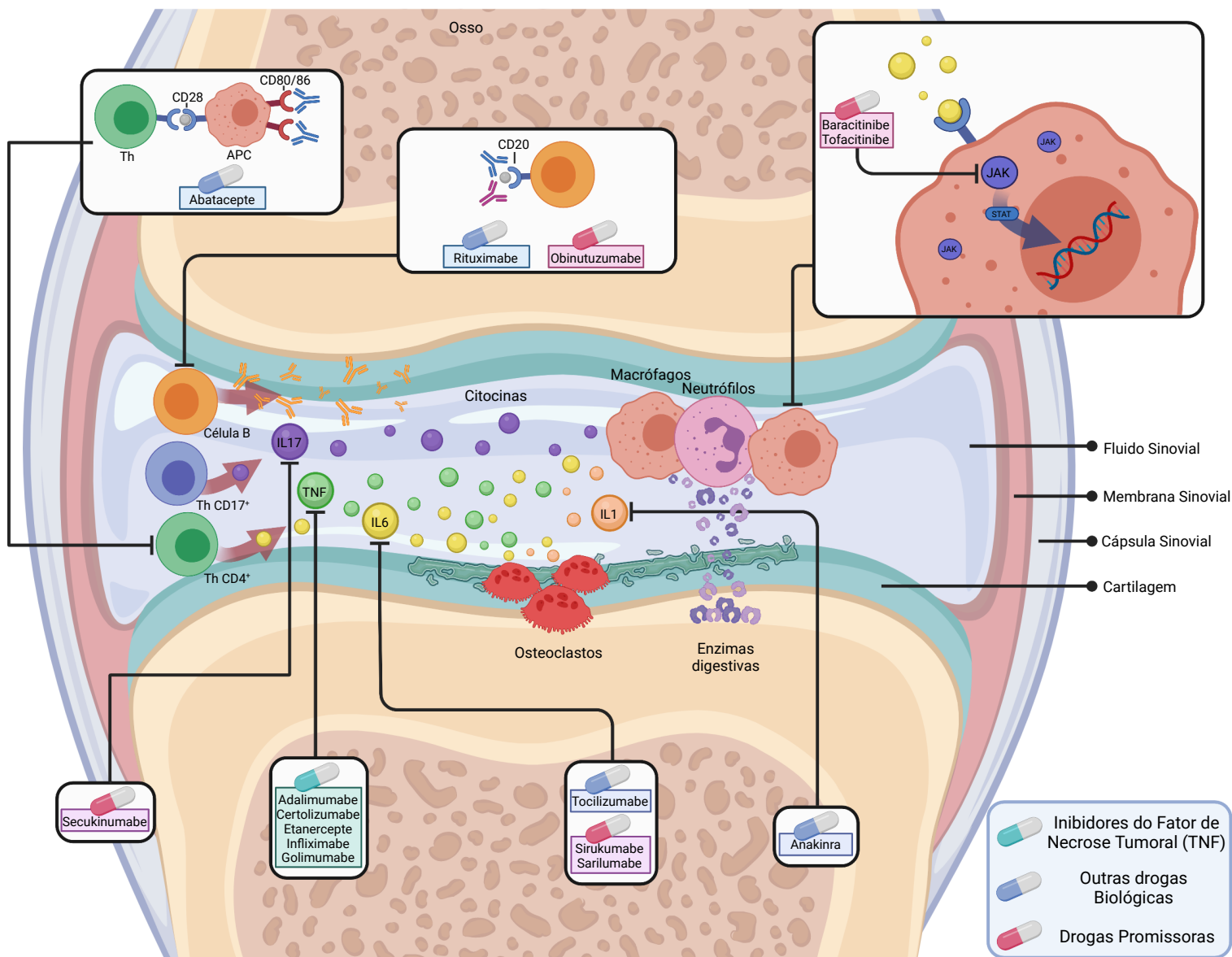


FIGURA 1 – A descoberta de novas drogas para doenças autoimunes e para a Artrite Reumatóide. Na AR a falha no sistema imune permite com que algumas células T e B reconheçam proteínas na cavidade articular como estranhos. Os leucócitos infiltram a cavidade articular e liberam moléculas e citocinas. Células B produzem anticorpos como fator reumatóide tendo como alvo as articulações. Citocinas pró inflamatórias recrutam e primam outras células imunes, incluindo neutrófilos e macrófagos. Essas células liberam enzimas digestivas, que contribuem para o dano articular e erosão óssea, promovendo o espessamento da membrana sinovial. A erosão óssea é causada pela sinalização das citocinas que promovem intensa atividade dos osteoclastos. Adaptado de (LAWRENCE, 2016).

Terapias Biológicas	Ação
Inibidores de TNF	Inibem a citocina pró inflamatória TNF.
Tocilizumabe, Sirukumabe e Sarilumabe	Inibem a citocina pró inflamatória IL-6.
Secukinumabe	Inibe a citocina pró inflamatória IL-17.
Baracitinibe e Tofacitinibe	Inibem as proteínas Janus quinases, que participam da sinalização dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT).
Anakinra	Inibe a citocina pró inflamatória IL-1.
Rituximabe e Obinutuzumabe	Inibem o receptor CD20 na superfície das células B, levando a depleção.
Abatacepte	Inibem os receptores CD80/CD86 nas superfícies das células apresentadoras de antígeno (APC), prevenindo a ativação das células T helper.

Tabela 1 – A descoberta de novas drogas para doenças autoimunes e para a Artrite Reumatóide. Os medicamentos anti-reumáticos modificadores da doença oral (DMARDs), a base do tratamento da artrite reumatóide, foram os primeiros medicamentos disponíveis que afetaram o sistema imunológico. Mas nos últimos quinze anos, novas terapias biológicas chegaram ao mercado, que visam inibir moléculas específicas do sistema imunológico. Novas moléculas pequenas também estão em desenvolvimento que têm como alvo a sinalização imune intracelular. Adaptado de (LAWRENCE, 2016).

Nos últimos anos, drogas recém utilizadas no tratamento da AR, como o Tofacitinibe (inibidor da via JAK na sinalização de citocinas) mostraram que a utilização como monoterapia com duração ≤ 24 meses ou combinada com um DMARD, têm sido eficazes na redução de sinais e sintomas da doença, com melhora na qualidade de vida relacionada à saúde, com benefícios sustentados durante a terapia de longo prazo (≤ 96 meses) (CAPORALI; ZAVAGLIA, 2019). Vários inibidores de JAK têm funcionado com sucesso na terapia clínica. Estes incluem tofacitinibe direcionado a JAK1, JAK2 e JAK3 em RA, artrite psoriática e colite ulcerativa, baricitinibe direcionado a JAK1 e JAK2 em RA e o inibidor seletivo de JAK1 upadacitinibe para RA (CHOY, 2019; GADINA *et al.*, 2018; HARRINGTON; AL NOKHATHA; CONWAY, 2020). Apesar dos benefícios, os inibidores de JAK alteram a resposta imune e aumentam o risco de infecções

bacterianas, fúngicas e virais, incluindo infecções oportunistas como tuberculose e herpes zoster (DHILLON, 2017; KUBLER, 2014). Um estudo comparativo de drogas seletivas para JAK2 mostrou que são capazes de inibirem outras quinases, além de apresentarem efeitos clínicos divergentes em determinadas células e tecidos (SINGER *et al.*, 2019). Por isso, faz-se necessário compreender melhor os efeitos adversos na inibição geral das JAKs (Janus 1, 2, 3 e TK2) bem como elucidar as proteínas que são capazes de atuar inibindo essa via de forma mais seletiva.

1.3 Supressor da sinalização de citocinas (SOCS)

Citocinas são proteínas secretadas que regulam respostas celulares importantes, onde os primeiros estudos observavam seu papel na proliferação e diferenciação celular (STARR *et al.*, 1997). No entanto, hoje se sabe que as citocinas afetam quase todos os processos biológicos, desde o desenvolvimento embrionário, como a patogênese de doenças infecciosas ou estéreis, em alterações nas funções cognitivas e progressão dos processos degenerativos do envelhecimento (DINARELLO, 2007). Os eventos chave na transdução de sinal de citocinas até o final do séc. XX já estavam bem definidos, principalmente com a identificação de seus receptores. As vias de sinalização são variadas entre as citocinas. Particularmente, um grupo de citocinas transduzem o sinal através da ativação de membros da família de tirosinas quinases citoplasmáticas como as Janus Associado a Quinases (JAKs). Após a ativação das JAKs, os Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (STATs) são fosforilados, dimerizam-se e aumentam a transcrição de genes com locais de reconhecimento STAT nos seus promotores (KIU; NICHOLSON, 2012; O'SHEA; GADINA, 2019).

Mecanismos endógenos regulam negativamente a sinalização JAK/STAT, como um controle de “desligamento” da transdução da sinalização das citocinas envolvidas (KIU; NICHOLSON, 2012; O'SHEA; GADINA, 2019). Através do estudo de Star e colaboradores em 1997 é que se teve conhecimento de um dos mecanismos que envolvia três formas homólogas de proteína contendo domínio SH2 induzida por citocina (CIS - *Cytokine Inducible SH2 containing protein*), sendo elas denominadas como proteína supressora da sinalização de citocinas (SOCS). A família SOCS, é constituída por oito membros, SOCS-1 a SOCS-7 e CIS (LARSEN; RÖPKE, 2002) (FIGURA 2).

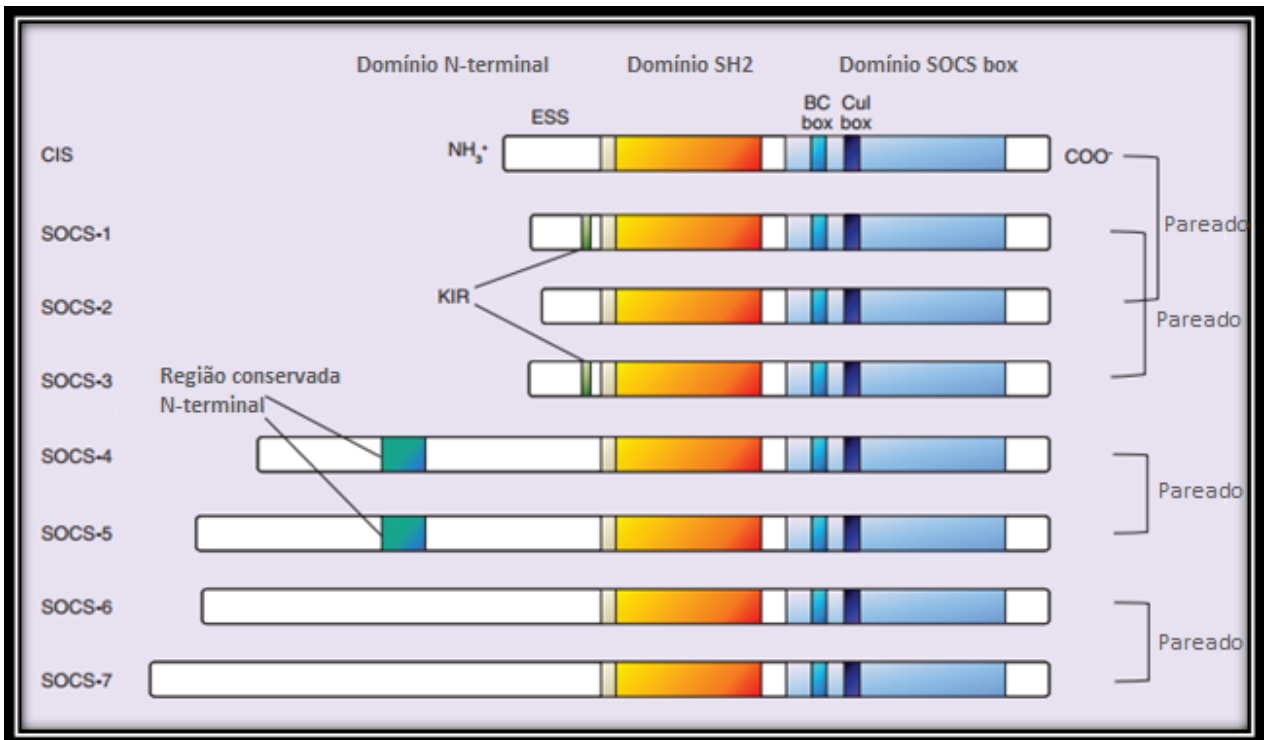


Figura 2. Estrutura molecular das 8 proteínas SOCS descritas na literatura. As proteínas da família SOCS consistem em três domínios estruturais e funcionais que são: um domínio N-terminal com comprimento variável de sequências de aminoácidos, um domínio SH2 central com um domínio SH2 estendido (ESS) e um domínio de caixa SOCS contendo uma caixa BC e uma caixa Cul na região C-terminal. Dois membros da família SOCS poderiam ser pareados devido à sua estrutura e similaridade de função. SOCS-1 e SOCS-3 possuem uma região inibidora de quinase (KIR) que inibe a atividade da proteína JAK. SOCS-4 e SOCS-5 contêm ambos uma região altamente conservada dentro do seu domínio N-terminal designado como região N-terminal conservada. SOCS-6 e SOCS-7 partilham mais do que 50% de identidade de aminoácidos no domínio SH2 e domínio de caixa SOCS. (Adaptado de (FENG *et al.*, 2016; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007)).

Através da investigação da expressão de SOCS-1, Star e colaboradores observaram que esta proteína inibia tanto a fosforilação do receptor de IL-6, como a ativação de STAT, e que a transcrição dos outros três genes (SOCS 2, 3 e CIS) eram aumentadas rapidamente em resposta à IL-6, *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que essas proteínas podiam atuar num circuito de retroalimentação negativa clássica, para reduzir a transdução de sinal via IL-6 (STARR *et al.*, 1997). Diante disso, foi possível compreender que a ativação da via JAK-STAT também promove a transcrição de proteínas SOCS que podem suprimir a sinalização e restaurar a sensibilidade da célula a futuros estímulos por citocinas (FIGURA 3) (UREN *et al.*, 2014). Membros da família SOCS participam de loops de *feedback* negativo clássico que suprimem a via JAK-STAT inibindo

a atividade JAK ou promovendo a ubiquitinação dos componentes de sinalização na cascata (YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007).

A função após a transcrição e enovelamento das proteínas SOCS foi demonstrada através de três mecanismos diferentes de ação: i) através do domínio SH2, eles se ligam a fosfotirosinas na proteína alvo, conduzindo à inibição da transdução de sinal por inativação N-terminal de JAK; ii) bloqueando o acesso de STAT aos receptores; e iii) atuando como uma ligase de ubiquitina E3, permitindo a poliubiquitinação de proteínas alvos e sua degradação via proteassoma (LARSEN; RÖPKE, 2002; LETELLIER, ELISABETH; HAAN, 2016; UREN *et al.*, 2014). Portanto, as proteínas SOCS foram primeiramente descritas como supressoras da sinalização de citocinas e de fatores de crescimento, onde a desregulação desses fatores vem sendo associada a uma variedade de doenças inflamatórias e neoplásicas (LETELLIER, ELISABETH; HAAN, 2016).

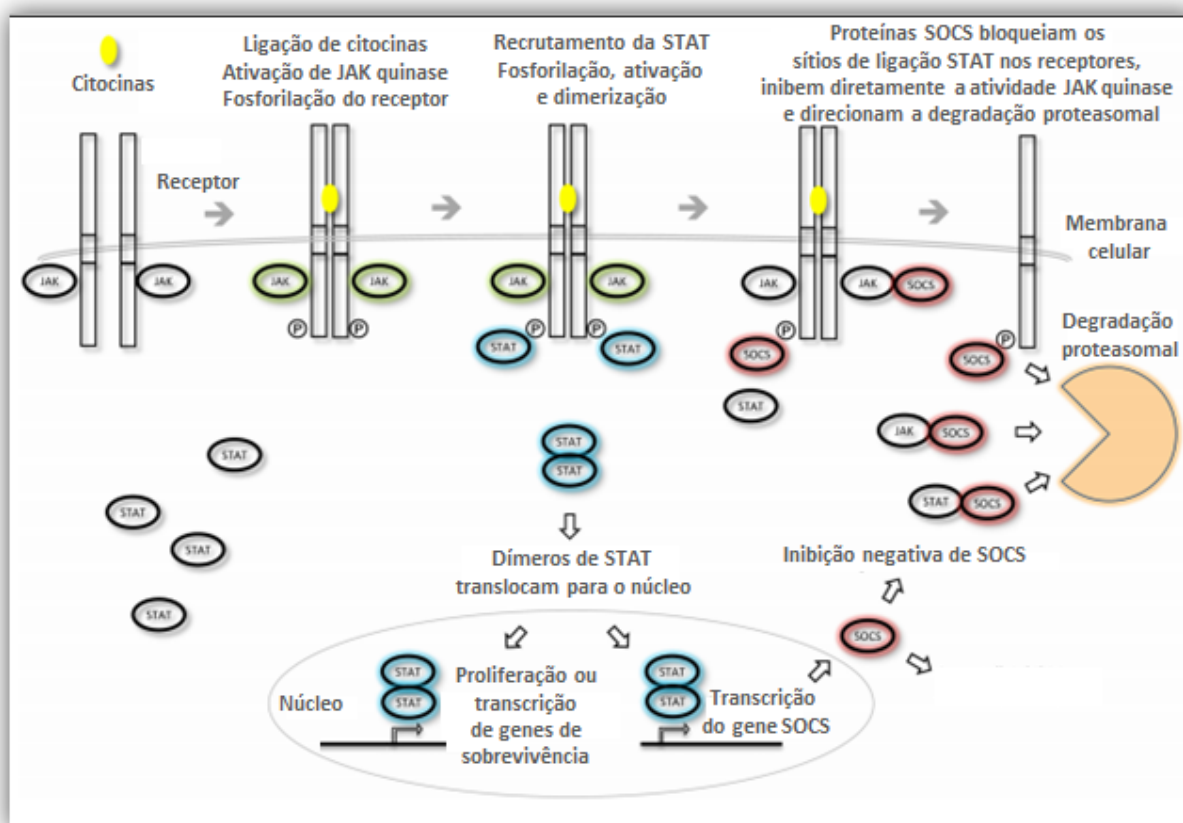


Figura 3. Processos de inibição da sinalização de citocinas por proteínas SOCS. As proteínas SOCS podem atuar como inibidores clássicos de “*feedback*”. As citocinas sinalizam por aproximação dos receptores e das JAKs, iniciando uma cascata de fosforilação. Isto resulta na fosforilação e dimerização das STATs, que translocam para o núcleo e iniciam a transcrição do gene. Além de genes envolvidos na sobrevivência, proliferação e função, as STATs iniciam a transcrição de SOCS. Há quatro maneiras

principais pelas quais SOCS inibem a sinalização de citocinas; bloqueando o recrutamento de STATs para o receptor de citocinas; direcionando o receptor para a degradação pelo proteassoma; ligação à JAKs e inibição direta da sua atividade quinase; direcionando as JAKs para degradação pelo proteassoma. (Adaptado de UREN, TURNLEY, 2014).

1.4 Mecanismos e funções de SOCS2

A proteína SOCS2 é ativada por diversos fatores que ativam a STAT5, sendo eles a estimulação de receptores do tipo Toll (TLR – *toll-like receptors*) (POSSELT *et al.*, 2011), hormônios (hormônio do crescimento (GH), prolactina, insulina, estrogênio), algumas citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-10, IL-6, IFN- α , IFN- γ , TNF, dentre outras), e outros mediadores como 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin-TCDD) e lipoxinas (RICO-BAUTISTA; FLORES-MORALES; FERNÁNDEZ-PÉREZ, 2006).

Além de seu papel de supressor, SOCS2 apresenta diversas funções biológicas e é descrito ser importante no controle do desenvolvimento de patogêneses relacionadas a várias doenças, principalmente infecciosas. Uma das primeiras informações obtidas sobre SOCS2, além de ser um supressor de sinalização de citocinas, foi seu papel no sistema nervoso central (SNC). Pesquisadores identificaram que SOCS2 apresentava uma expressão elevada no SNC desde o 14º dia embrionário até o 8º dia pós-natal e que, após esse período, a sua expressão era reduzida. Essa expressão foi observada exclusivamente em neurônios, no momento da diferenciação neuronal, associada à fase de desenvolvimento (POLIZZOTTO; BARTLETT; TURNLEY, 2000). Estudos posteriores também mostraram que SOCS2 tem um papel importante nos efeitos inibitórios do hormônio GH e do fator de crescimento insulina-1 (IGF1) e promoção da neurogênese (RANSOME; TURNLEY, 2005). De fato, camundongos SOCS2^{-/-}, apresentam características do fenótipo de crescimento elevado, confirmando que a deficiência dessa proteína afeta o crescimento pré-natal e pós-natal através da desregulação de GH/IGF1 (HORVAT; MEDRANO, 2001; METCALF *et al.*, 2000). Além disso, SOCS2 já demonstrou exercer um papel crucial no desenvolvimento de alguns tipos de câncer onde, a ausência da expressão de SOCS2 inibe a proliferação de células cancerígenas de próstata, o que foi associada à parada do ciclo celular e à apoptose (HOEFER *et al.*, 2014). Outros achados, mostraram que a expressão reduzida de SOCS2, estava associada a metilações em regiões promotoras do seu gene, correlacionando-se ao

desenvolvimento de carcinoma coloretal e hepatocelular (CUI *et al.*, 2016; LETELLIER, E. *et al.*, 2014).

Além do papel de SOCS2 intrinsecamente associado à regulação de processos fisiológicos, nosso grupo vem demonstrando que SOCS2 também possui um papel modulador frente a diferentes contextos que envolvem infecções, inflamações estéreis e no desenvolvimento da obesidade através da regulação da resposta imunológica (BRANT *et al.*, 2016; CRAMER *et al.*, 2019; MONTI-ROCHA *et al.*, 2019; VAL *et al.*, 2020). Recentemente, nosso grupo avaliou o papel de SOCS2 frente a atividade dos neutrófilos durante falência hepática causada por sobredose de paracetamol (APAP), onde camundongos deficientes de SOCS2 apresentaram maior infiltrado de neutrófilos na lesão, gerando maior necrose precoce e letalidade nos camundongos, demonstrando que SOCS2 tem um papel importante na imunidade inata e no desenvolvimento da doença (MONTI-ROCHA *et al.*, 2019).

Além da resposta inflamatória, SOCS2 apresenta um papel fundamental na resposta anti-inflamatória e no controle da expansão de células T, sendo crucial na estabilidade de células T reguladoras (Treg). Análises identificaram que SOCS2 é preferencialmente expresso tanto em células Tregs naturais como em Tregs induzíveis (iTregs). Além disso, células Treg deficientes de SOCS2 possuem instabilidade na expressão do fator de transcrição *forkhead box P3* (FoxP3) e, quando estimuladas com IL-4, secretam níveis elevados de interferon γ (IFN- γ) e IL-13, sugerindo que SOCS2 é essencial para manter o fenótipo anti-inflamatório de iTregs, impedindo a secreção elevada de citocinas pró-inflamatórias por essas células (KNOSP *et al.*, 2013).

Há poucos estudos que associam a função de SOCS na AR. Pacientes com AR apresentaram alteração da expressão de algumas proteínas SOCS (1, 2 e 3) em células mononucleares derivadas do sangue (PBMCs) e em macrófagos obtidos do líquido sinovial (ISOMÄKI *et al.*, 2007a). Ainda, pacientes tratados com anti-TNF apresentam uma redução da expressão de SOCS2 em PBMCs, sugerindo que TNF possa ter um papel na regulação de SOCS2 (TSAO; KUO; LIN, 2008). Assim, sabe-se muito pouco sobre o papel de SOCS2 e suas bases moleculares durante o desenvolvimento da AR. Por isso se faz necessário uma melhor compreensão sobre SOCS2 no contexto da AR e em modelos experimentais relacionados, como sua influência na progressão da inflamação, dano e dor das articulações.

1.5 Resposta imunológica e resolução na AIA

No modelo de AIA, após a imunização com antígeno mBSA, as células dendríticas e células T apresentam um papel importante na apresentação do antígeno e na memória imunológica, quando o desafio intra-articular com esse antígeno induz uma resposta inflamatória articular (BRACKERTZ; MITCHELL; MACKAY, 1977; WONG *et al.*, 2006). Estudos têm demonstrado que após o desafio intra-articular, o acúmulo de leucócitos no tecido, tendo os neutrófilos como as células principais, é fundamental para a ocorrência das lesões articulares na AIA. O acúmulo de neutrófilos contribui para a patogênese no modelo, desencadeado por uma inflamação neutrofilica rápida intensa observada durante as primeiras 24 horas. Em tempos tardios, principalmente após 48 horas do desafio intra-articular, ocorrem sinais evidentes da resolução da inflamação articular (BARROSO *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2011).

Os fatores quimiotáticos são cruciais durante a inflamação articular, onde altos níveis das quimiocinas (motivo C-X-C) ligante 1 (CXCL1), CXCL5 e de leucotrieno B4 (LTB4) são observados nas articulações de camundongos desafiados com mBSA, o qual promovem a migração de neutrófilos que induz o recrutamento sinovial de leucócitos, gerando uma hiperplasia sinovial e perda de proteoglicanos da cartilagem articular (BESSIS *et al.*, 2017; FATTORI; AMARAL; VERRI, 2016; GRESPAN *et al.*, 2008).

Essas células são recrutadas por quimiocinas envolvidas em vários aspectos dos processos da inflamação articular. As quimiocinas promovem a infiltração e ativação de leucócitos, angiogênese, diferenciação de osteoclastos e proliferação, além da ativação de sinoviócitos e participação da geração de dor ao regular a liberação de neurotransmissores (BERNARDINI *et al.*, 2017).

Acredita-se que os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias sejam responsáveis por impulsionar a progressão da inflamação articular sinovial. As citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-6, IL-1 e CXCL1 não só promovem e mantêm a inflamação, como também contribuem para a geração e manutenção da dor inflamatória, atuando nas células nervosas nociceptivas (SACHS *et al.*, 2011a; SCHAIBLE *et al.*, 2010). Um estudo do nosso grupo demonstrou que o bloqueio de TNF (infleximab) e o uso de antagonista dos receptores de IL-1 é capaz de prevenir o influxo de neutrófilos e hipernocicepção durante a AIA (SACHS *et al.*, 2011a).

Além dessas citocinas, foi demonstrado que níveis aumentados de outras citocinas como IL-8, IL-12 / IL-23, IL-17, IL- 18, IL-32 e IFN- γ são importantes na progressão da doença e outras importantes na regulação da inflamação como IL-4, IL-9 e IL10 (CIOBANU *et al.*, 2020; LUBBERTS; BERG, 2013; RAUBER *et al.*, 2017). Dentre algumas citocinas (IL-12/IL-23, IL-6, IFN- γ , IL-4, IL-9, IL10), a via de sinalização são baseadas através da ativação de várias vias de transdução de sinal, incluindo a JAK / Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (JAK / STAT), e outras que regulam numerosas respostas celulares onde influenciam o crescimento celular, sobrevivência, apoptose, defesa do hospedeiro, estresse e funções de diferenciação (DARNELL; KERR; STARK, 1994; LEVY; DARNELL, 2002; SEIF *et al.*, 2017). Essas citocinas estão envolvidas na patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias, e usam JAKs e STATs para transduzir sinais intracelulares, onde muitas dessas doenças tem sido associados a um descontrole na ativação ou uma incapacidade de supressão nessas vias (BANERJEE *et al.*, 2017a; SALAS *et al.*, 2020; VILLARINO; KANNO; O'SHEA, 2017).

Os reguladores negativos de STATs incluem tirosina fosfatases citoplasmáticas que neutralizam a ação da Janus quinase (JAK) e SOCS que inibem o receptor e a função JAK, proteínas que inibem as proteínas STAT ativadas (PIAS), fosfatases nucleares que desativam STATs e proteínas STAT truncadas que podem funcionar em um modo inibitório dominante, afim de bloquear a sinalização e o processo inflamatório, levando a homeostase celular (LEVY; DARNELL, 2002).

Os medicamentos atuais para o manejo clínico de doenças inflamatórias atuam inibindo enzimas específicas, antagonizando receptores específicos ou bloqueando seus ligantes (caracterizados como medicamentos anti-inflamatórios), como falado anteriormente como o uso dos DMARDs e dos Biológicos como os inibidores de JAK/STAT. Porém, na última década, um novo paradigma sobre a compreensão do processo inflamatório emergiu com a apreciação dos mecanismos genéticos, moleculares e celulares que estão envolvidos para resolver ativamente a inflamação, chamado de mediadores resolutivos (resolução) (PERRETTI *et al.*, 2015). Os sinais cardinais da resolução da inflamação envolvem a limitação ou cessação do extravasamento de células sanguíneas, a contra-regulação de quimiocinas e citocinas, o desligamento das vias de sinalização associadas à sobrevivência de leucócitos, a indução de apoptose de leucócitos e sua subsequente remoção por eferocitose por macrófagos, a reprogramação de macrófagos de classicamente ativado para células ativadas alternativamente, o retorno de células não apoptóticas

para a vasculatura ou linfa e, finalmente, o início dos processos de reparo tecidual/homeostase (SUGIMOTO, MICHELLE A. *et al.*, 2016). Os agentes pró-resolutivos são de natureza diversa e incluem mediadores lipídicos especializados (lipoxinas, resolvinas, protectinas e maresinas), proteínas (anexina A1, galectinas) e peptídeos, mediadores gasosos, incluindo sulfeto de hidrogênio, uma purina (adenosina), bem como liberação de neuromodulador sob o controle do nervo vago (HEADLAND; NORLING, 2015; SUGIMOTO, MICHELLE A. *et al.*, 2016).

Uma resposta inflamatória montada de forma eficaz também implicará na ativação de vias pró-resolutivas, destinadas a encerrar com segurança a resposta inflamatória "limpando" o tecido lesado e promovendo a cura. Já uma resposta inflamatória desregulada, ou uma falha nas vias pró-resolutivas podem estender o tempo nas respostas pró-inflamatórias resultando em inflamação prolongada (sem resolução) ou crônica, podendo gerar o desenvolvimento de doenças (PERRETTI *et al.*, 2015, 2017). Além disso, a diferença dos efeitos anti-inflamatórios e pró-resolutivos não se sobrepõem totalmente: o anti-inflamatório refere-se principalmente a uma ação inibitória / bloqueadora (por exemplo, interromper o extravasamento de células imunes, como na inflamação aguda), enquanto que pro-resolutivos as ações indicam uma estimulação e ativação inerentes de processos específicos, como apoptose ou eferocitose (SUGIMOTO, MICHELLE A. *et al.*, 2016). No contexto terapêutico, a farmacologia clássica da inflamação visa 'bloquear ou inibir', mediadores específicos que, quando produzidos em excesso, são responsáveis por danos aos tecidos (por exemplo, TNF e prostaglandinas). Já a farmacologia da resolução é baseada na estratégia que visa em 'ativar ou intensificar' processos celulares que participam na limitação ou prevenção de danos, como a eliminação de células apoptóticas evitando o dano (eferocitose) (Figura 2) (PERRETTI *et al.*, 2015).

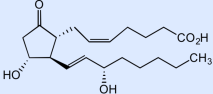

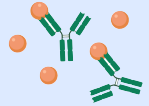
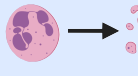
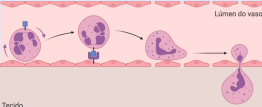
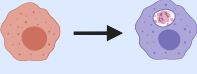
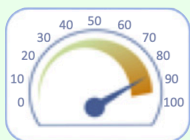
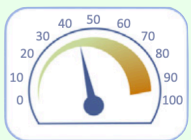
	Farmacologia da Inflamação	Farmacologia da Resolução
Classes	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Glicocorticóides ◆ NSAIDs ◆ Biológicos ◆ Metotrexato ◆ Colchicina ◆ DMARDs ◆ Ciclosporina ◆ Antagonistas H1 ◆ Cromonas ◆ Drogas Lukast 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Anexina A1 ◆ Melanocortinas ◆ Galectinas ◆ Quemerinas 15 ◆ Somatostatinas ◆ Derivados ω-3: resolvinas, protectinas, maresinas ◆ Lipoxina A4 ◆ Adenosina ◆ Canabinóides
Ações	Inibição da síntese de Prostaglandina  Diclofenaco Ibuprofeno (Etc.)	Aumento da apoptose e eferocitose  α MSH Anexina A1 Resolvin D1
	Bloqueio de citocinas  Infliximabe Anakinra Tocilizumabe	Indução da apoptose de neutrófilos  LXA4 Inibidor de CDK HDACIs
	Inibição da migração de leucócitos  Natalizumabe	Mudança no perfil de macrófagos  Resolvin D1 Anexina A1
Mecanismo de ação	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Baseado na “inibição” ✓ Ações dirigidas ✓ Forte Inibição (80-90%) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Baseado na “ativação” ✓ Ações amplas ✓ Modulação (40-50%) 
Efeitos Colaterais	<ul style="list-style-type: none"> ● Imunossupressor ● Resolução tóxica ● Compensação / Tolerância 	<ul style="list-style-type: none"> ● Desconhecido

FIGURA 2 – Os efeitos da farmacologia da inflamação e da farmacologia da resolução. Os mediadores pró-resolutivos mostram diferença fundamental aos anti-inflamatórios, onde exercem ações amplas em vez de causar, por exemplo, inibição em um mediador ou via selecionada, que pode causar um efeito colateral secundário. Além disso, as ações das moléculas pró-resolução equilibram as respostas para atingir o equilíbrio entre as ações pró e anti-inflamatórias. A resolução preserva a resposta inflamatória, trazendo reparo e preservando os tecidos, sendo isentos de efeitos colaterais importantes. Por isso se faz necessário buscar novas moléculas resolutivas e testar a eficácia dessas moléculas em ensaios clínicos adequados. Legenda: Inibidor de flavopiridol / histona desacetilase (HDACI); Inibidor da quinase dependente de ciclina (CDK). Adaptado de (PERRETTI *et al.*, 2015).

A resolução da inflamação depende da interrupção do recrutamento de neutrófilos, que são cruciais no desenvolvimento da AIA. Este processo é em parte controlado por mediadores lipídicos pró-resolutivos, onde há uma mudança de classe da produção de pró-inflamatórios (como PGE2 e

LTB4) para os pró-resolutivos, como prostaglandina D2, 15 desoxi-delta- (12-14) -prostaglandina J2, lipoxina A₄ (LXA₄), resolvina E1 (RvE1), protectinas D1 e maresina-1. Esses mediadores podem bloquear o recrutamento de neutrófilos, parcialmente pela regulação negativa de seus receptores de quimiocinas, tornando-os não responsivos a substâncias ativadoras de neutrófilos, como LTB4 e CXCL1 (ARNARDOTTIR *et al.*, 2016; GODSON *et al.*, 2000a; SCHETT; NEURATH, 2018).

O processo de resolução requer a remoção de neutrófilos do tecido através da apoptose que se dá pela expressão de ligantes de morte celular, como TRAIL ou FasL, que são produzidos por macrófagos, e também pelo fator de crescimento transformador beta (TGFβ), produzido pelas células Treg. Os neutrófilos apoptóticos são rapidamente engolfados por macrófagos pelo processo de eferocitose, através da expressão de fatores “coma-me” como fosfatidilserina em neutrófilos apoptóticos (SCHETT; NEURATH, 2018).

Diversas descobertas recentes de moléculas pró resolutivas, tem demonstrado ser importante na cessação da inflamação em modelos de AR experimental. O papel da citocina IL-9 que promove resolução da inflamação e proteção óssea, via proliferação de células linfoides inata do tipo 2 (ILC2) e ativação de células T reg (RAUBER *et al.*, 2017). Angiotensina 1-7 (Ang1-7) no pico da inflamação promove a resolução, um efeito associado à apoptose de neutrófilos dependente de caspase e à inibição de NF-κB, além de aumentar a capacidade de eferocitose de macrófagos (BARROSO *et al.*, 2017).

Nesse contexto de resposta resolutiva, nosso grupo demonstrou que SOCS2 é importante modulando as ações resolutivas de LXA₄ durante modelo experimental de infecção por *T. gondii* (MACHADO *et al.*, 2006). Portanto, a hipótese desse projeto é que SOCS2 tem um papel crucial na modulação da resposta inflamatória da articulação, participando tanto nas fases iniciais quanto da resolução da inflamação utilizando um modelo de inflamação articular aguda em camundongos.

1.6 Modelo experimental de inflamação Articular Induzida por Antígeno

Os modelos experimentais em animais, vem ajudando ao longo dos anos a investigar mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento, progressão e resolução da inflamação. Os modelos animais mimetizam certas particularidades da AR, com histórico comprovado de previsibilidade de eficácia em humanos, dois modelos são bastante utilizados: a artrite induzida

por colágeno (CIA) e o modelo de inflamação articular que se denomina na literatura como artrite induzida por antígeno (AIA), utilizando como antígeno a albumina metilada (mBSA). A CIA envolve violação da tolerância imunológica, resultando em artrite sistêmica causada por autoanticorpos, enquanto o AIA resulta em erupções inflamatórias de resolução local e danos mediados por células T articulares (GRÖTSCH; BOZEC; SCHETT, 2019; JONES *et al.*, 2018). Outros modelos experimentais recentes, também vem sendo utilizados na pesquisa, como: o modelo K/BxN, que produz auto-anticorpos anti-GPI induzindo inflamação específica das articulações; o modelo de artrite induzida por anticorpos de colágeno (CAIA), usando anticorpos monoclonais específicos para CII; e o modelo de TNF-TG aonde camundongos transgênicos que superexpressam a citocina TNF desenvolvem poliartrite erosiva severa (LI; SCHWARZ, 2003; MONACH; MATHIS; BENOIST, 2008; NANDAKUMAR; HOLMDAHL, 2007). O desenvolvimento de novos tratamentos para AR requer a interação entre observações clínicas e os estudos com esses modelos animais (CHOUDHARY; BHATT; PRABHAVALKAR, 2018).

Apesar das limitações que se aplicam a todos os modelos animais de doenças humanas, a AIA têm sido fundamental na identificação de mediadores patogênicos, subgrupos de células imunes que determinam o início, a progressão e a gravidade da doença. Além disso, esse modelo permite investigar as fases da doença que são difíceis de serem estudadas em pacientes e serviram como bancos de testes para novas terapias biológicas, incluindo bloqueadores de citocinas e inibidores de pequenas moléculas de sinalização intracelular que revolucionaram o tratamento da artrite reumatoide (GRÖTSCH; BOZEC; SCHETT, 2019; JONES *et al.*, 2018). Na AIA, o antígeno mBSA funciona como uma substância catiônica, que se ligará negativamente a cartilagem e é retida na articulação. O antígeno é injetado em uma ou ambas as articulações, e a inflamação aguda progride rapidamente nos animais previamente imunizados, levando à destruição temporal das articulações. A patogênese de AIA envolve a reação na cartilagem articular como anticorpos desenvolvidos em resposta ao antígeno e formam complexos que ativam o complemento localmente e resultam na destruição da cartilagem (CHOUDHARY; BHATT; PRABHAVALKAR, 2018).

O modelo de AIA apresenta particularidades importantes, pois reproduz diversos parâmetros característicos da AR. No modelo, é possível observar a produção elevada de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, a presença de variados tipos celulares no infiltrado sinovial, alterações histológicas e intensa nocicepção mecânica (“dor”) causada pelo processo inflamatório,

além de danos de cartilagem e ósseo (ATKINSON; NANSEN, 2017; GRÖTSCH; BOZEC; SCHETT, 2019). Os achados histopatológicos no modelo de AIA apresentam semelhanças com RA humana, incluindo hiperplasia sinovial, infiltração perivascular, folículos linfóides e *pannus* associado com erosões na cartilagem, o qual está relacionada com a capacidade do antígeno de se ligar à cartilagem (CHOUDHARY; BHATT; PRABHAVALKAR, 2018). Além disso, a utilização de camundongos nocautes vem sendo amplamente utilizados, pois vem mostrando que a homeostase articular depende de uma variedade de fatores genéticos, principalmente, por permitirem; a prevenção ou restoração da perda de um gene que codifica para proteínas protetoras, ou inibição ou expressão de proteínas que induzem a artrite, o que possibilitam novas abordagens terapêuticas potenciais (VERONESI *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o papel de SOCS2 no controle da inflamação aguda e no desenvolvimento da lesão articular no modelo de AIA.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a cinética da inflamação e lesão na deficiência de SOCS2.
- ✓ Avaliar o papel da proteína SOCS2 no infiltrado celular articular de camundongos com AIA.
- ✓ Investigar a resposta inflamatória de componentes sistêmicos (como os esplenócitos) na ausência de SOCS2.
- ✓ Avaliar a contribuição de SOCS2 em eventos da resolução da inflamação, como na apoptose e eferocitose.
- ✓ Investigar a capacidade de transporte de SOCS2 por uma via extracelular.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Animais

Os experimentos contaram com a utilização de camundongos machos C57BL/6 e SOCS2^{-/-} com idade entre 8 a 10 semanas. Os camundongos C57BL/6 foram criados e obtidos no Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (CEBIO-ICB-UFMG) e os animais SOCS2^{-/-} foram criados e obtidos no biotério de criação próprio localizado no bloco C2 do (ICB-UFMG). Os camundongos foram criados e utilizados segundo a Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA (CONCEA, 2016). Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA) da UFMG, sob os números de protocolo 333/2018.

3.2. Imunização e desafio da Artrite Induzida por Antígeno

A indução de Artrite Induzida por Antígeno (AIA) foi preparada com a emulsão contendo 500 µg/animal de Albumina Bovina metilada (mBSA) (*Sigma Aldrich A1009*) diluído em salina, com adição de adjuvante completo de Freund (*Complete Freund's Adjuvant- DIFCO F5881*) em uma proporção de 1/1 do volume de mBSA. Cada animal após serem anestesiados (150 mg/Kg Cetamina / 10 mg/Kg Xilazina) receberam 100 µl dessa emulsão via intradérmica. Após 14 dias, os animais foram desafiados com 10 µg mBSA/animal na cavidade articular direita, e os animais controles receberam solução salina. Após 1, 4 e 7 dias os animais foram eutanasiados afim de avaliar o desenvolvimento inflamatório e resolutivo durante a AIA.

3.3. Avaliação de nocicepção mecânica através de Von Frey digital

A nocicepção foi avaliada com aparelho digital Von Frey (INSIGHT Instruments; Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) conforme descrito anteriormente (SACHS *et al.*, 2011a). Em uma sala silenciosa, os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico (12 cm x 10 cm x 17 cm) cobertas com arame não maleável. Os espaços entre os fios permitiram a passagem das patas, onde puderam ser avaliadas após 30 min de ambientação dos camundongos antes do início dos testes. O

estímulo foi realizado por uma ponta descartável de polipropileno de 4,15 mm de diâmetro acoplada a um transdutor no aparelho digital Von Frey. A pressão perpendicular foi aplicada ao centro da superfície plantar da pata inferior para induzir a flexão da articulação do joelho e provocar um limiar de retirada indicando um comportamento nociceptivo. A força do transdutor de pressão em gramas foi medida por meio do contador digital. Cinco avaliações foram realizadas por camundongo e as médias foram calculadas.

3.4 Histologia

A articulação do joelho foi removida, fixada em formalina tamponada neutra a 4 % (v/v) por 48 horas e descalcificada em EDTA 14 % (p/v) (pH 7,2) em temperatura ambiente por 28 dias. A solução foi renovada a cada 3 dias. As amostras foram incluídas em parafina e secções de 5 µm foram preparadas e coradas com hematoxilina-eosina (H&E) para patologia de pontuação, toluidina para perda de proteoglicano ou coloração de tricômico de Masson para análise de fibrose. Os escores dos parâmetros foram determinados por exame microscópico de duas seções ou articulações do joelho, conforme descrito anteriormente (INOMATA *et al.*, 2019; SCHRAMM *et al.*, 2004). A gravidade da hiperplasia sinovial, a intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e a reabsorção óssea foram pontuadas no intervalo de 0–3. As pontuações foram somadas para obter um índice de artrite na faixa de 0–3. As seções foram fotografadas com uma câmera digital (DEI-470; Optronics, Goleta, CA, EUA) conectada a um microscópio (IX70; Olympus, Center Valley, PA, EUA) com ampliação de $\times 100$, $\times 200$ e $\times 400$. A perda de proteoglicanos foi quantificada com o software ImageJ (Processamento e Análise de Imagens em Java) (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, EUA).

3.5 Western Blotting

O tecido periarticular foi coletado e imerso em tampão de lise. Os lisados foram centrifugados a $15.000 \times g$ e $4^\circ C$ por 15 min e seu conteúdo de proteína foi quantificado com solução de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Extratos de proteínas (60 µg) foram separados por eletroforese em gel de poli(acrilamida-dodecil sulfato de sódio) 15% (SDS-

PAGE) e transferidos para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,2 μm (EMD Millipore, Billerica, MA, EUA). A membrana foi bloqueada com 5% (p / v) de leite em pó desnatado (Mollico) e incubada durante a noite com anticorpo anti-SOCS2 (1: 500; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA), anticorpo anti-anexina A1 (1:1.000; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), ou anticorpo anti-GAPDH (1: 1.000; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) seguido de incubação com os anticorpos secundários correspondentes por 1 h. Um sistema de detecção de quimioluminescência (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) foi usado para detecção de banda de acordo com o protocolo do fabricante. Os níveis de SOCS2 foram quantificados com ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA). Os valores foram normalizados contra os níveis constitutivos de GAPDH e expressos como proporções SOCS2: GAPDH em unidades arbitrárias.

3.6 Citometria de fluxo

Afim de avaliar o perfil celular no infiltrado inflamatório, os camundongos controles e AIA foram sacrificados e suas cavidades articulares foram lavadas com PBS/BSA 3 % (v/v). Uma alíquota de células foi contada em uma câmara de Neubauer e as células restantes foram centrifugadas a $300 \times g$, lavadas com PBS/BSA 0,5 % (v/v) e incubadas com Fc Block (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) a 4°C durante 30 min. As células lavadas foram então incubadas com uma mistura de anticorpos conjugados com seus respectivos fluoróforos. As células incubadas com CD3 (FITC), CD4 (PE), CD8 (APC), CD11b (V500), LY6G (BV421), F4 / 80 (APCcy7) e NK1.1 (PEcy7) foram avaliadas nos dias 1 e 4, enquanto aqueles incubados com CD3 (PerCP-Cy5), CD4 (PE), CD8 (Alexa 488), CD11b (V500), LY6G (BV421), F4 / 80 (Alexa 647) e NK1.1 (PEcy7) foram avaliados no dia 7. As células foram então lavadas com PBS / 0,5% (v / v) BSA, centrifugadas a $300 \times g$ e ressuspensas em PBS / 0,5 % (v/v) BSA. As amostras foram adquiridas usando FACSCanto™ II (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) e os dados foram analisados com FlowJo v. 10 (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

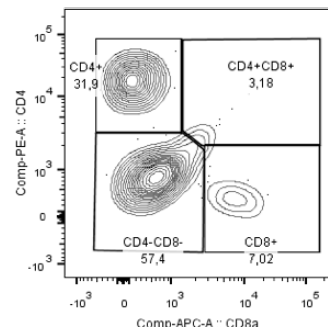
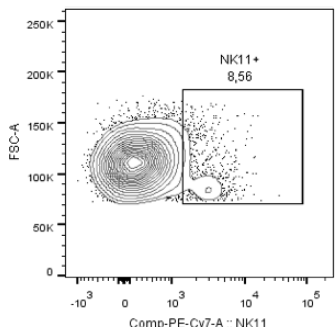
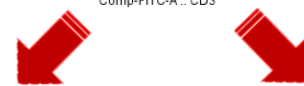
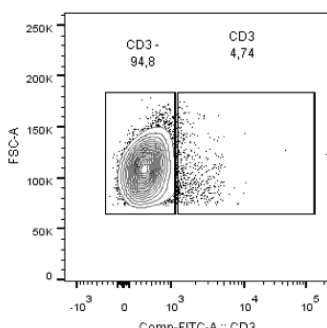
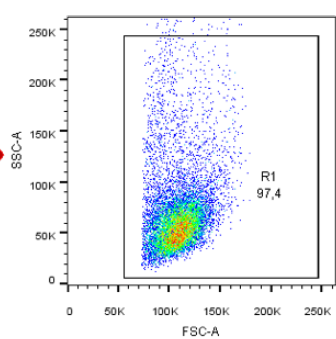
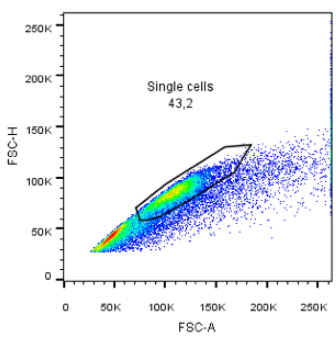
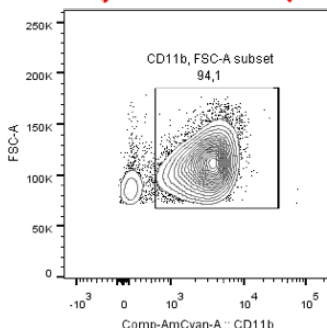
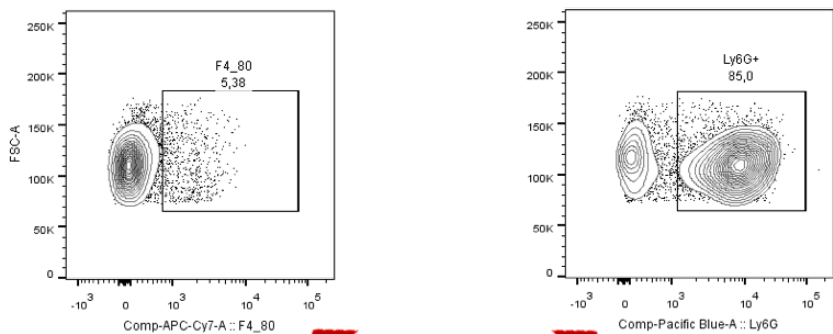


Figura 5 – Estratégia de *gate* para análise de citometria de fluxo. A estratégia baseou-se na análise das populações de neutrófilos (CD11b⁺LY6G⁺), macrófagos (CD11b⁺F4/80⁺), linfócitos TCD4 (CD3⁺ CD4⁺), TCD8 (CD3⁺ CD8⁺), NK (CD3⁻ NK⁺), células T duplo negativas (CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻) e células T duplo positivas (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺). O layout do *gate* foi montado utilizando o *software* FlowJo V10 (Tree Star, Ashland, Oregon, USA).

3.7 Microscopia intravital da cavidade articular

O rolamento e a adesão de leucócitos da microvasculatura articular foram analisadas em camundongos AIA por meio da técnica intravital, conforme descrito anteriormente (COELHO *et al.*, 2008). Os camundongos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e injetados por via intravenosa com rodamina 6G (0,5 mg / mL; 100 µL / camundongo; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) 10 min antes da avaliação. A pele sobre a articulação foi exposta para exame por microscopia intravital (ECLIPSE 50i; Nikon, Tóquio, Japão) com uma lente objetiva de 20 × (DS-Qi1MC; Nikon) e as vênulas sob a cavidade articular foram visualizadas. Foram selecionados vasos de 20–40 µm de diâmetro. Os leucócitos foram considerados rolantes se ultrapassassem um ponto designado no vaso. Sua taxa de fluxo foi medida e relatada em células / min. Os leucócitos foram considerados aderentes se permaneceram estacionários por 30 s. A adesão total de leucócitos foi quantificada como o número de células aderentes dentro de um comprimento de vaso de 100 µm e os resultados foram relatados em células / mm².

3.8 ELISA e dosagem de anticorpos anti-mBSA

Para avaliar os níveis de citocinas e quimiocinas durante a AIA, foram avaliadas as seguintes proteínas: IL-1β, IFN-γ, IL-6, IL-10, IL-17, CXCL1. A realização do ensaio seguiu instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), utilizando o homogenato obtido através do processamento em homogeneizador, em tampão de extração de citocinas (100 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 1mM EGTA; 1 % Triton X; 0,5 % Deoxicolato de Sódio; 1 mM de EDTA) com 1 % de coquetel inibidor de protease (SIGMA FAST). Adicionou-se em placas de ELISA (NUNC), o respectivo anticorpo de captura específico para cada citocina, que foi incubado *overnight* a 4°C. Após esse tempo as placas foram lavadas com PBS Tween 0,1 % e bloqueadas por 2 horas com PBS BSA 1 %. As amostras foram diluídas (1:2) e os padrões para cada citocina e quimiocina

foram adicionados às placas a partir de concentrações decrescentes para estabelecimento da curva padrão de diluição recomendada pelo *kit* em uso. As placas foram incubadas *overnight* a 4°C. O anticorpo de detecção foi adicionado em cada placa e incubado por 1 hora. A estreptavidina ligada à peroxidase (Pharmingen) foi adicionada a cada placa. Após 30 min., as placas após a lavagem, foram adicionados tampão contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H₂O₂ (Merck). O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (Molecular Devices, USA) na absorvância de 490 nm, após parada da reação com ácido sulfúrico (H₂SO₄).

A dosagem de IgG anti-mBSA foram determinadas conforme descrito anteriormente (YANG, Y. H. *et al.*, 2010). As placas (NUNC) foram sensibilizadas com 100µL de mBSA (100µg/mL – Sigma Aldrich), *overnight* a 4°C. As placas foram bloqueadas por 1 hora com caseína a 2% (Sigma-Aldrich) em PBS 1x. Em seguida, as amostras foram diluídas (1:100.000) em PBS 1x, e foram incubadas *overnight*. Os anticorpos anti-mouse IgG biotinizados (Caltag), foram incubados por 2 horas. O conjugado de estreptavidina (Pharmigen) foi incubado por 30 minutos e detectado usando substrato de tetrametilbenzidina (Bio rad) na absorvância de 450nm.

3.9 Dosagem de Lipoxina A₄

A lipoxina A₄ (LXA₄) foi dosada seguindo os procedimentos fornecidos pelo fabricante (Neogen, Lexington, KY). O homogenato obtido pelo processamento com tampão de citocinas foi diluído em metanol (1:3) e água (1:5). Após o homogenato foi aplicado através das colunas de luz para a separação da LXA₄, e posteriormente a lavagem, eluiu a LXA₄ com formato de metila. As amostras e padrões da curva foram incubadas na microplaca revestida com anticorpo anti-LXA₄, adicionadas com enzima conjugada com peroxidase (50:1). Após 1 hora as placas foram lavadas e incubadas com o substrato de TMB. Foi mensurado de acordo com as instruções do fabricante por absorvância de 490 nm.

3.10 Cultura de esplenócitos

Os baços de camundongos WT e SOCS2^{-/-} com AIA e controles (camundongos não desafiados), foram retirados na fase tardia (7 dias após o desafio). Os esplenócitos foram purificados por um processamento através de *cell strainer* (BD), com o auxílio de embolo de

seringa e semeados em placas de cultura (1×10^6 / poço). Eles foram incubados sem tratamento ou estimulados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de mBSA (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 5 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (p/v) de penicilina-estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY, EUA) a 37 °C sob uma atmosfera de 5 % de CO_2 por 24 h. Os sobrenadantes foram coletados para quantificação de IL-17, IFN- γ e IL-10 por ELISA, como descrito previamente segundo o fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA).

3.11 Análises de apoptose e eferocitose de neutrófilos

A apoptose de neutrófilos foi avaliada como descrito anteriormente (BARROSO *et al.*, 2017). Uma alíquota de células foi coletada do lavado sinovial (PBS / BSA 3 %) e as células foram contadas em uma câmara de Neubauer e centrifugadas por *Cytospin* (Cytospin; Shandon Lipshaw Inc., Pittsburgh, PA, EUA). Após centrifugação as células agora aderidas em lâminas foram coradas com *May Grünwald Giemsa* (Laborclin, Prado, Brasil) e montadas com lamínulas. As células foram quantificadas por microscopia através de imersão em óleo (objetiva $\times 100$) e classificadas como apoptóticas se apresentassem as seguintes características: (a) morfologia apoptótica distinta; (b) condensação da cromatina ou fragmentação nuclear; e (c) formação de corpos apoptóticos fora ou dentro dos macrófagos (eferocitose). As proporções de células apoptóticas em ≥ 300 células / lâmina foram calculadas e os resultados foram expressos como % de células com morfologia apoptótica ou eferocítica.

3.12 Isolamento de neutrófilos e ensaio de quimiotaxia

Os neutrófilos foram isolados da medula óssea de camundongo WT e *SOCS2*^{-/-} por centrifugação em gradiente com Histopaque-1119 e Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA). A quimiotaxia foi observada em uma microcâmara de 48 poços (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, EUA) equipada com uma membrana de policarbonato com tamanho de poro de 5 μm , conforme descrito anteriormente (VALIATE *et al.*, 2019). Os neutrófilos foram estimulados com CXCL1 (30 ng / mL) ou tratados com meio RPMI (controle). Após 1 h, a

membrana foi fixada e corada com *May Grünwald Giemsa* (Laborclin, Prado, Brasil), e os neutrófilos que haviam migrado foram contados em microscopia de luz.

3.13 Ensaio de eferocitose *in vitro*

A eferocitose *in vitro* foi realizada conforme descrito anteriormente (FELIX *et al.*, 2021). Os macrófagos peritoneais foram isolados 4 dias após serem injetados 1 mL de tioglicolato de sódio a 3 % (p / v) em camundongos WT e SOCS2^{-/-} e incubados a $2,5 \times 10^5$ por poço em uma placa de 96 poços em meio RPMI completo (Cultilab, Campinas, Brasil) {suplementado com 5 % de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) e 1% (p/v) de penicilina-estreptomicina} (Gibco, Grand Island, NY, EUA). Os timócitos foram purificados por um processamento através de *cell strainer* (BD), com o auxílio de embolo de seringa e semeados em placas de cultura incubados em RPMI completo, sob uma atmosfera de 5% de CO₂ a 37 ° C por 24 h. Os macrófagos foram pré-tratados com LXA₄ (10 ng/mL) (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) por 12 h. Os timócitos foram marcados com carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) e a apoptose foi induzida com estaurosporina (10 µM) por 2 h. Uma mistura de proporção de 3:1 de células apoptóticas:macrófagos foi co-incubada por 1 h. Os timócitos apoptóticos não fagocitados na co-cultura foram removidos por lavagem cinco vezes com PBS 1x. Após a lavagem as células foram marcadas com F4/80 durante 30 min. A citometria de fluxo foi usada para medir a eferocitose dos timócitos por macrófagos observados pela dupla marcação F480⁺ CFSE⁺. A intensidade média de fluorescência (MFI) de CFSE foi medida a 488 nm de excitação a laser afim de avaliar a capacidade eferocítica dos macrófagos. Células únicas foram identificadas e os *doublents* foram eliminados da análise de dados.

3.14 Cultura primária de macrófagos

As células da medula óssea foram isoladas de camundongos C57BL/6 após a eutanásia por sobre dose de anestésico. O fêmur e tibia foram retirados, e as células foram retiradas por centrifugação em tubos de 0,5 mL (875 xg por 1 min. O pellet de células obtidos foram ressuspendidos em meio RPMI completo (10% SFB, 1% penicilina / estreptomicina) e 20% de meio condicionado por células L929. O pellet foi ressuspendido suavemente, e com o auxílio de um *cell strainer* (100 µm) (BD Biosciences), passou a suspensão de células para remover os detritos

e pedaços de tecido da medula contidos na suspensão. As células foram acondicionadas em placas de petri (90 mm x15 mm) 1×10^7 com 10 mL de RPMI completo (10% SFB e 20% L929) e incubadas a 37°C em uma estufa com 5% de CO₂. Cinco dias após o cultivo foi adicionado 5mL de RPMI completo (10% SFB e 20 % L929). No sétimo dia, as células receberam mais 5 mL. Após confluência de 90-100% e diferenciação as células foram extraídas com tripsina/EDTA (0.005) contadas e plaqueadas em placa de 24 poços (1×10^6 células / poço). Após 3 horas os poços foram lavados com meio RPMI para retirar as células que não aderiram e deixaram pré-incubadas overnight. Posteriormente as células foram lavadas e colocadas com meio RPMI sem SFB (para que as vesículas contidas no SFB não mascarem as vesículas produzidas pelos macrófagos plaqueados), e estimuladas com LPS (200 ng/ml) por 6 h, 12 h e 24 h. No final de cada cinética coletou-se o sobrenadante de cada poço para a separação de vesículas extracelulares por ultracentrifugação, e extraiu-se as células com tampão de lise para a realização da técnica de western blotting.

3.15 Extração de vesículas extracelulares

Para realizar a extração de vesículas extracelulares é utilizado uma serie de centrifugações para separar células, debris, corpos apoptóticos, das vesículas extracelulares. Para isso, após a retirada do sobrenadante da cultura de BMDMs, realizou-se uma centrifugação a $300 \times g$ a 4 °C por 10 min (para discriminar possíveis células no pellet). Após essa centrifugação realizou-se uma centrifugação a $2000 \times g$ a 4 °C por 10 min (para discriminar células mortas no pellet). Para as próximas etapas utilizou-se de uma Ultra-centrífuga (Thermo Scientific™ Sorvall™ WX Floor) para centrifugar a $13,000 \times g$ a 4 °C por 2 min (afim de remover contaminantes residuais, como corpos apoptóticos). Posteriormente realizou-se uma centrifugação a $100,000 \times g$ a 4 °C por 1 h (para concentrar as vesículas extracelulares no pellet). Logo após, realizou-se outra centrifugação $100,000 \times g$ a 4 °C por 1 h ressuspensando o pellet com PBS1x para lavar as vesículas extracelulares. No final as vesículas extracelulares foram ressuspensadas em 30 µL de PBS 1x, e lisadas com 30 µL de tampão de lise (1% Triton X 100, 100mM Tris/HCl, pH 8.0, 10% Glicerol, 5mM EDTA, 200mM NaCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, 25mM NaF, 2.5mg/mL Leupeptina, 5

mg/mL aprotinina, e 1mM ortho-vanadato de sódio) para a realização da técnica de western blotting.

3.16 Análises estatísticas

Para realizar as análises estatísticas utilizou-se o programa Prisma 8.0.1 (software GraphPad, San Diego, CA, Estados Unidos). O número de animais utilizados neste estudo foi determinado usando um software estatístico (GPOWER 3.1.9.2) durante a elaboração do projeto de estudo, considerando a variação de número de neutrófilos na lavagem do joelho através de resultados obtidos na padronização do modelo. Todos os resultados são apresentados como a média \pm SEM. A análise para avaliar a diferença entre dois grupos foi realizada pelo teste T Student não pareado bicaudal. Os dados normalizados foram analisados por ANOVA unidirecional e diferenças entre os grupos foram avaliados usando a comparação múltipla de pós teste Sidak e Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Expressão de SOCS2 é reduzida durante o pico do infiltrado celular em camundongos WT induzidos com AIA

Para compreendermos a importância do papel de SOCS2 no contexto da AIA, camundongos C57BL/6 foram imunizados e, após 14 dias, foram desafiados na cavidade intra-articular com mBSA e avaliados após 1 dia (pico de inflamação), 4 dias e 7 dias (fase de resolução da inflamação). Para isso, foram realizados a contagem de células totais através do lavado intra-articular e avaliação da expressão de SOCS2 do tecido periarticular. Após o desafio, camundongos WT tiveram uma redução da expressão basal de SOCS2 desde a fase de pico da inflamação (1 dia) (Figura 6A e B), momento no qual é observado o aumento no número de leucócitos no infiltrado sinovial (Figura 6C). No entanto, após 7 dias, a expressão de SOCS2 demonstrou retornar ao nível próximo do basal (Figura 6A e B), no qual é observado a redução na contagem de leucócitos totais nos camundongos WT com AIA (Figura 6C).

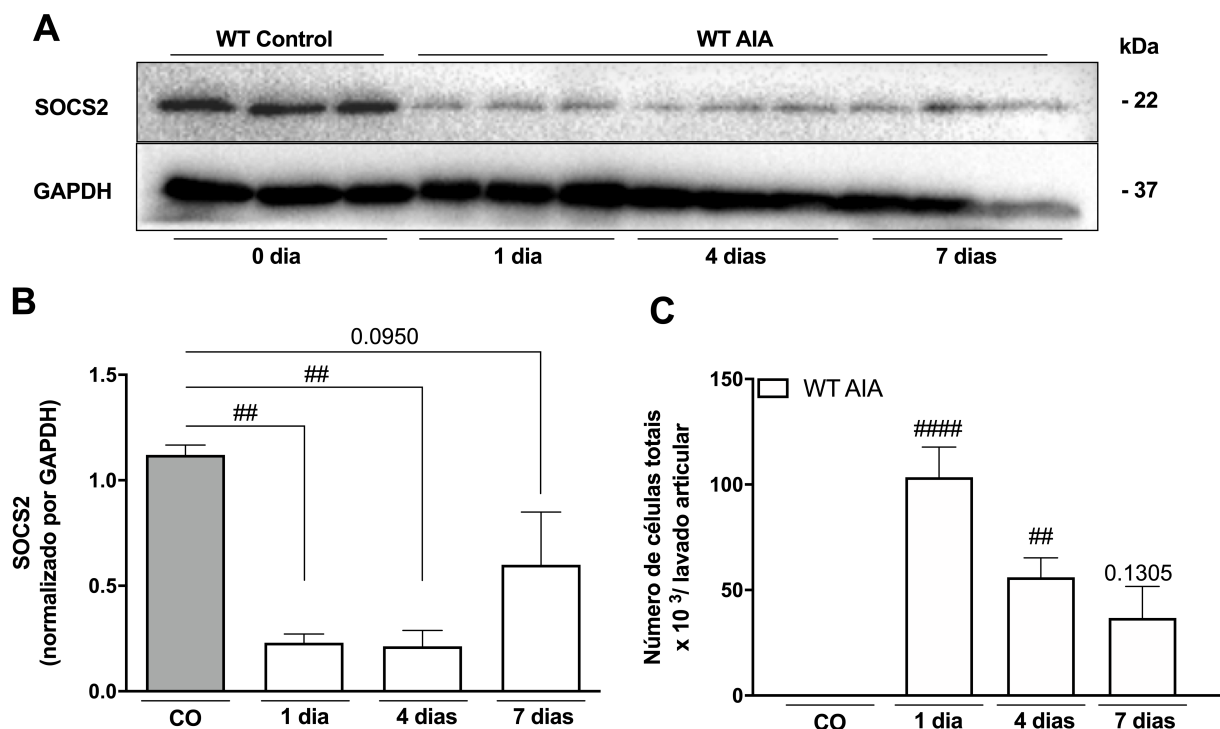


Figura 6. Recrutamento celular, nocicepção e expressão de SOCS2 em modelo de artrite induzida por antígeno em camundongos selvagens (WT). O modelo experimental de AIA em camundongos selvagens foi realizado a partir

da imunização com 100µL da solução (500µg/animal de mBSA diluído em salina + ½ de Completo Adjuvante de Freund) com injeção intradérmica e após 14 dias foram desafiados com 10µg de mBSA diluído em salina com injeção intra-articular de 10 µL. Após 1, 4 e 7 dias do desafio, os camundongos foram eutanasiados e coletado o tecido periarticular para avaliar: (A) Expressão de SOCS2, (B) Normalização de SOCS2/GAPDH e (C) Quantidade de leucócitos totais na cavidade articular. Valores expressos com a média \pm SEM de 4 a 5 camundongos por grupo. ** para $p < 0,01$ e **** para $p < 0,0001$ em relação ao grupo não desafiado. A significância foi calculada usando ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

4.2 A deficiência de SOCS2 resulta no prolongamento do perfil inflamatório durante a AIA

Sabendo que a proteína SOCS2 é modulada durante o desenvolvimento da AIA, fomos elucidar a importância dessa proteína utilizando camundongos nocautes da produção de SOCS2 (SOCS2^{-/-}). Para isso, avaliamos periféricamente as alterações causadas na cavidade articular pelo processo inflamatório causado pelo infiltrado celular e inflamação dentro da cinética estabelecida.

Ao avaliar cada ponto das cinéticas, uma análise inicial da região articular evidencia que camundongos SOCS2^{-/-} após 4 e 7 dias apresentaram maior edema periarticular e deformidade articular, enquanto que camundongos WT após 7 dias demonstraram aspectos articulares próximos aos camundongos WT controle (Figura 7).

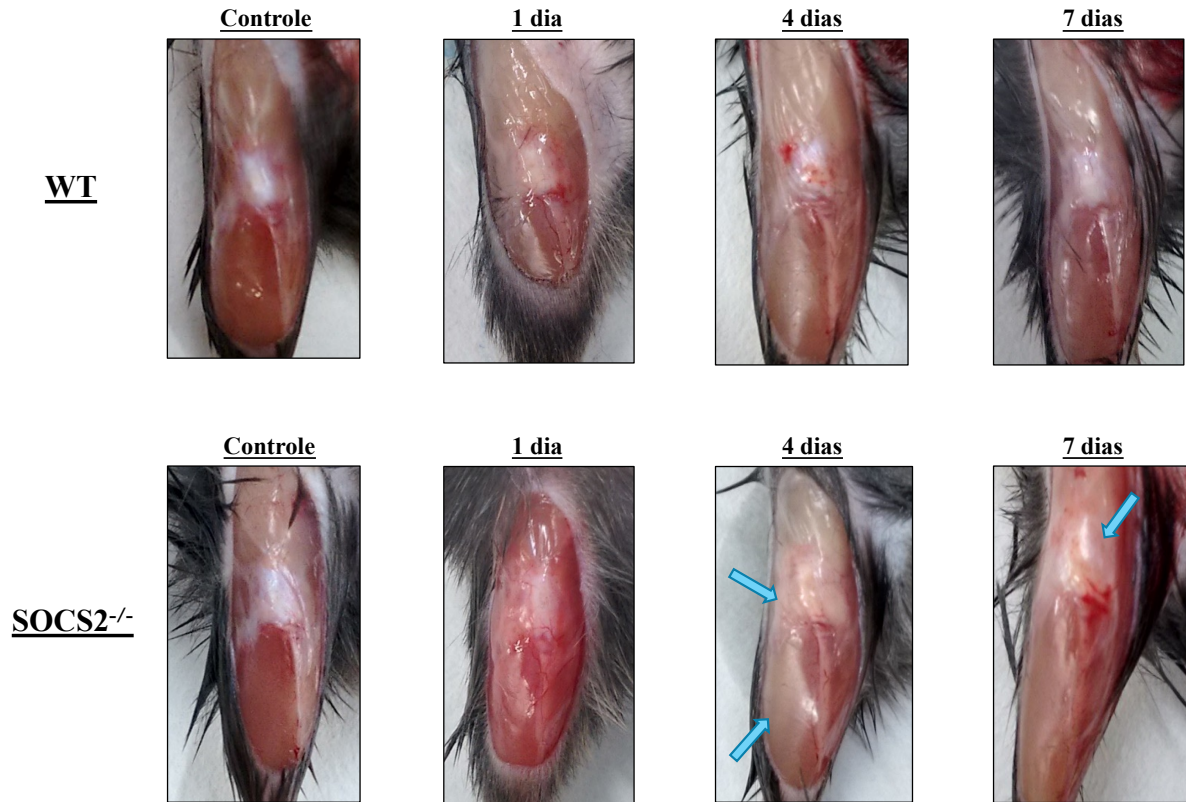


Figura 7. Inflamação periférica articular após desafiar camundongos WT e SOCS2^{-/-} com AIA O modelo experimental de AIA em camundongos selvagens e SOCS2^{-/-} foi realizado a partir da imunização com 100µL da solução (500µg/animal de mBSA diluído em salina + ½ de Completo Adjuvante de Freund) com injeção intradérmica e após 14 dias foram desafiados com 10µg de mBSA diluído em salina com injeção intra-articular de 10 µL. Após 24h, 96h e 168h do desafio, os camundongos foram eutanasiados e foi realizado a captura de imagem obtida por um celular Moto G2, afim de avaliar o perfil inflamatório peri articular, deformidades articulares e comprometimento da articulação. Foram avaliados 4 animais por grupo.

Em relação ao infiltrado celular na cavidade articular, camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram menor acúmulo de leucócitos totais na cavidade articular com 1 dia após o desafio quando comparados com camundongos WT (Figura 8A). Nos dias posteriores, enquanto houve uma redução no acúmulo de células nos animais WT, ocorreu um aumento progressivo nos animais SOCS2^{-/-}. No dia 4, os valores se igualaram. Porém, camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram maior acúmulo no último ponto analisado em relação aos camundongos WT (Figura 8A). A avaliação da produção de anticorpos anti-mBSA mostrou que não houve diferenças na produção em ambos os grupos até 7 dias após o desafio, mostrando assim uma resposta similar na imunização (Figura 8B).

Quando avaliado a nociceção, observou-se que ambos camundongos com AIA mantiveram maior atividade nociceptiva (mesmo liminar de retirada de pata) até a cinética avaliada de 1 e 4 dias (Figura 8C) quando comparados aos camundongos controles. Porém, após 7 dias, observou-se que camundongos *SOCS2*^{-/-} mantiveram constante atividade nociceptiva, enquanto camundongos WT apresentavam um retorno da atividade nociceptiva, com valores similares aos grupos controles (Figura 8C).

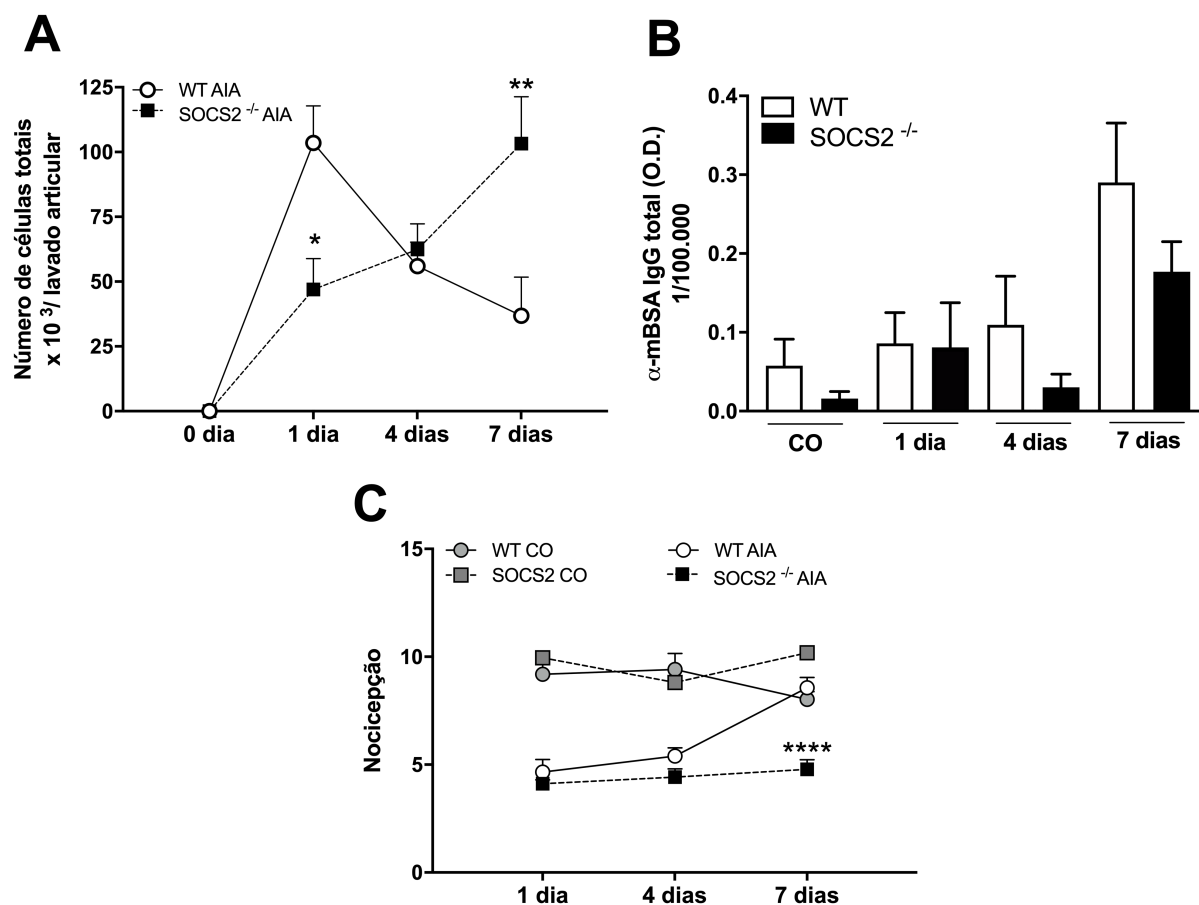


Figura 8. Camundongos *SOCS2*^{-/-} apresentam acúmulo de células e nociceção persistentes. O modelo experimental de AIA em camundongos selvagens foi realizado a partir da imunização com 100μL da solução (500μg/animal de mBSA diluído em salina + ½ de Completo Adjuvante de Freund) com injeção intradérmica e após 14 dias foram desafiados com 10μg de mBSA diluído em salina com injeção intra-articular de 10 μL. Após 1, 4 e 7 dias do desafio, os camundongos foram avaliados quanto a quantidade de leucócitos totais na cavidade articular (A), quantificados os níveis de anticorpos anti-mBSA do soro de camundongos diluição de 100.000x (B) e foi mensurado a nociceção (C). Valores expressos em número de células, peso em g, e expressão de proteína com a média SEM de 4 a 5 camundongos por grupo. * para p < 0,05, ** para p < 0,01 e **** para p < 0,0001 em relação ao grupo não desafiado. A significância foi calculada usando 2way ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak.

4.3 SOCS2 controla o infiltrado celular e dano no tecido sinovial na fase tardia da AIA

Após observar que a ausência de SOCS2 aumenta o infiltrado celular na cavidade articular obtido pelo lavado, o próximo passo foi investigar, através da histologia, como estaria a alteração do infiltrado inflamatório no tecido sinovial, bem como as alterações teciduais como hiperplasia e reabsorção óssea. Observamos que a ausência de SOCS2 agravou a progressão da doença em comparação com o WT apenas na fase tardia (após 7 dias de desafio) (Figuras 9A-9G). SOCS2 foi vital para a regulação da infiltração celular (Figura 9B), proliferação vascular (Figura 9C), hiperplasia sinovial (Figura 9D), tamanho do *pannus* sinovial (Figura 9E), erosão da cartilagem (Figura 9F) e índices de artrite articular (Figura 9G).

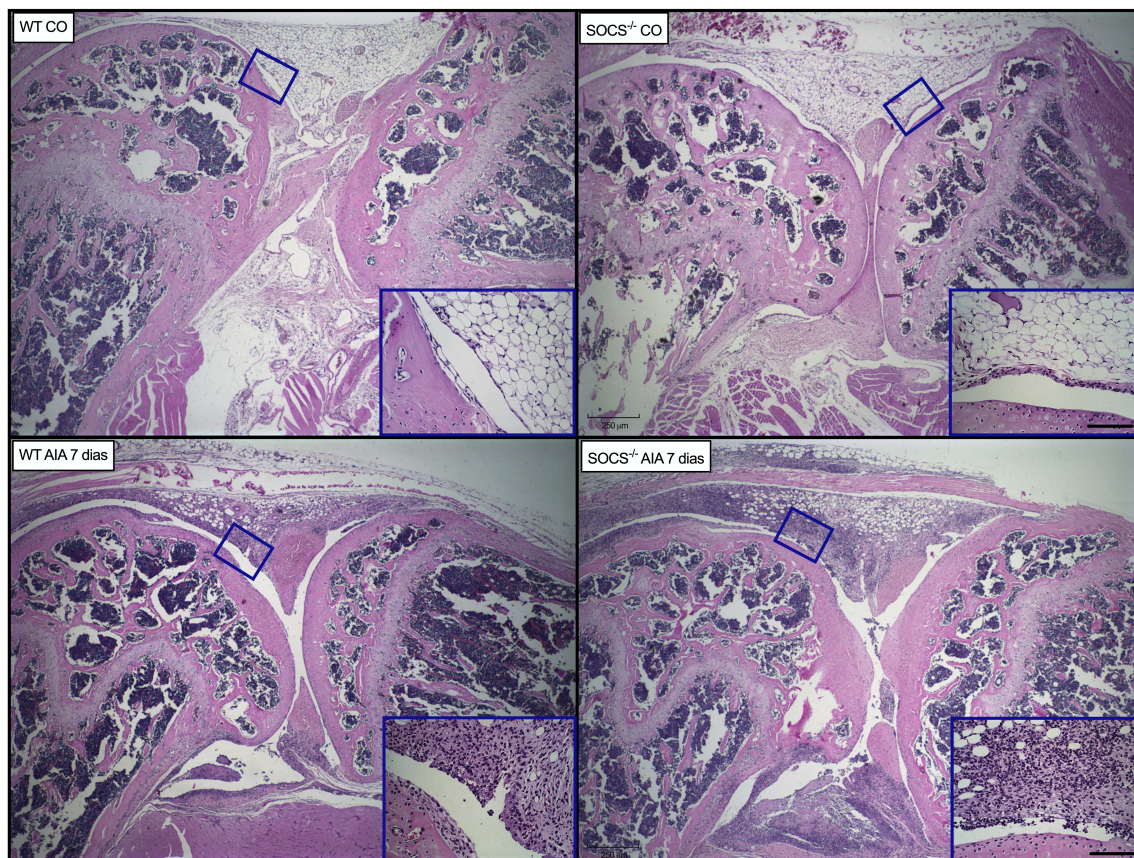
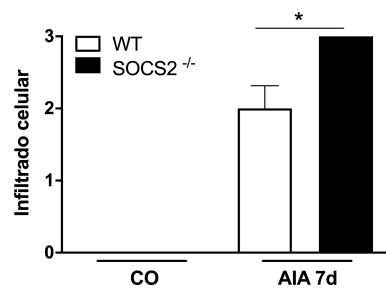
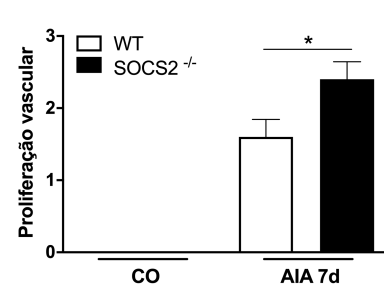
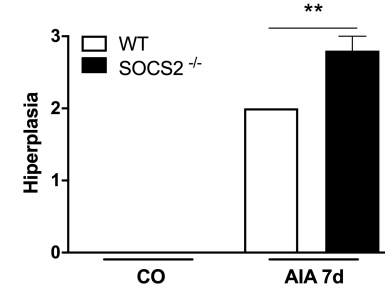
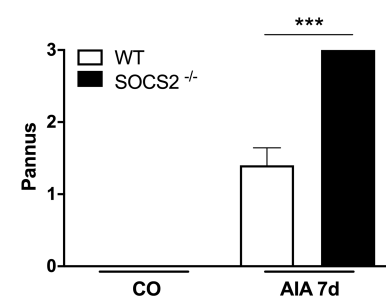
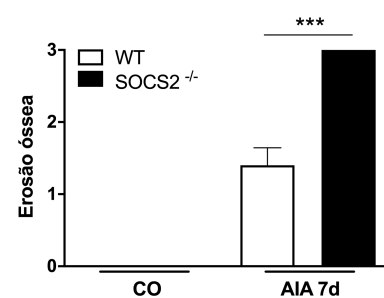
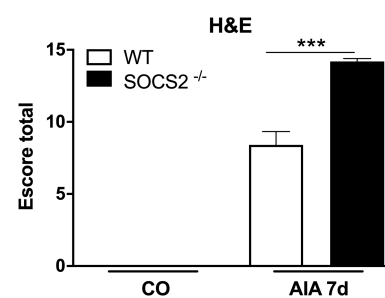
A**B****C****D****E****F****G**

Figura 9. SOCS2 é essencial para o controle da progressão de AIA. Os camundongos WT e SOCS2^{-/-} foram imunizados e suas cavidades articulares foram desafiadas com mBSA após 14 dias. Os tecidos da articulação do joelho foram descalcificados por 28 dias, seccionados, corados com H&E e analisados histopatologicamente. Imagens histopatológicas (A). Pontuação de infiltração de tecido sinovial (B). Pontuação de proliferação vascular (C). Pontuação de hiperplasia (D). Pontuação Pannus (E). Pontuação de erosão da cartilagem (F). Índice de artrite (G). Barras em imagens longas representam 250 µm com ampliação de 4 ×. As barras na imagem curta representam uma ampliação de 40 ×. As imagens foram projetadas em um monitor de computador e gravadas para análise de reprodução com software de imagem Nikon (n = 3-6). Os dados são expressos como médias ± SEM em relação ao WT ou SOCS2^{-/-}. Diferenças significativas entre as médias de tratamento foram identificadas com ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. * p <0,05, ** p <0,01 e **** p <0,0001.

Também avaliamos a reabsorção óssea e a perda de proteoglicanos da cartilagem (Figuras 10A-C). Na fase tardia, os camundongos SOCS2^{-/-} desafiados com mBSA exibiram um aumento na perda de proteoglicano (Figuras 10A e 10B), indicando uma perda de cartilagem articular, em comparação com os camundongos SOCS2^{-/-} injetados com solução salina. Em contraste, não houve diferenças entre os camundongos WT injetados com solução salina ou mBSA. Ainda, camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram uma tendência de aumento de reabsorção óssea no dia 7 quando comparados com camundongos WT (Figura 10C). Em conjunto aos achados anteriores, sugere-se que a ausência de SOCS2 leva à progressão do dano ao tecido e à perpetuação da disfunção articular, associado com maior nocicepção observada nos camundongos SOCS2^{-/-}.

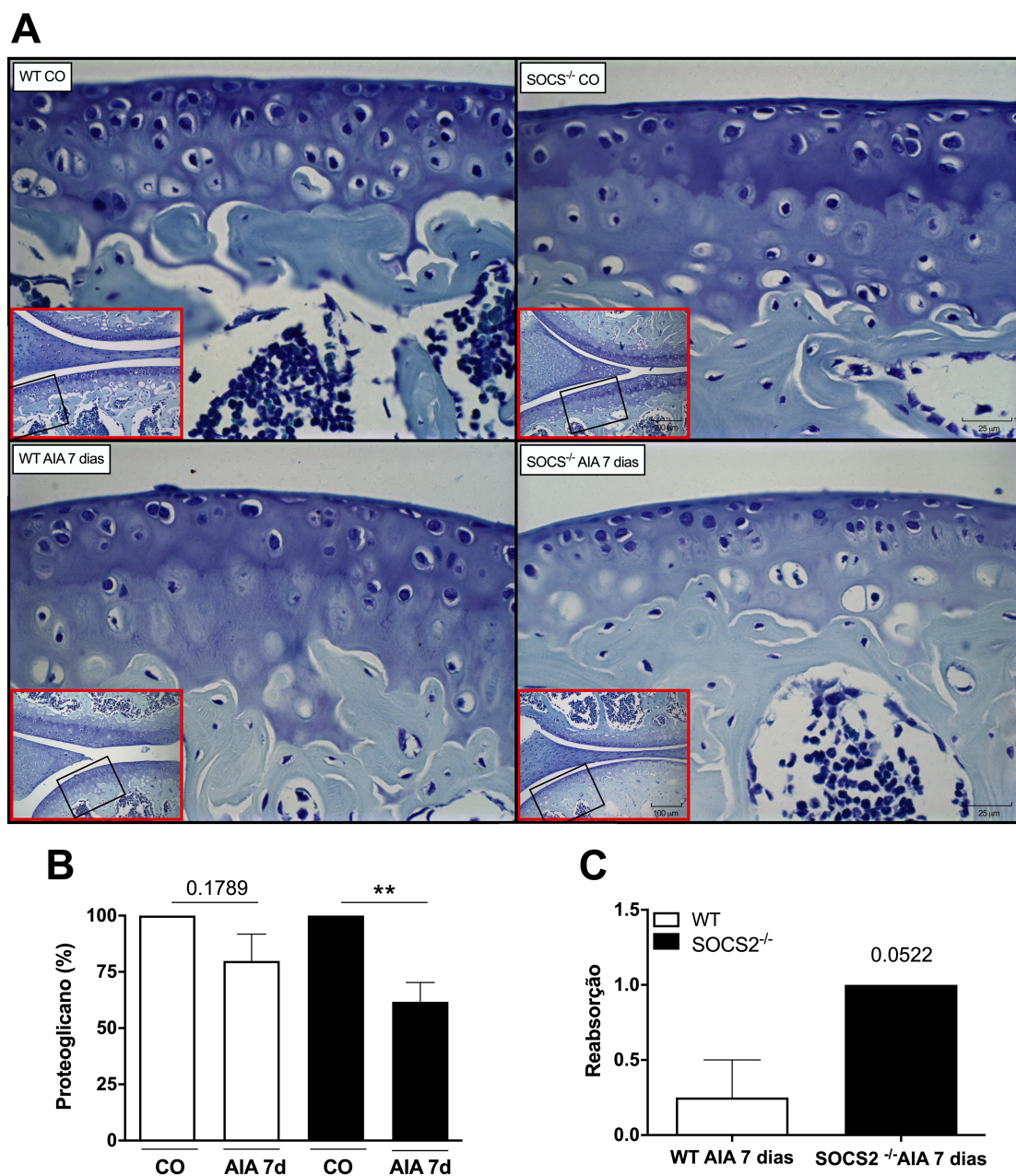


Figura 10. Os camundongos SOCS2^{-/-} mostraram perda de proteoglicano relativamente maior na fase AIA tardia. Os camundongos WT e SOCS2^{-/-} foram imunizados e suas cavidades articulares foram desafiadas com mBSA após 14 dias. Os tecidos da articulação do joelho foram descalcificados por 28 dias, seccionados, corados com azul de toluidina e analisados histopatologicamente. Imagens histopatológicas (A). % proteoglicano (B). Reabsorção (C). As barras na imagem representam 25 μ m com ampliação de x60. As barras inseridas representam uma ampliação de x40. As imagens foram projetadas em um monitor de computador e gravadas para análise de reprodução com software de imagem Nikon. A perda de proteoglicano foi avaliada usando ImageJ (n = 3-6). Os dados são expressos como médias \pm SEM em relação ao WT ou SOCS2^{-/-}. ** p < 0,01. Diferenças significativas entre as médias de tratamento foram identificadas com ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.4 A ausência de SOCS2 não altera a fibrose no tecido sinovial

Os resultados histopatológicos, em conjunto, demonstraram que a ausência de SOCS2 leva a uma progressão no dano tecidual e no prolongamento da disfunção articular. Diante disso, decidimos avaliar se SOCS2 seria capaz de regular o desenvolvimento da fibrose ao longo do tecido sinovial durante a fase tardia, onde há um maior comprometimento articular. Após as análises de fibrose em três regiões do tecido sinovial (parênquima, membrana sinovial e perivascular) (Figuras 11 B-D), observou-se que ambos os grupos desafiados aumentavam os níveis de fibrose sinovial após 7 dias de desafio em relação aos seus respectivos grupos controles. No entanto, não demonstraram diferenças os camundongos SOCS2^{-/-} quando comparados com WT após 7 dias de desafio.

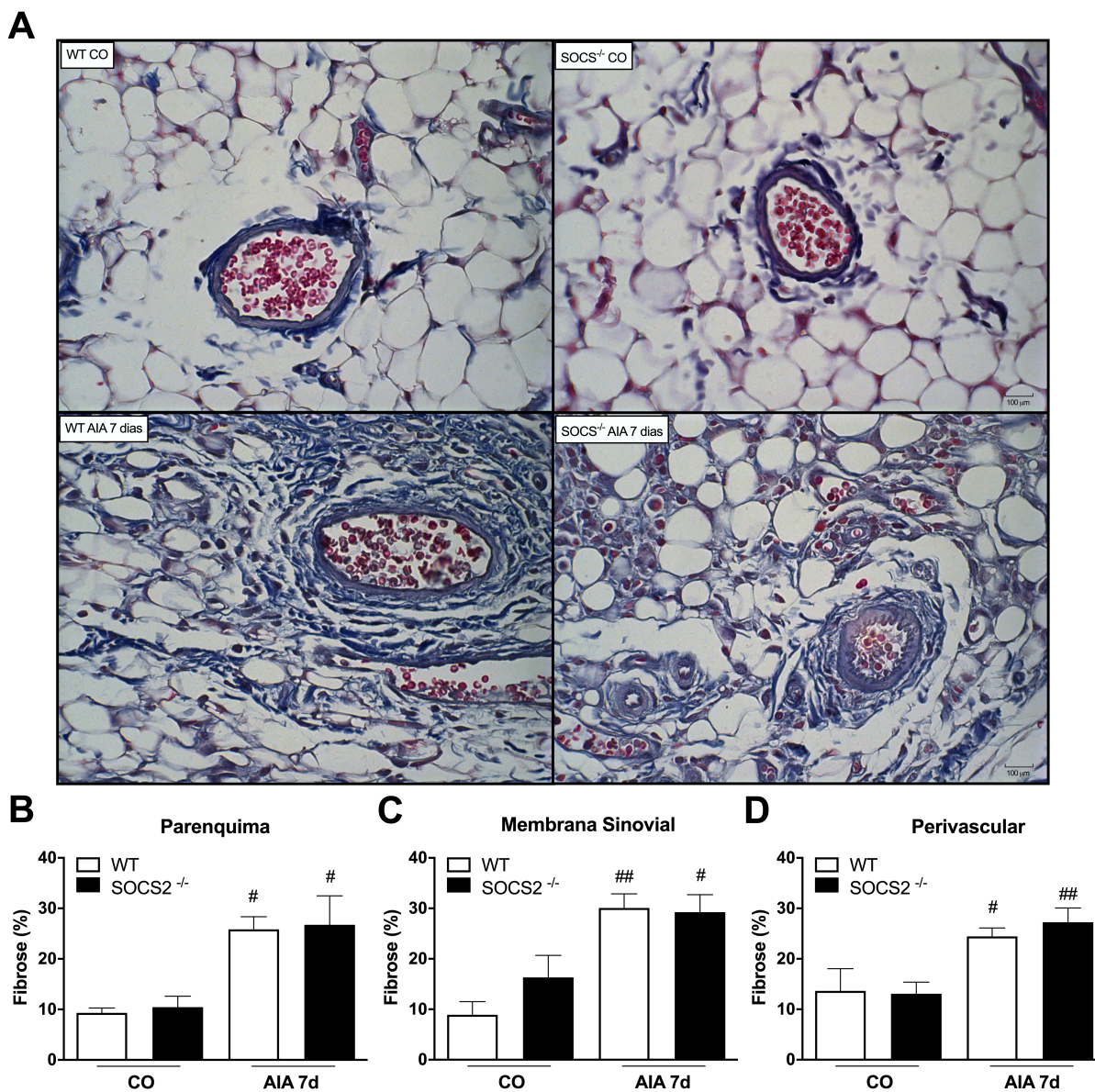


Figura 11. Análise de fibrose do tecido do joelho de camundongos WT e SOCS2^{-/-} no final da fase tardia da AIA. Os camundongos WT e SOCS2^{-/-} foram imunizados e suas cavidades articulares foram desafiadas com mBSA após 14 dias. O tecido da articulação do joelho foi descalcificado por 28 d, seccionado e corado com tricrômio de Masson. (A) Imagens histopatológicas perivascular, (B) % de fibrose no parênquima, (C) % de fibrose sinovial e (D) % de fibrose na membrana sinovial. As barras na imagem representam 25 μ m com ampliação de 60 \times . As imagens foram projetadas em um monitor de computador e gravadas para análise de reprodução com software de imagem Nikon. A fibrose foi medida por ImageJ (n = 3-6). Os dados são expressos como médias \pm SEM em relação a WT ou SOCS2^{-/-}. Diferenças significativas entre as médias de tratamento foram identificadas com ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.5 A ausência de SOCS2 está associada com um maior acúmulo de células da imunidade Inata na fase tardia da AIA

Para elucidar o perfil das células presentes no infiltrado do joelho, os leucócitos obtidos na lavagem do joelho foram analisados por citometria de fluxo. Os camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram menor acúmulo no número de neutrófilos em 1 dia após o desafio quando comparados aos camundongos WT (Figura 12A). No entanto, na fase tardia (7 dias), o número de neutrófilos em camundongos SOCS2^{-/-} foi maior do que em camundongos WT, assim como o número de macrófagos (Figura 12B). Sabendo-se da importância dos macrófagos na fase tardia da AIA através da resolução da inflamação e no reparo tecidual (BONNEFOY *et al.*, 2018; FELIX *et al.*, 2021; SAAS *et al.*, 2017; YANG, XUEZHI; CHANG; WEI, 2020), decidimos avaliar o papel de SOCS2 sobre a atividade dos macrófagos na eferocitose durante o desenvolvimento da AIA.

Para investigar se o maior acúmulo de neutrófilos nos animais $SOCS2^{-/-}$ estaria relacionado com uma característica intrínseca dos neutrófilos $SOCS2^{-/-}$, foi realizado um ensaio de quimiotaxia com a quimiocina CXCL1, importante no recrutamento de neutrófilos. Os neutrófilos de camundongos $SOCS2^{-/-}$ apresentaram a mesma capacidade de quimiotaxia em comparação aos neutrófilos WT quando estimulados com CXCL1 (Figuras 12C). Considerando que CXCL1 é uma importante quimiocina produzida no tecido inflamado após a indução de AIA (COELHO *et al.*, 2008; SACHS *et al.*, 2011b), um maior acúmulo de neutrófilos nos animais $SOCS2^{-/-}$ pode ser uma consequência de uma resposta inflamatória persistente em relação aos animais WT.

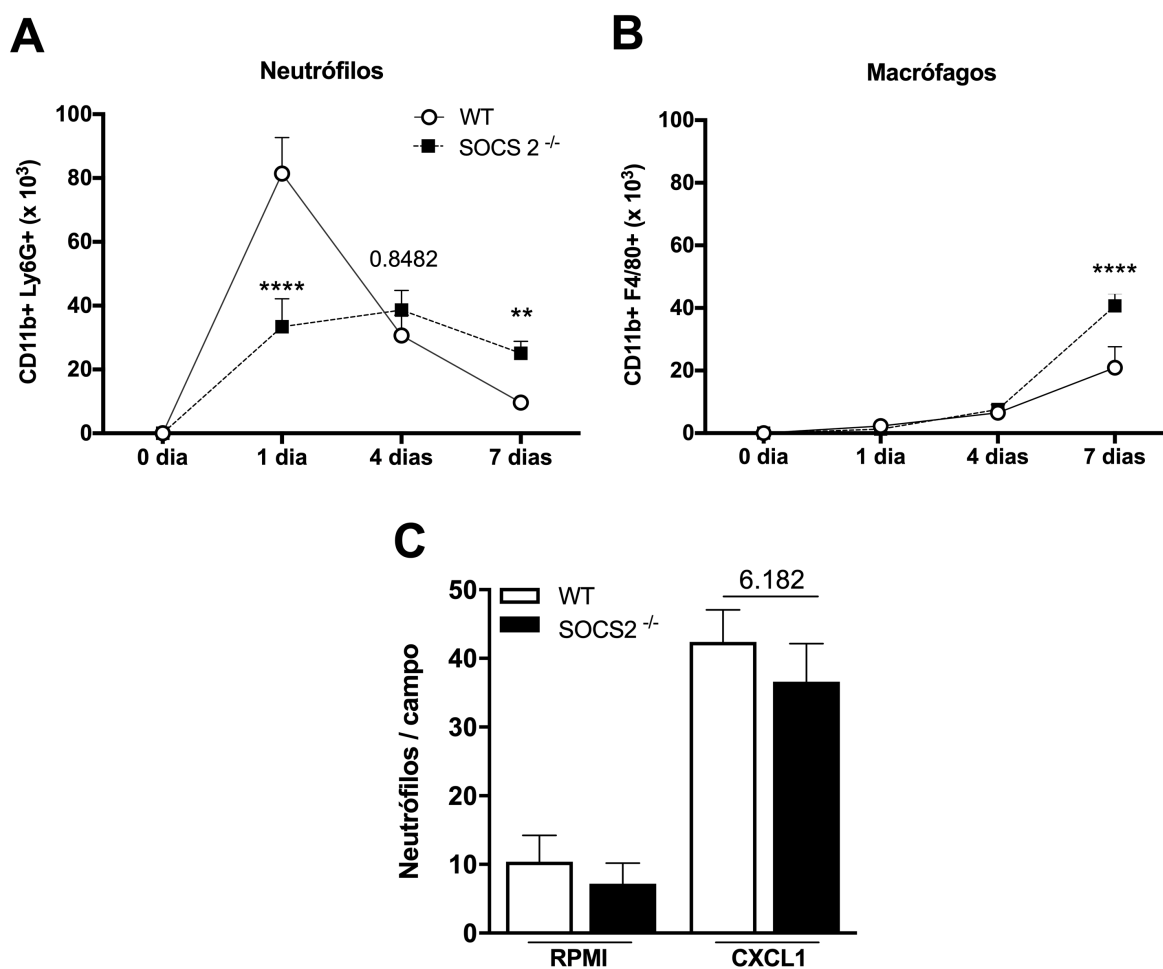


Figura 12. $SOCS2^{-/-}$ expressam mais neutrófilos e macrófagos na fase tardia na AIA. Os camundongos WT e $SOCS2^{-/-}$ foram imunizados e suas cavidades articulares foram desafiadas com mBSA após 14 dias. Após 0 d, 1 d, 4 d e 7 d, as células na lavagem da articulação do joelho foram coradas com combinação de anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo. Neutrófilos da medula óssea de WT e $SOCS2^{-/-}$ foram estimulados com quimiocina CXCL1 ou meio RPMI 1640 (controle). Após 1 h, os neutrófilos aderentes foram analisados por ensaio de câmara de Boyden. (A) Neutrófilos ($CD11b^+ Ly6G^+$); (B) Macrófagos ($CD11b^+ F480^+$) e (C) Neutrófilos aderentes por campo. (n = 3-6). Os dados são expressos como médias \pm SEM em relação ao WT ou $SOCS2^{-/-}$. Diferenças significativas entre

as médias de tratamento foram identificadas com ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. * p <0,05, ** p <0,01 e **** p <0,0001.

4.6 SOCS2 é importante no controle da adesão de leucócitos durante a fase tardia da AIA, e isso é associado ao controle dos níveis de CXCL1

Em seguida, exploramos se SOCS2 interfere na migração de leucócitos durante a inflamação. Para isso, usamos a microscopia intravital para examinar o rolamento e a adesão dos leucócitos nos vasos periarticulares. Camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram maior número de leucócitos aderidos do que os camundongos WT nos dias 1 e 7 após o desafio com mBSA (Figura 13B), porém não alterou o rolamento de leucócitos durante a cinética avaliada (Figura 13A). Os camundongos WT e SOCS2^{-/-} não diferiram em termos de seus níveis de quimiocina CXCL1 nos dias 1 ou 4 após a indução de AIA. Porém, enquanto os níveis de CXCL1 reduziram nos animais WT no dia 7, animais SOCS2^{-/-} mantiveram os níveis elevados, com diferença significativa em relação aos animais WT (Figura 13C). Foram quantificadas também algumas citocinas (IL-1 β , TNF, IL-17, IL-10, IFN- γ), mas sem diferença em animais WT e SOCS2^{-/-} nos tempos estudados (dados não mostrados).

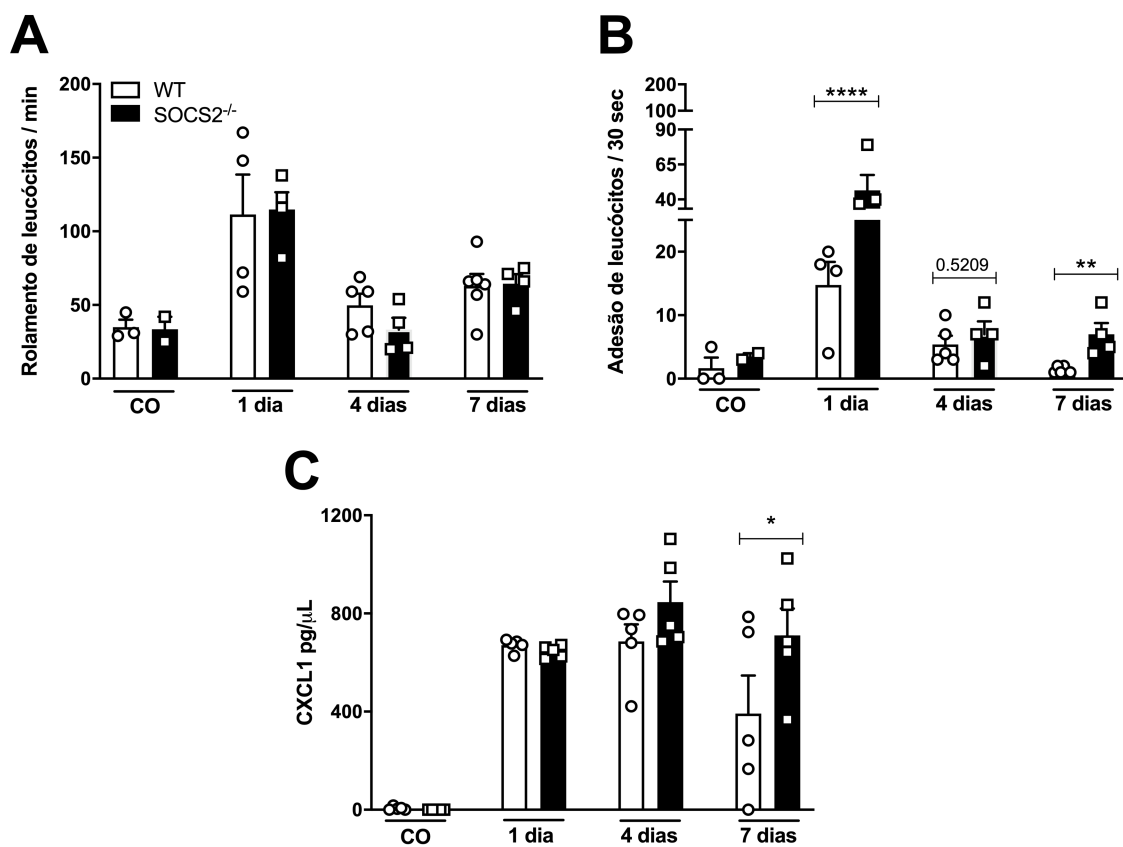
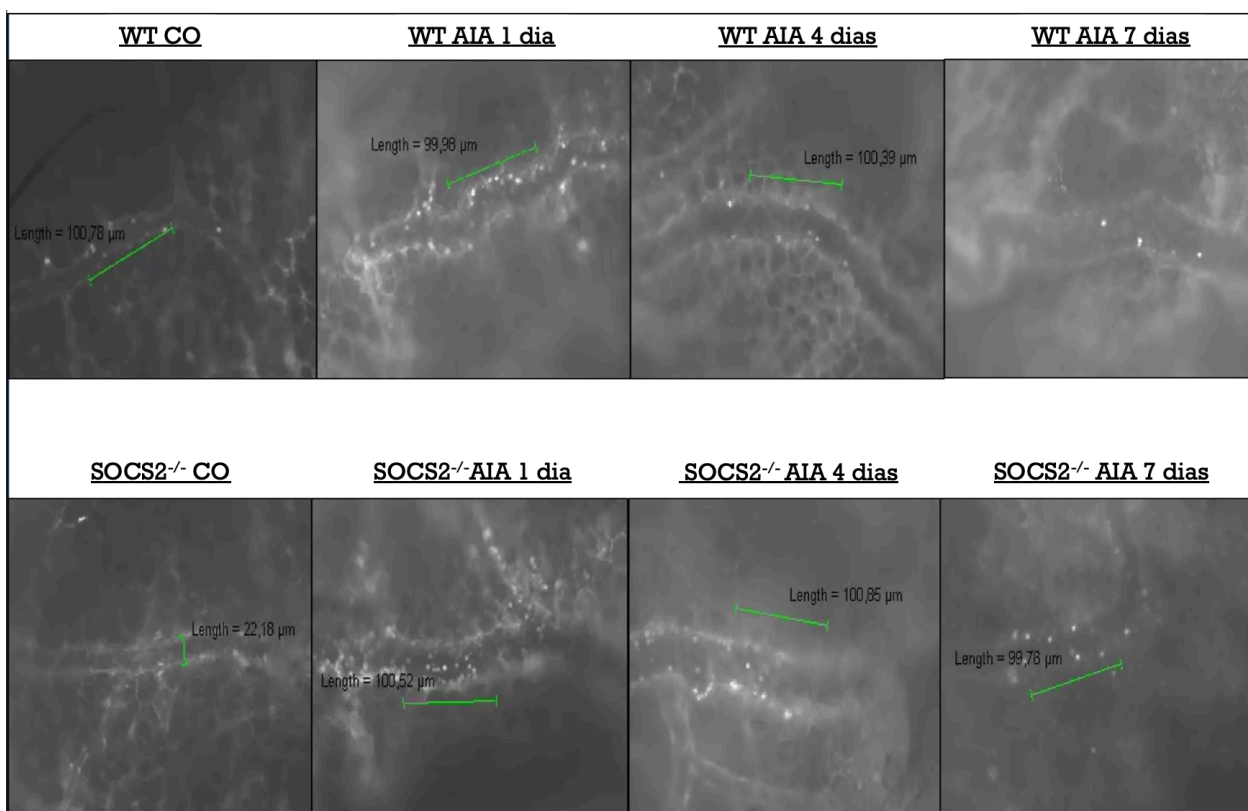


Figura 13. SOCS2 regula a adesão de leucócitos circulantes na microvasculatura articular. Os camundongos SOCS2^{-/-} foram imunizados e suas cavidades articulares foram desafiadas com mBSA após 14 dias. Após 0 d, 1 d, 4 d e 7 d, os camundongos foram anestesiados e foi injetado 100 µL de Rodamina 6G (0,5 mg/mL) intravenoso, foi retirada a pele sobre a articulação, sendo exposta para a avaliação pelo microscópio intravital (ECLIPSE 50i; Nikon). A análise intravital revelou (A) rolagem de leucócitos, (B) adesão de leucócitos e (C) níveis de CXCL1. (n = 3-6). Os dados são expressos como médias ± SEM em relação ao WT ou SOCS2^{-/-}. Diferenças significativas entre as médias de tratamento foram identificadas com ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

4.7 Células da imunidade Adquirida estão aumentadas na fase tardia da AIA

Também foi avaliado o acúmulo de células da imunidade adquirida na cavidade articular. Nos tempos de 1 e 4 dias após a indução de AIA, não houve diferenças em animais SOCS2^{-/-} e WT. Porém, a deficiência de SOCS2 aumento o número de células T CD4⁺ (simples positivo), células T CD4⁺ CD8⁺ (duplo positivo) e CD4⁻CD8⁻ (duplo negativo) na fase tardia de AIA (7 dias) quando comparado com WT (Figuras 14 C, E e F). Não foram observadas diferenças em relação ao número de células T CD8⁺ (simples positivo) e NK entre os grupos em todas os tempos analisados (Figuras 14D e G).

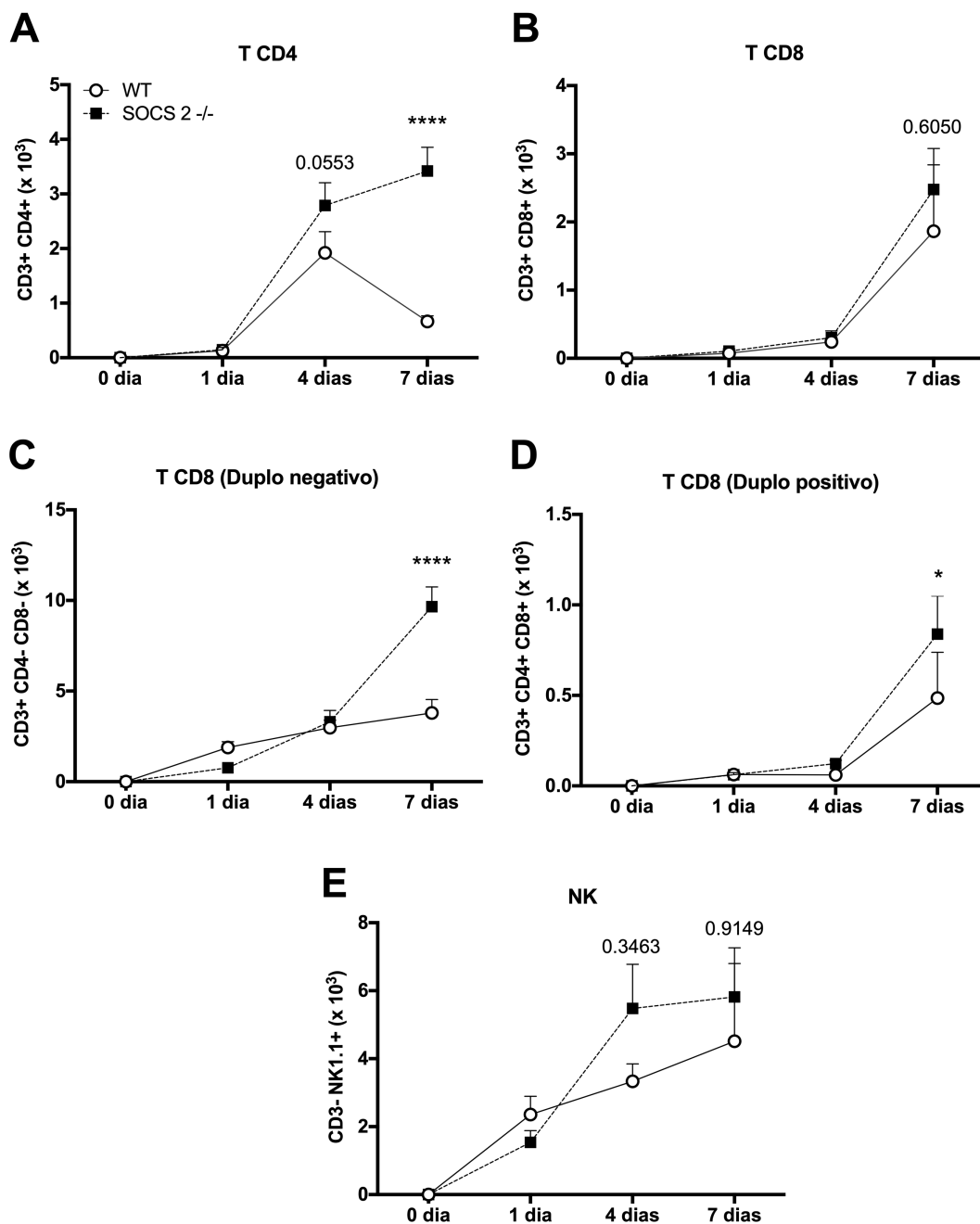


Figura 14. Células imunes adquiridas apresentaram maior infiltrado em camundongos SOCS2^{-/-} após 7 dias de desafio. Os camundongos WT e SOCS2^{-/-} foram imunizados e suas cavidades articulares foram desafiadas com mBSA após 14 dias. Após 0 d, 1 d, 4 d e 7 d, as células na lavagem da articulação do joelho foram coradas com combinação de anticorpos específicos e analisadas por citometria de fluxo. (A) células NK (CD3⁻ NK⁺), (B) células T CD4 (CD3⁺ CD4⁺), (C) células T CD8 (CD3⁺ CD8⁺), (D) células T CD3 duplamente negativas (CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻), (E) células T CD3 duplamente positivas (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺). (n = 3-6). Os dados são expressos como médias ± SEM em relação ao WT ou SOCS2^{-/-}. Diferenças significativas entre as médias de tratamento foram identificadas com ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. * p < 0,05, ** p < 0,01 e **** p < 0,0001.

4.8 Os esplenócitos de camundongos SOCS2^{-/-} são mais responsivos à reestimulação do antígeno

Afim de compreender melhor o aumento do infiltrado de células da imunidade adaptativa após 7 dias de desafio, decidimos avaliar se os esplenócitos em camundongos SOCS2^{-/-} seriam mais responsivos ao estímulo ao antígeno contribuindo para uma inflamação persistente. Após a indução de AIA, os esplenócitos foram cultivados e estimulados com mBSA *ex vivo* e a produção de citocinas no sobrenadante foram analisadas. Nós demonstramos que esplenócitos SOCS2^{-/-} de camundongos apenas imunizados (controle) expressam menor quantidade de IL-17 quando comparado com esplenócitos de WT (Figura 15A) mesmo após serem estimulados com mBSA. Além disso, esplenócitos SOCS2^{-/-} apresentaram menores quantidades de IL-10 (Figura 15C). No entanto, a atividade dos esplenócitos na fase tardia (7 dias) da AIA mostra que as células SOCS2^{-/-} estimuladas com mBSA produziram maiores concentrações de IL-17 e IFN- γ quando comparados com as dos esplenócitos WT (Figuras 15A e B). No entanto, os grupos não diferiram quanto aos níveis de IL-10 nos esplenócitos (Figuras 15C).

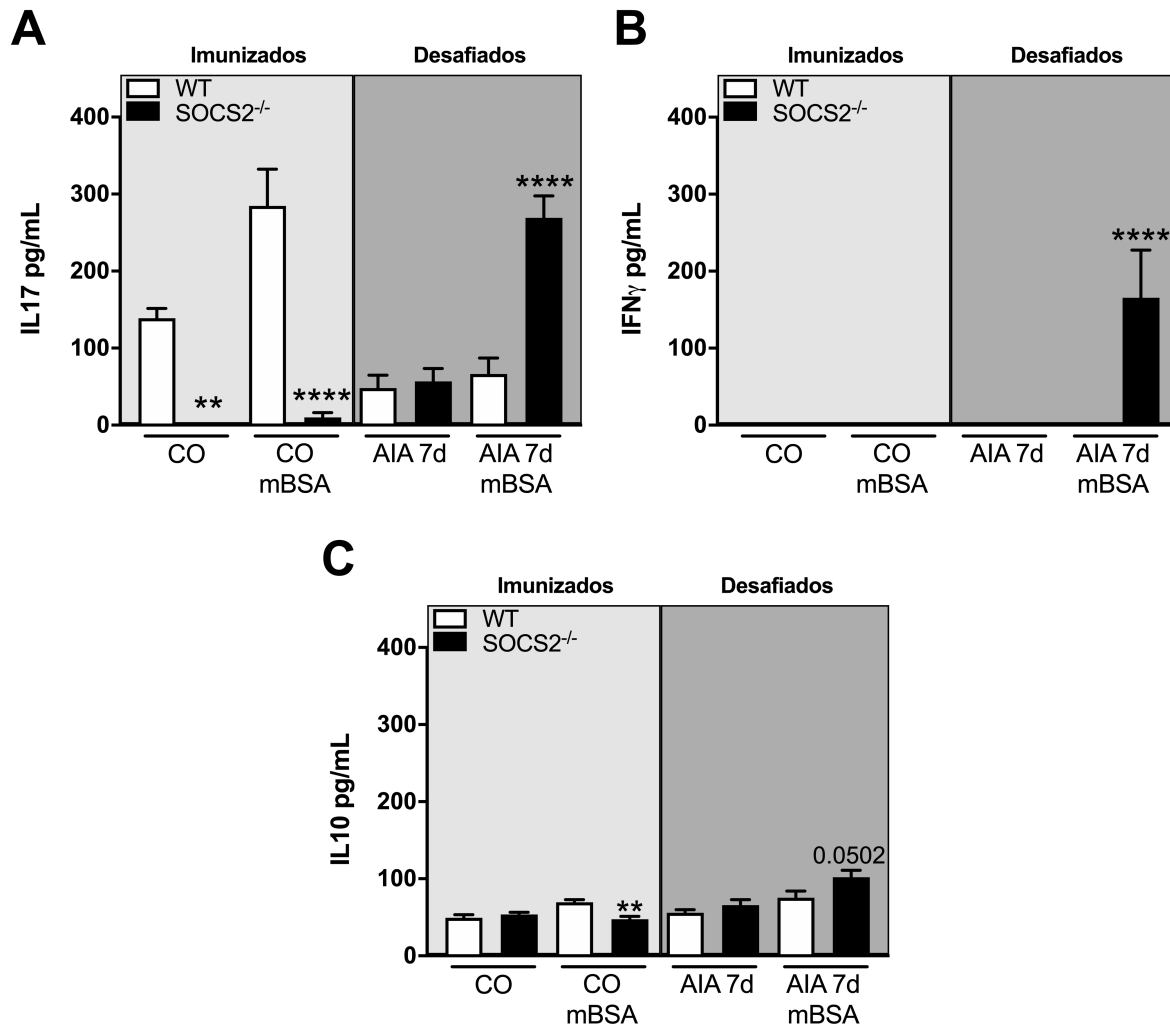


Figura 15. Esplenócitos deficientes de camundongos SOCS2 com AIA produziram níveis mais elevados de IFN- γ e IL-17 (mas não de IL-10) do que esplenócitos de camundongos WT após reestimulação de mBSA *in vitro*. Cavidades articulares de camundongos foram desafiadas com mBSA, (Desafio - AIA) ou solução salina (Imunizado - CO) após 14 dias e os esplenócitos foram isolados após 7 dias de desafio. *In vitro*, os esplenócitos não foram tratados ou foram reestimulados com mBSA. Após 24 h, os níveis de citocinas no sobrenadante foram medidos por ELISA. Nível IL17 (A). Nível de IFN- γ (B). Nível IL10 (C). (n = 3-4). Os dados são expressos como médias \pm SEM em relação ao WT ou SOCS2^{-/-}. Diferenças significativas entre as médias de tratamento foram identificadas com ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. ** p < 0,01 e **** p < 0,0001.

4.9 SOCS2 regula a viabilidade de neutrófilos através da apoptose e eferocitose

Até aqui, demonstramos que camundongos SOCS2^{-/-} apresentam maior adesão de leucócitos e manutenção na expressão de CXCL1 na fase tardia. Diante disso, perguntamos se a

viabilidade dos neutrófilos estaria alterada em camundongos SOCS2^{-/-}. Os neutrófilos apoptóticos apresentam um papel importante na resolução, ajudando na cessação da inflamação principalmente quando são fagocitados por macrófagos em um processo conhecido como eferocitose (GREENLEE-WACKER, 2016). Para isso, foi realizado o lavado articular e sua citocentrifugado para a contagem e avaliação morfológica dos neutrófilos, classificando-os como viáveis ou apoptóticos, bem como a eferocitose. Neutrófilos de camundongos SOCS2^{-/-} tiveram viabilidade prolongada do que os de camundongos WT, especialmente nos dias 4 e 7 após a indução de AIA. Neutrófilos WT foram mais susceptíveis a sofrerem apoptose em relação aos neutrófilos SOCS2^{-/-} (Figura 16A). A Figura 16B mostra que, enquanto os camundongos WT tiveram eferocitose elevada a partir do dia 4 após a indução de AIA, os camundongos SOCS2^{-/-} claramente apresentaram pouca ou nenhuma eferocitose em qualquer momento após a indução de AIA.

Com esses resultados, foram quantificadas importantes moléculas pró-resolutivas no joelho dos animais após a indução de AIA, como a Lipoxina (LX) A4 e a Anexina A1. A LXA4 é um eicosanóide pró-resolutivo que reduz a migração de neutrófilos e promove a apoptose e eferocitose de neutrófilos (EL KEBIR; FILEP, 2013; GREENLEE-WACKER, 2016; MACHADO *et al.*, 2006). Ainda, foi demonstrado que LXA4 induz a expressão de SOCS2 em células dendríticas e em queratinócitos (HU *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2006). Em ambos os camundongos WT e SOCS2^{-/-} com AIA, os níveis LXA₄ demonstraram-se aumentados em comparação com seus controles correspondentes (Figura 16C), porém sem diferença entre eles. Esse dado sugere que SOCS2 tenha um papel importante no processo da resolução através da LXA₄, os quais necessitam serem melhor elucidados.

A Anexina A1 (AnxA1) é uma proteína endógena regulada por glicocorticóides, tendo um papel importante na resolução sendo capaz de contrarregular os eventos inflamatórios restaurando a homeostase (SUGIMOTO, MICHELLE AMANTÉA *et al.*, 2016). Além de apresentar funções importantes na resolução ativando vias de apoptose de neutrófilos e induzindo a reprogramação de macrófagos em direção a um fenótipo de resolução (SUGIMOTO, MICHELLE AMANTÉA *et al.*, 2016; VAGO *et al.*, 2012). Nossos achados demonstraram aumento da expressão de AnxA1 nas fases com maior quantidade de apoptose e eferocitose (4 e 7 dias) em ambos os grupos, porém, sem diferenças entre os animais WT e SOCS2^{-/-} (Figura 16D e E). Estes resultados sugerem que SOCS2 é importante na resolução através da modulação na apoptose e eferocitose de neutrófilos.

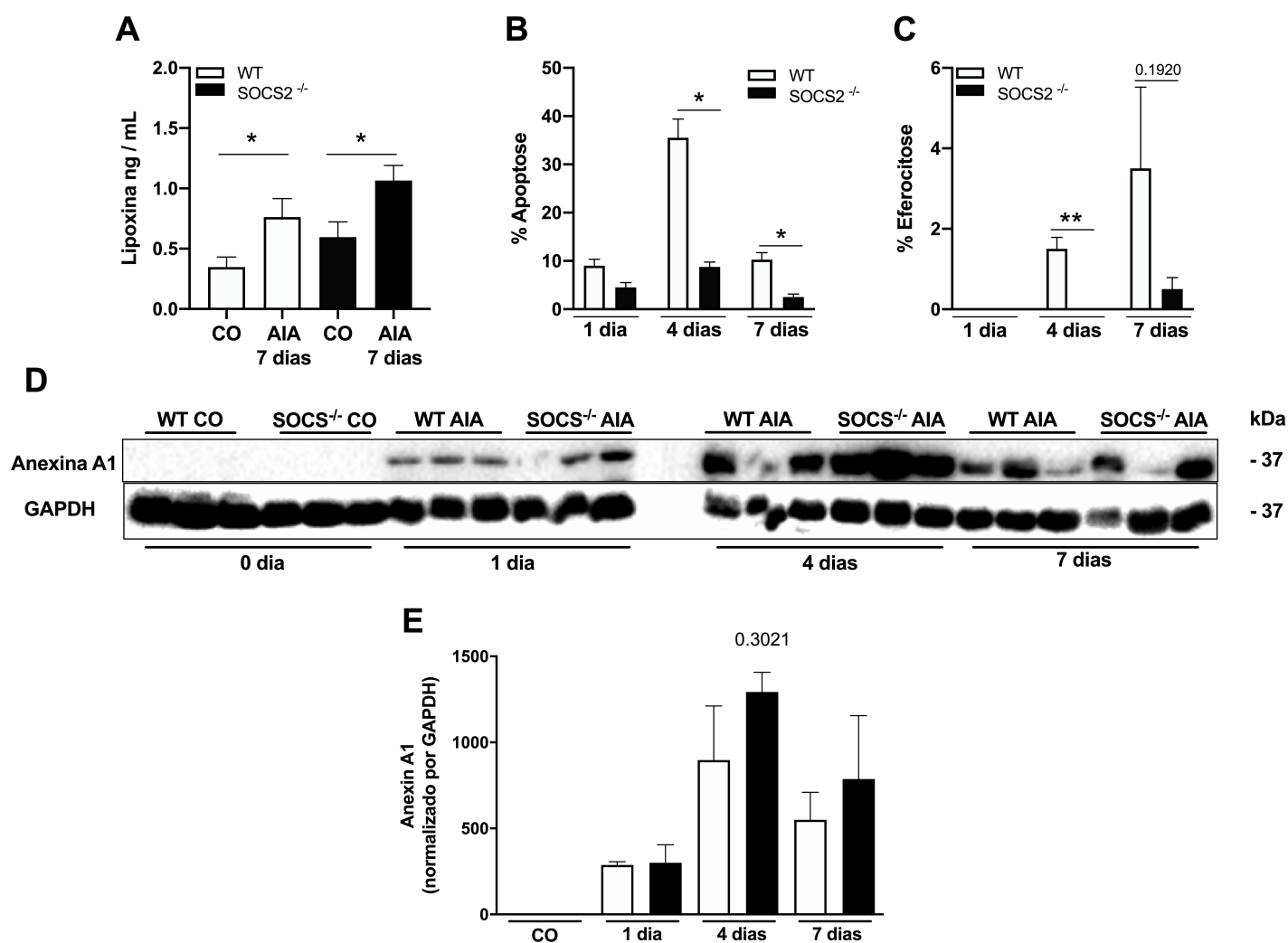


Figura 16. SOCS2 regula a viabilidade dos neutrófilos via apoptose/ferocitose. Os camundongos SOCS2^{-/-} foram imunizados e suas cavidades articulares foram desafiadas com mBSA após 14 dias. Após 0 d, 1 d, 4 d e 7 d, a lavagem da articulação do joelho foi recuperada e analisada pelo Cytospin. (A) Apoptose de neutrófilos e (B) Eferocitose de neutrófilos, (C) Níveis de lipoxina no tecido periarticular, (D) Expressão de Anexina A1 e (E) Normalização de Anexina A1/GAPDH (n = 3-6). Os dados são expressos como médias ± SEM em relação ao WT ou SOCS2^{-/-}. Diferenças significativas entre as médias de tratamento foram identificadas com ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.

Em seguida, fomos explorar se SOCS2 teria um papel importante na atividade dos macrófagos frente a eferocitose *in vitro*, proporcionando uma resolução mais efetiva, como demonstrado nos achados anteriores. Para isso, nós pré-tratamos macrófagos peritoneais de camundongos WT e SOCS2^{-/-} com LXA₄ por 12 h. Timócitos apoptóticos (tratados com 10 μM de Staurosporina por 2 horas) foram marcados com CFSE e co-cultivados com macrófagos na proporção de 3:1 por 1 h. As células foram então marcadas com F4/80 e avaliadas por citometria

de fluxo. Nossos resultados demonstraram que os macrófagos SOCS2^{-/-} apresentaram capacidade eferocítica reduzida, mostrando menor % de células F4/80⁺CFSE⁺, em relação aos macrófagos WT (Figuras 17A e 17B), e menor quantidade de timócitos eferocitados em macrófagos SOCS2^{-/-}, mostrando uma menor intensidade média de fluorescência (MFI) de CFSE em macrófagos F4/80⁺ (Figuras 17C e 17D).

O tratamento com LXA₄ aumentou a capacidade dos macrófagos WT (mas não dos macrófagos SOCS2^{-/-}) de fagocitar timócitos apoptóticos (eferocitose) (Figuras 17A e 17B). Estes resultados indicam que SOCS2 regula a eferocitose de macrófagos influenciando os efeitos a jusante/sinalização de LXA₄ na depuração de células apoptóticas.

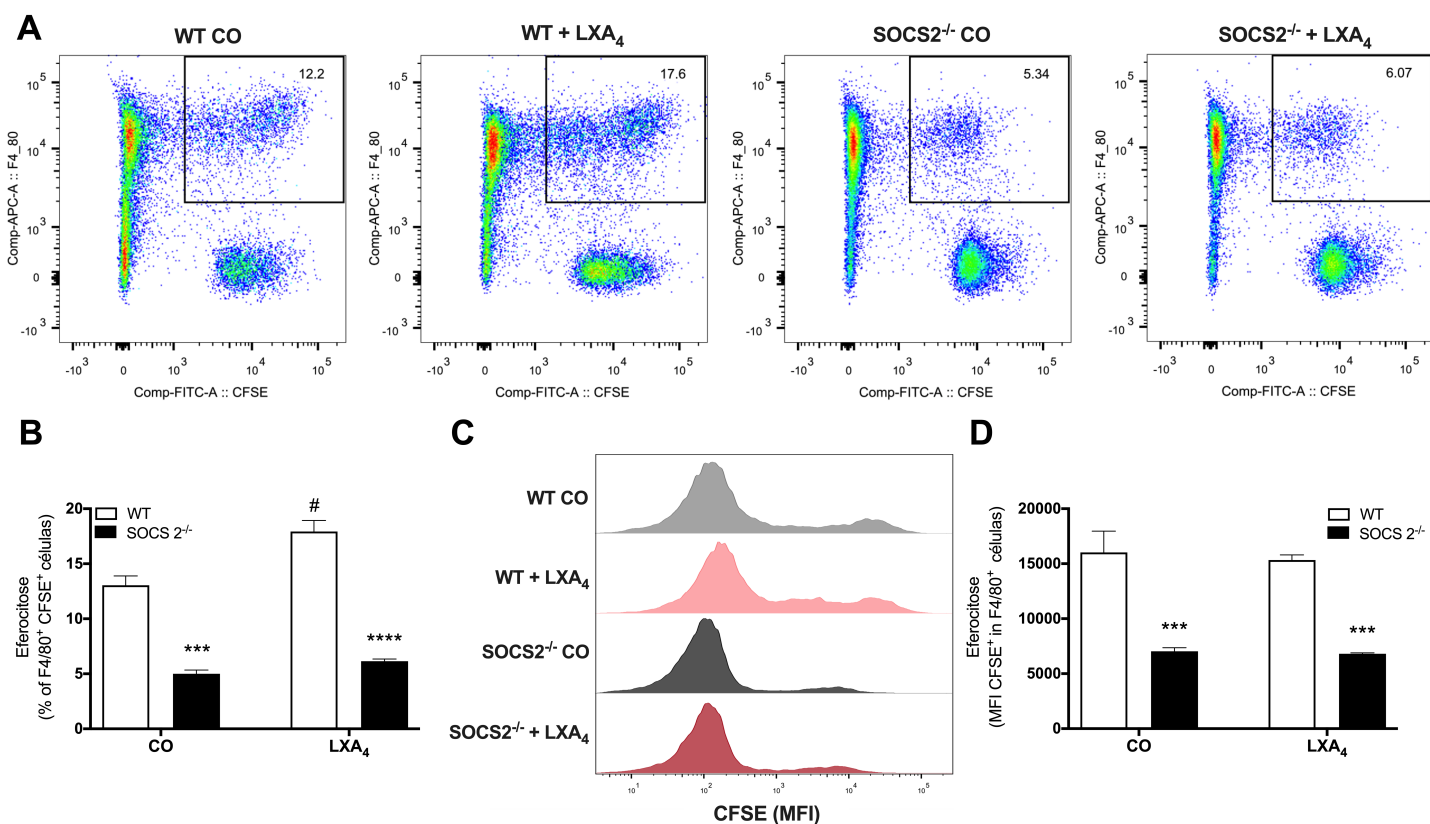


Figure 17. SOCS2 regula a eferocitose de macrófagos. Os macrófagos WT e SOCS2^{-/-} foram recuperados da cavidade peritoneal de camundongo após estímulo com tioglicolato e tratamento com LXA₄ por 12 h. Apoptose induzida em timócitos com estaurosporina (10 μM) por 2h, marcada com CFSE, incubada com macrófagos na proporção de 1:3, lavada com PBS para eliminação de timócitos livres, marcada com F4/80 Alexa 647, e analisada por citometria de fluxo no FACSCanto II. (A) Estratégia de Dot Plot. (B) % de eferocitose. (C) MFI de CFSE (timócitos) em F4/80 (macrófagos). (D) MFI de CFSE. Os dados são expressos como médias ± SEM. #p <0,05 (WT LXA₄ vs. WT CO), *** p <0,001 e **** p <0,0001 WT em relação ao grupo SOCS2^{-/-}, (n = 3). Diferenças significativas entre as médias de tratamento foram identificadas com ANOVA seguida pelo teste t de Student.

4.10 Macrófagos derivados da medula são capazes de expressar e liberar SOCS2 através de vesículas extracelulares após estímulo com LPS

As microvesículas e exossomas são vesículas extracelulares (VE) que vem sendo estudadas ao longo dos últimos anos demonstrando um novo mecanismo de comunicação intercelular, transferindo componentes lipídicos e proteicos celulares para as células alvo. VEs possuem mecanismos importantes nas respostas imunes específicas de antígeno, através da sinalização de moléculas de MHC de classe II e modulando efeitos antiinflamatórios via secreção de TGF- β 1, bem como na sinalização através de corpos apoptóticos (KAKARLA *et al.*, 2020). Recentes estudos mostraram que esses componentes proteicos presentes nas VEs (como Anexina A1) são capazes de modular o fenótipo de macrófagos, penetrar a cartilagem, promovendo o crescimento de condrócitos (HEADLAND; NORLING, 2015; RHYS *et al.*, 2018). Ainda, foi demonstrado que SOCS1 e SOCS3 são liberadas para fora da célula por meio de exossomas e de microvesículas, respectivamente (BOURDONNAY *et al.*, 2015).

Buscando investigar os mecanismos pelos quais SOCS2 poderia ser importante para reduzir a resposta inflamatória e investigar se essas moléculas poderiam ser liberadas por células, como os macrófagos, decidimos avaliar se SOCS2 estaria sendo expresso em microvesículas. Observamos que macrófagos estimulados com LPS (após 6h de estímulo) (Figura 18A e 18B), expressaram SOCS2 nas vesículas secretadas e purificadas nos sobrenadantes dessas células. Esse resultado sugere que SOCS2 tem um papel transcelular e que se faz importante elucidar melhor a atividade dessas microvesículas na modulação da inflamação, como na articulação durante a AIA.

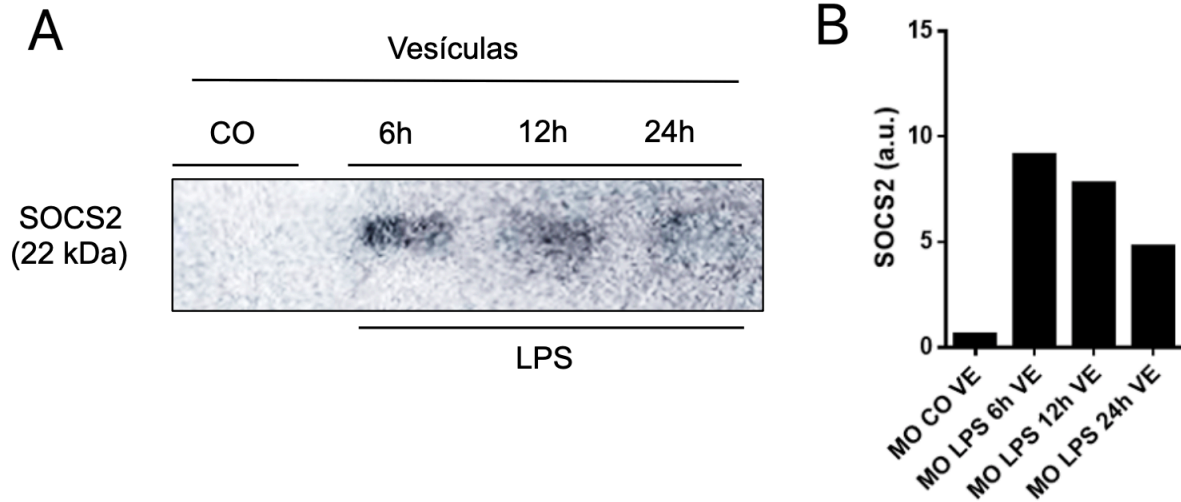


Figura 18. SOCS2 é expresso em microvesículas liberadas por macrófagos WT derivados de medula após estímulo com LPS. Macrófagos (MO) derivados da medula foram diferenciados com RPMI completo (10% SFB e 20% L929). Após uma semana as células foram contadas e plaqueadas em placa de 24 poços (1×10^6 células / poço) e estimuladas com LPS (200 ng/mL) por 6h, 12h e 24 h. Coletou-se o sobrenadante de cada poço e através de um mix (de 4 poços) realizou-se a separação de vesículas extracelulares por ultracentrifugação (Ultra-centrifuga Thermo Scientific™ Sorvall™ WX Floor). Após a extração das vesículas, os macrófagos e as vesículas isoladas foram lisados com tampão de lise para Western Blot. * Por ser um experimento preliminar os resultados plotados mostram valores em simplificada, por isso a ausência de desvio padrão e de estatística.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, investigamos a função de SOCS2 na patogênese de um modelo de artrite aguda em camundongos. Os principais achados são: (i) Os camundongos SOCS2^{-/-} apresentaram maior acúmulo de leucócitos na fase tardia de AIA, com aumento no número de neutrófilos, T CD4⁺, macrófagos e contagens de células T duplamente positivas e duplamente negativas no infiltrado do joelho; (ii) a deficiência de SOCS2 aumentou a gravidade relativa das lesões e danos. Este achado foi consistente com a nocicepção contínua observada na fase da AIA tardia; (iii) esplenócitos de camundongos SOCS2^{-/-} reestimulados com mBSA são mais responsivos na produção de IL-17 e IFN- γ ; (iv) a deficiência de SOCS2 foi associada ao aumento na adesão de leucócitos e produção de CXCL1 na fase AIA tardia; (v) apoptose neutrofilica e eferocitose foram reduzidas em camundongos SOCS2^{-/-} na fase tardia de AIA. (vi) Eferocitose de macrófagos SOCS2^{-/-} é prejudicada mesmo após estimulação com LXA₄.

A ativação das vias JAK1, JAK2, JAK3 e TYK2 são vitais para a sinalização de células imunes e controlam suas respostas a várias citocinas (RIVELLESE *et al.*, 2018; YAN *et al.*, 2018). As vias JAK / STAT, quando desreguladas, aceleram a resposta inflamatória na AR e outras doenças, o qual é mostrado que os inibidores de JAK / STAT são promissores e eficazes como agentes terapêuticos orais contra os sintomas e o desenvolvimento da inflamação da AR (MALEMUD; PEARLMAN, 2009; RIVELLESE *et al.*, 2018; YAN *et al.*, 2018). Tofacitinibe (inibidor de JAK1 / JAK3), baracitinibe (inibidor de JAK1 / JAK2) e upadacitinibe (inibidor de JAK1) são novos agentes terapêuticos anti-AR que demonstraram eficácia em modelos experimentais, atenuando a dor e impedindo a progressão do dano estrutural (BANERJEE *et al.*, 2017a; HARRINGTON; AL NOKHATHA; CONWAY, 2020; MORINOBU, 2020; O'SHEA; GADINA, 2019). No entanto, mais pesquisas são necessárias para estabelecer os perfis gerais de segurança e os riscos globais de efeitos adversos associados a essas pequenas moléculas. Além disso, é necessário encontrar inibidores de JAK específicos/seletivos com toxicidade e efeitos colaterais mitigados (BANERJEE *et al.*, 2017b; O'SHEA; GADINA, 2019; RIVELLESE *et al.*, 2018).

No presente estudo, elucidamos o papel da proteína SOCS2, uma das moléculas inibidoras de JAK2, em um modelo experimental de inflamação articular. A expressão de SOCS2 se mostrou reduzida no tecido articular no pico da inflamação de AIA e não na fase tardia, sugerindo um

retorno às concentrações basais. Um estudo anterior demonstrou que a expressão da proteína SOCS em pacientes com AR, varia com o tipo de célula e dependendo de qual compartimento essas células se encontram. Quando avaliada a expressão de SOCS2 entre as células T e monócitos, foi observado que as células T sinoviais expressam baixos níveis de SOCS2 em relação as células T do sangue periférico, enquanto os macrófagos sinoviais expressam altos níveis da proteína do que os macrófagos do sangue periférico. (ISOMÄKI *et al.*, 2007b). Em outro estudo, através de uma análise estatística multivariada e o escore de atividade da doença DAS28 revelaram que o aumento nos níveis de SOCS2 e SOCS3 foi associada com alta atividade da doença (ORTIZ *et al.*, 2013). Além disso, pacientes com AR tratados com terapia anti-TNF apresentaram redução dos níveis de SOCS2 em suas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) (TSAO; KUO; LIN, 2008).

Aqui, nós demonstramos que os camundongos deficientes em SOCS2 apresentaram aumento da inflamação, perda de cartilagem e mais lesões em suas articulações, com maior atividade nociceptiva durante a fase tardia da AIA, sugerindo a importância de SOCS2 no controle da inflamação e nos danos ao tecido articular. Esses achados apresentam similaridades quando comparado com resultados de Dehlin e colaboradores (DEHLIN *et al.*, 2011), onde após a utilização de um inibidor de fms-tirosina quinase 3 (Sunitinibe), camundongos com AIA apresentaram menor inflamação na cavidade articular, redução da sinovite e menor incidência de perda óssea, bem como a inibição da atividade de células dendríticas e produção de anticorpos. Posterior a esses achados, foi demonstrado que SOCS2 regula negativamente o receptor fms-tirosina quinase 3 (KAZI; RÖNNSTRAND, 2013).

O papel de SOCS2 na nocicepção e nos mecanismos da dor ainda não são bem compreendidos. Em modelos de osteoporose e AR, os inibidores de JAK reduziram a perda óssea, promovendo a atividade dos osteoblastos promovendo a reconstituição e aumentando a massa óssea (ADAM *et al.*, 2020; LABRANCHE *et al.*, 2012). Em um modelo de dor neuropática, avaliando a importância da proteína SOCS3, foi demonstrado que a proteína atenua a hipersensibilidade mecânica (alodinia) (DOMINGUEZ *et al.*, 2010). Portanto, SOCS2 parece ser importante na sinalização de JAK, modulando a nocicepção. Porém, não demonstramos se SOCS2 teria uma participação direta em nociceptores ou se a maior nocicepção em animais SOCS2^{-/-} é uma consequência de uma resposta inflamatória persistente quando comparados aos animais WT. Experimentos adicionais são necessários para elucidar as funções de SOCS2 na regulação da

nocicepção, bem como o papel dessa proteína no controle da perpetuação nociceptiva em gânglios dorsais.

Nossos resultados demonstraram que, na ausência de SOCS2, a adesão de leucócitos e a produção de CXCL1 são desreguladas na fase tardia da AIA, e o recrutamento intensivo de neutrófilos e células T CD4⁺ ocorre na articulação do joelho. Já foi demonstrado que a regulação positiva de CXCL1 e mediadores hiperalgésicos, como TNF e IL-1 β , induzem o acúmulo de neutrófilos e o aumento na atividade nociceptiva (CUNHA *et al.*, 2010; SACHS *et al.*, 2011a), como observamos nos camundongos SOCS2^{-/-}. Em conjunto, foi demonstrado que o desenvolvimento da AIA é dependente de linfócitos T CD4⁺ (mas não de linfócitos T CD8⁺ ou células B), sendo essas cruciais, pois regulam a produção de citocinas osteoclastogênicas e a diferenciação de osteoclastos da medula óssea induzida pela inflamação (WONG *et al.*, 2006), sugerindo assim que SOCS2 tem um papel importante na regulação TCD4 durante a fase de resolução da AIA, corroborando para a remissão da inflamação. Em modelo de CIA e CAIA utilizando um inibidor seletivo de JAK2, foi demonstrado que o tratamento por via oral apresentam menor frequência de células Th1 no baço, reduzindo os níveis de citocinas como IL-12, TNF e IFN- γ , corroborando com uma menor edema e dano na pata dos camundongos tratados (STUMP *et al.*, 2011).

Estudos prévios demonstraram que proteínas SOCS apresentavam um papel importante na retenção e controle dos leucócitos, onde a sinalização de CXCL12 aumentavam a expressão dessas proteínas que bloqueavam CXCR4 inibindo a mobilização de células precursoras hematopoiéticas (PELLO *et al.*, 2006). Recentemente foi demonstrado em neutrófilos que fatores de crescimento e citocinas como GM-CSF e IL-4 impulsionam a expressão de SOCS2 (RATTHÉ *et al.*, 2007). Recentemente, nosso grupo demonstrou que SOCS2 controla o recrutamento de neutrófilos e a atividade dos neutrófilos durante a insuficiência hepática induzida por paracetamol (APAP) (MONTI-ROCHA *et al.*, 2019). Camundongos deficientes em SOCS2 apresentaram aumento da infiltração de neutrófilos e necrose hepática no estágio tardio da doença (MONTI-ROCHA *et al.*, 2019). Avaliando de forma terapêutica através da inibição das vias JAK/STATs durante o modelo experimental de artrite induzida por colágeno, o tofacitinibe regulou negativamente o CXCL1 e bloqueou a migração de leucócitos (GHORESCHI *et al.*, 2011). Tomados em conjunto com nossos resultados fica claro que SOCS2 pode desempenhar papéis importantes na regulação da quimiotaxia celular na atividade neutrofilica, controlando a inflamação durante a AIA.

Nossos resultados também demonstraram que SOCS2 modula a produção de citocinas em esplenócitos. Nós mostramos que esplenócitos SOCS2^{-/-} apresentaram níveis baixos de expressão de IL-17 em resposta ao desafio com mBSA. No entanto, esplenócitos isolados durante a fase tardia da AIA, expressaram altos níveis de IL-17 e IFN- γ quando reestimulados com mBSA. Já foi mostrado que a IL-17 contribui para o desenvolvimento de AIA por meio da mediação da hipernocicepção articular, e que o desafio com IL-17 em camundongos aumenta os níveis da produção de TNF, IL-1 β e CXCL1 nas articulações (EBBINGHAUS *et al.*, 2017; PINTO *et al.*, 2010). Recentemente, demonstramos que camundongos deficientes em SOCS2 com encefalomielite autoimune experimental apresentam escores inflamatórios e patológicos reduzidos no pico da doença, mas aumentam a inflamação e o número de células CD4⁺ IFN- γ ⁺ infiltradas na fase EAE tardia, causando lesões irreversíveis no Sistema Nervoso Central, os quais não conseguiram se recuperar do comprometimento locomotor (CRAMER *et al.*, 2019). Nosso grupo também demonstrou que camundongos SOCS2^{-/-} com malária cerebral mostram uma resistência inicial à produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-12 e IL-17), mas aumentam a geração de células Th1 e Th17 na fase tardia da doença (BRANT *et al.*, 2016). Paralelamente, recente estudo mostrou que SOCS2 é importante para manter FoxP3 estável em células Treg induzíveis (iTregs) por regulação negativa da sinalização de IL-4, mostrando que iTregs Foxp3⁺ SOCS2^{-/-} secretam níveis elevados de IFN- γ e IL-13 (KNOSP *et al.*, 2013). Da mesma forma, a proteína SOCS1 também mostrou desempenhar um papel importante na função das células Treg, mantendo a expressão de Foxp3 e suprimindo a produção de IFN- γ e IL-17 (TAKAHASHI *et al.*, 2011). Esses dados corroboram com nossos achados na cultura de esplenócitos.

Além de mostrarmos o aumento do infiltrado de células T CD4⁺, observamos um aumento no aparecimento de células CD4⁺CD8⁺ duplamente positivas (DP) e CD4⁺CD8⁻ (DN) duplamente negativas presentes no lavado articular de camundongos SOCS2^{-/-}. Esse resultado sugere que SOCS2 pode participar na geração, diferenciação, expansão e a migração dessas células durante a progressão da AIA. De fato, as proteínas SOCS atuam no controle da evasão das células hematopoiéticas para a periferia por meio do bloqueio de CXCR4 (PELLO *et al.*, 2006). Além disso, vários estudos já demonstraram que as células T DP e DN estão presentes no sangue de indivíduos saudáveis e aumentam sua frequência periférica durante o desenvolvimento de infecções e doenças autoimunes, como na AR (BRANDT; HEDRICH, 2018; CRISPÍN *et al.*, 2008; FRAHM *et al.*, 2012; MENG *et al.*, 2019; PAREL *et al.*, 2007). Pacientes com AR têm

maior quantidade de células T DP na sinóvia, associada com um aumento de IL-21 e IL-4, implicando em um possível papel como células T auxiliares (QUANDT *et al.*, 2014).

Nossos dados mostraram que, na ausência de SOCS2, há uma desregulação da resposta inflamatória e acúmulo intensivo de leucócitos no tecido articular. Essas respostas resultaram em graves danos locais e perda de função. A persistência da inflamação é negativamente regulada tanto por moléculas anti-inflamatórias quanto por pró-resolutivas, como os mediadores LXA₄ e AnX A1. Ainda, a morte de leucócitos por apoptose e sua subsequente remoção por eferocitose de macrófagos são pontos cruciais para a transição da fase resolutiva (ALESSANDRI *et al.*, 2013; BUDAI *et al.*, 2019; FATTORI; AMARAL; VERRI, 2016). Nossos resultados demonstraram que SOCS2 pode ter participação importante na atividade de resolução da inflamação, pois camundongos deficientes em SOCS2 tiveram menos apoptose e eferocitose do que os camundongos WT na fase tardia de AIA. No entanto, ambos os grupos tinham níveis similares de LXA₄ presentes no tecido articular. Esses achados na redução dos mecanismos resolutivos em camundongos SOCS2^{-/-} podem ser responsáveis pelo aumento e acúmulo de leucócitos observados nas articulações. Nós mostramos, em trabalhos anteriores, que a LXA₄ regula positivamente a expressão de SOCS2 em células dendríticas que, por sua vez, regulam a produção de citocinas/quimiocinas e a migração celular (MACHADO *et al.*, 2006). A LXA₄ tem o papel importante em atenuar a inflamação induzida por neutrófilos, ativa a apoptose, aumenta a fagocitose dos macrófagos e ajuda a resolver a inflamação (GODSON *et al.*, 2000b; PRIETO *et al.*, 2010). As LXAs são mediadores lipídicos pró-resolutivos que promovem a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos. Esse processo é vital na resolução e na eliminação da inflamação (MITCHELL *et al.*, 2002). No presente estudo, os macrófagos SOCS2^{-/-} exibiram redução da eferocitose *in vitro*. Além disso, a estimulação de LXA₄ não alterou a capacidade eferocítica dos macrófagos SOCS2^{-/-} quando comparados com macrófagos WT, mostrando, pela primeira vez, que SOCS2 pode ter um papel importante na resolução e na capacidade eferocítica em macrófagos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo demonstraram que o SOCS2 desempenha papéis importantes na AIA, equilibrando a infiltração e lesão das células inflamatórias, resolvendo a inflamação por meio do controle da apoptose e da eliminação das células apoptóticas durante as fases finais da AIA. Mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual SOCS2 participa do desenvolvimento da AR. No entanto, nosso trabalho oferece *insights* sobre os mecanismos de sinalização envolvidos na lesão induzida por AR e propõe novas funções de SOCS2 na resolução a serem elucidados.

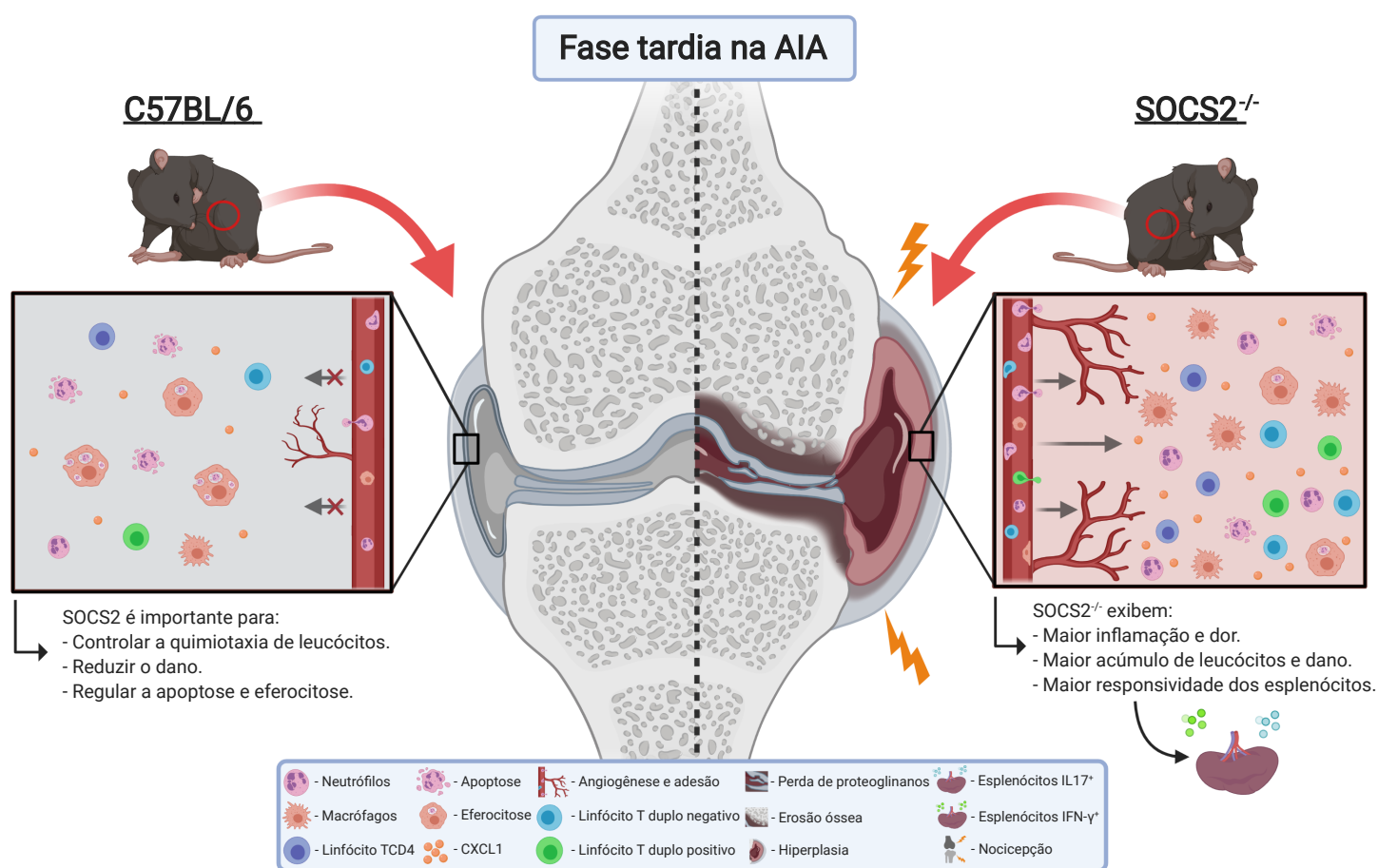


Figura 20 - Representação esquemática do papel de SOCS2 no desenvolvimento da AIA. Camundongos SOCS2^{-/-} demonstraram um aumento do acúmulo de neutrófilos, macrófagos, células TCD4 e células T duplo-positivas e duplo-negativas na cavidade sinovial em resposta ao desenvolvimento da AIA durante a fase de resolução da inflamação. Houve aderência leucocitária intensa na microvasculatura

articular e altos níveis da quimiocina CXCL1 durante as fases tardias da AIA. Mostramos que o SOCS2^{-/-} aumentou a hipernocicepção, o dano ao tecido e a perda de proteoglicanos durante as fases tardias da AIA. Na fase tardia, os esplenócitos SOCS2^{-/-} estimulados *in vitro* com mBSA exibiram regulação positiva de IL-17 e IFN- γ , mas não de IL-10. A resolução demonstrou que os camundongos SOCS2^{-/-} tiveram relativamente menos apoptose e eferocitose durante a fase tardia da AIA, mas os mesmos níveis de lipoxina A4 que os camundongos WT. Para avaliar a capacidade dos macrófagos de eferocitar células apoptóticas, mostramos que os macrófagos SOCS2^{-/-} têm comparativamente menor capacidade de eferocitose. Além disso, o tratamento com lipoxina não alterou sua capacidade de engolfar células apoptóticas. Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que o SOCS2 é vital para a resolução e função dos macrófagos no processo de eliminação da inflamação (Created with BioRender.com).

ANEXO I (Aprovação CEUA – Comissão de ética no uso de animais)

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 333/2018 Título do projeto: O papel de SOCS2 durante a Artrite Induzida por Antígeno Finalidade: Pesquisa Pesquisador responsável: Flavio Almeida Amaral Unidade: Instituto de Ciencias Biologicas Departamento: Departamento de Bioquimica e Imunologia	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião do dia 26/11/2018. Validade: 26/11/2018 à 25/11/2023	
Belo Horizonte, 26/11/2018.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br	

ANEXO II (Artigo submetido)

Role of Suppressor of Cytokine Signaling 2 in Experimental Arthritis

Allysson Cramer^a, Izabela Galvão^b, Natália Venturini de Sá^a, Paulo Gaio Leite^a, Nathália Melo^a,
Mariana Rates^a, Gabriel Campolina^a, Bruno Valiate^a, Fernanda Rezende Souza^c, Geovanni Cassali^c,
Mauro Martins Teixeira^{a,d}, Flávio Almeida Amaral^{a,&,*}, Fabiana Simão Machado^{a,d,&,*}

^a Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Science, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Centre for Inflammation, Centenary Institute and University of Technology Sydney, Sydney, New South Wales, Australia.

^c Department of Pathology, Institute of Biological Science, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^d Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine/Interdisciplinary Laboratory of Medical Investigation, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

[&]These authors contributed equally to this manuscript.

***Corresponding authors:**

Fabiana Simão Machado

Email: machadofs@icb.ufmg.br

Flávio Almeida Amaral:

Email: dr.famaral@gmail.com

8 REFERÊNCIAS

ADAM, Susanne *et al.* JAK inhibition increases bone mass in steady-state conditions and ameliorates pathological bone loss by stimulating osteoblast function. *Science Translational Medicine*, v. 12, n. 530, 12 fev. 2020.

ALESSANDRI, Ana L. *et al.* Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology and Therapeutics*. [S.l.]: Pharmacol Ther. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23583354/>>. Acesso em: 20 maio 2021. , ago. 2013

ALETAHA, Daniel; SMOLEN, Josef S. *Diagnosis and Management of Rheumatoid Arthritis: A Review. JAMA - Journal of the American Medical Association*. [S.l.]: American Medical Association. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30285183/>>. Acesso em: 17 maio 2021. , 2 out. 2018

ARNARDOTTIR, Hildur H. *et al.* Resolvin D3 Is Dysregulated in Arthritis and Reduces Arthritic Inflammation. *The Journal of Immunology*, v. 197, n. 6, p. 2362–2368, 15 set. 2016. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1502268>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

ATKINSON, Sara Marie; NANSEN, Anneline. *Pharmacological Value of Murine Delayed-type Hypersensitivity Arthritis: A Robust Mouse Model of Rheumatoid Arthritis in C57BL/6 Mice. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. [S.l.]: Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27553641/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 fev. 2017

BANERJEE, Shubhasree *et al.* JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. *Drugs*. [S.l.]: Springer International Publishing. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28255960/>>. Acesso em: 24 maio 2021a. , 1 abr. 2017

BANERJEE, Shubhasree *et al.* JAK–STAT Signaling as a Target for Inflammatory and Autoimmune Diseases: Current and Future Prospects. *Drugs*. [S.l.]: Springer International Publishing. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28255960/>>. Acesso em: 14 jun. 2021b. , 1 abr. 2017

BARROSO, Livia C. *et al.* Angiotensin-(1-7) promotes resolution of neutrophilic inflammation in a model of antigen-induced arthritis in mice. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. NOV, 20 nov. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29209329/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

BARTOK, Beatrix; FIRESTEIN, Gary S. *Fibroblast-like synoviocytes: Key effector cells in rheumatoid arthritis. Immunological Reviews*. [S.l.]: NIH Public Access. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20100000/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , jan. 2010

BERNARDINI, Giovanni *et al.* The Multifunctional Role of the Chemokine System in Arthritogenic Processes. *Current Rheumatology Reports*. [S.l.]: Current Medicine Group LLC 1. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28265846/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 mar.

2017

BESSIS, Natacha *et al.* *Arthritis models: usefulness and interpretation. Seminars in Immunopathology*. [S.l.]: Springer Verlag. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28349194/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 jun. 2017

BONNEFOY, Francis *et al.* Factors produced by macrophages eliminating apoptotic cells demonstrate pro-resolutive properties and terminate ongoing inflammation. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. NOV, p. 2586, 13 nov. 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 29 jun. 2021.

BORTOLUZZI, Alessandra *et al.* *One year in review 2018: novelties in the treatment of rheumatoid arthritis - PubMed*. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29798748/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

BOURDONNAY, Emilie *et al.* Transcellular delivery of vesicular SOCS proteins from macrophages to epithelial cells blunts inflammatory signaling. *Journal of Experimental Medicine*, v. 212, n. 5, p. 729–742, 4 maio 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25847945/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

BRACKERTZ, Dieter; MITCHELL, Graham F.; MACKAY, Ian R. Antigen-induced arthritis in mice. *Arthritis & Rheumatism*, v. 20, n. 3, p. 841–850, 1977. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/857805/>>. Acesso em: 13 jun. 2021.

BRANDT, D.; HEDRICH, C. M. *TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4–CD8– (double negative) T cells in autoimmunity. Autoimmunity Reviews*. [S.l.]: Elsevier B.V. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29428806/>>. Acesso em: 17 maio 2021. , 1 abr. 2018

BRANT, Fatima *et al.* Suppressor of cytokine signaling 2 modulates the immune response profile and development of experimental cerebral malaria. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 54, p. 73–85, 1 maio 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26765997/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

BUDAI, Zsófia *et al.* Macrophages engulf apoptotic and primary necrotic thymocytes through similar phosphatidylserine-dependent mechanisms. *FEBS Open Bio*, v. 9, n. 3, p. 446–456, 1 mar. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30868053/>>. Acesso em: 24 maio 2021.

CAPORALI, Roberto; ZAVAGLIA, Daniela. Real-world experience with tofacitinib for the treatment of rheumatoid arthritis - PubMed. *Clin Exp Rheumatol.*, v. 37, n. 3, p. 485–495, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30183607/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

CATRINA, Anca I. *et al.* *Mechanisms leading from systemic autoimmunity to joint-specific disease in rheumatoid arthritis. Nature Reviews Rheumatology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27974851/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 fev. 2017

CHATZIDIONYSIOU, Katerina *et al.* Efficacy of glucocorticoids, conventional and targeted synthetic disease-modifying antirheumatic drugs: A systematic literature review informing the 2016 update of the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 76, n. 6, p. 1102–1107, 1 jun. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28356243/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

CHAUDHARI, Kritika; RIZVI, Salman; SYED, Basharat A. *Rheumatoid arthritis: Current and future trends*. *Nature Reviews Drug Discovery*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27080040/>>. Acesso em: 17 maio 2021. , 1 maio 2016

CHOUDHARY, Narayan; BHATT, Lokesh K.; PRABHAVALKAR, Kedar S. *Experimental animal models for rheumatoid arthritis*. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. , 4 maio 2018

CHOY, Ernest H. *Clinical significance of Janus Kinase inhibitor selectivity*. *Rheumatology (Oxford, England)*. [S.l.]: NLM (Medline). Disponível em: <<https://academic.oup.com/rheumatology/article/58/6/953/5224985>>. Acesso em: 30 jun. 2021. , 1 jun. 2019

CIOBANU, Dana *et al.* JAK/STAT pathway in pathology of rheumatoid arthritis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 20, n. 4, p. 3498, 9 jul. 2020. Disponível em: <</pmc/articles/PMC7465448/>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

COELHO, Fernanda M. *et al.* The chemokine receptors CXCR1/CXCR2 modulate antigen-induced arthritis by regulating adhesion of neutrophils to the synovial microvasculature. *Arthritis and Rheumatism*, v. 58, n. 8, p. 2329–2337, ago. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18668539/>>. Acesso em: 24 maio 2021.

CRAMER, Allysson *et al.* Role of SOCS2 in the Regulation of Immune Response and Development of the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Mediators of Inflammation*, v. 2019, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31949423/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

CRISPÍN, José C. *et al.* Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 12, p. 8761–8766, 15 dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19050297/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

CRONSTEIN, Bruce N.; AUNE, Thomas M. *Methotrexate and its mechanisms of action in inflammatory arthritis*. *Nature Reviews Rheumatology*. [S.l.]: Nature Research. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/>>. Acesso em: 10 jun. 2021. , 1 mar. 2020

CUI, Meiling *et al.* The suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) inhibits tumor metastasis in hepatocellular carcinoma. *Tumor Biology*, v. 37, n. 10, p. 13521–13531, 1 out. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27465557/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

CUNHA, Thiago M. *et al.* Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1 β maturation. *Molecular Pain*, v. 6, 4 out. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20920345/>>. Acesso em: 20 maio 2021.

DARNELL, James E.; KERR, Ian M.; STARK, George R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, v. 264, n. 5164, p. 1415–1421, 3 jun. 1994. Disponível em: <<https://science.sciencemag.org/content/264/5164/1415>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

DEHLIN, Mats *et al.* Inhibition of fms-like tyrosine kinase 3 alleviates experimental arthritis by reducing formation of dendritic cells and antigen presentation. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 90, n. 4, p. 811–817, out. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21771900/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

DHILLON, Sohita. Tofacitinib: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs*, v. 77, n. 18, p. 1987–2001, 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29139090/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

DINARELLO, Charles A. *Historical insights into cytokines. European Journal of Immunology*. [S.l.]: NIH Public Access. Disponível em: <</pmc/articles/PMC3140102/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , nov. 2007

DING, James; OROZCO, Gisela. *Identification of rheumatoid arthritis causal genes using functional genomics. Scandinavian Journal of Immunology*. [S.l.]: Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/sji.12753>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 maio 2019

DOMINGUEZ, Elisa *et al.* SOCS3-mediated blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal cord neuroinflammation and mechanical allodynia after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 16, p. 5754–5766, 21 abr. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20410127/>>. Acesso em: 19 maio 2021.

EBBINGHAUS, Matthias *et al.* Interleukin-17A is involved in mechanical hyperalgesia but not in the severity of murine antigen-induced arthritis. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2017. Disponível em: <www.nature.com/scientificreports>. Acesso em: 24 maio 2021.

EL KEBIR, Driss; FILEP, János. Targeting Neutrophil Apoptosis for Enhancing the Resolution of Inflammation. *Cells*, v. 2, n. 2, p. 330–348, 22 maio 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24709704/>>. Acesso em: 24 maio 2021.

FATTORI, Victor; AMARAL, Flavio A.; VERRI, Waldiceu A. *Neutrophils and arthritis: Role in disease and pharmacological perspectives. Pharmacological Research*. [S.l.]: Academic Press. , 1 out. 2016

FELIX, Franciel Batista *et al.* Biochanin A Regulates Key Steps of Inflammation Resolution in a Model of Antigen-Induced Arthritis via GPR30/PKA-Dependent Mechanism. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, 26 abr. 2021. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.662308/full>>. Acesso em: 24 maio 2021.

FENG, Yi *et al.* *Potential roles of suppressor of cytokine signaling in wound healing. Regenerative Medicine*. [S.l.]: Future Medicine Ltd. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/rme.16.4>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 mar. 2016

FRAHM, Marc A. *et al.* CD4 + CD8 + T Cells Represent a Significant Portion of the Anti-HIV T Cell Response to Acute HIV Infection . *The Journal of Immunology*, v. 188, n. 9, p. 4289–4296, 1 maio 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22461689/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

GADINA, Massimo *et al.* *Translational and clinical advances in JAK-STAT biology: The present and future of jakinibs. Journal of Leukocyte Biology*. [S.l.]: John Wiley and Sons Inc. , 1 set. 2018

GERMANO, Jaqueline L. *et al.* *Prevalence of rheumatoid arthritis in South-America: A systematic review and meta-analysis - Artigos - Revista Ciência & Saúde Coletiva*. Disponível em: <<https://www.cienciaesaudecoletiva.com.br/artigos/prevalence-of-rheumatoid-arthritis-in-southamerica-a-systematic-review-and-metaanalysis/17571?id=17571>>. Acesso em: 10 jun. 2021.

GHORESCHI, Kamran *et al.* Modulation of Innate and Adaptive Immune Responses by Tofacitinib (CP-690,550). *The Journal of Immunology*, v. 186, n. 7, p. 4234–4243, 1 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/186/7/4234>>. Acesso em: 24 maio 2021.

GODSON, Catherine *et al.* Cutting Edge: Lipoxins Rapidly Stimulate Nonphlogistic Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Monocyte-Derived Macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 4, p. 1663–1667, 15 fev. 2000a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10657608/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

GODSON, Catherine *et al.* Cutting Edge: Lipoxins Rapidly Stimulate Nonphlogistic Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils by Monocyte-Derived Macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 4, p. 1663–1667, 15 fev. 2000b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10657608/>>. Acesso em: 12 jun. 2021.

GREENLEE-WACKER, Mallery C. *Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. Immunological Reviews*. [S.l.]: Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26500862/>>. Acesso em: 9 jun. 2021. , 1 set. 2016

GRESPLAN, Renata *et al.* CXCR2-specific chemokines mediate leukotriene B4-dependent recruitment of neutrophils to inflamed joints in mice with antigen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 58, n. 7, p. 2030–2040, jul. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18576322/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

GRÖTSCH, Bettina; BOZEC, Aline; SCHETT, Georg. In vivo models of rheumatoid arthritis. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.]: Humana Press Inc., 2019. v. 1914. p. 269–280. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30729470/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

HARRINGTON, Robert; AL NOKHATHA, Shamma Ahmad; CONWAY, Richard. *Jak inhibitors in rheumatoid arthritis: An evidence-based review on the emerging clinical data*. *Journal of Inflammation Research*. [S.l.]: Dove Medical Press Ltd. Disponível em: <<http://doi.org/10.2147/JIR.S219586>>. Acesso em: 19 maio 2021. , 14 set. 2020

HEADLAND, Sarah E.; NORLING, Lucy V. *The resolution of inflammation: Principles and challenges*. *Seminars in Immunology*. [S.l.]: Academic Press. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25911383/>>. Acesso em: 13 jun. 2021. , 1 maio 2015

HOEFER, Julia *et al.* SOCS2 correlates with malignancy and exerts growth-promoting effects in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, v. 21, n. 2, p. 175–187, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24280133/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

HORVAT, Simon; MEDRANO, Juan F. Lack of Socs2 expression causes the high-growth phenotype in mice. *Genomics*, v. 72, n. 2, p. 209–212, 1 mar. 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11401434/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

HU, Feng *et al.* Lipoxin A4 inhibits lipopolysaccharide-induced production of inflammatory cytokines in keratinocytes by up-regulating SOCS2 and down-regulating TRAF6. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, v. 35, n. 3, p. 426–431, 15 jun. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26072084/>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

INOMATA, Kei *et al.* Time course analyses of structural changes in the infrapatellar fat pad and synovial membrane during inflammation-induced persistent pain development in rat knee joint. *BMC Musculoskeletal Disorders*, v. 20, n. 1, 5 jan. 2019.

ISOMÄKI, Pia *et al.* The expression of SOCS is altered in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 46, n. 10, p. 1538–1546, out. 2007a. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17726036/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

ISOMÄKI, Pia *et al.* The expression of SOCS is altered in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 46, n. 10, p. 1538–1546, 1 out. 2007b. Disponível em: <<http://primer3.sourceforge.net/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

JONES, Gareth W. *et al.* In vivo models for inflammatory arthritis. *Methods in Molecular Biology*. [S.l.]: Humana Press Inc., 2018. v. 1725. p. 101–118.

KAKARLA, Ramesh *et al.* *Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells*. *Experimental and Molecular Medicine*. [S.l.]: Springer Nature. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s12276-019-0362-8>>. Acesso em: 6 jun. 2021. , 1 jan. 2020

KALINKOVICH, Alexander; GABDULINA, Gulzan; LIVSHITS, Gregory. *Autoimmunity, inflammation, and dysbiosis mutually govern the transition from the preclinical to the clinical stage of rheumatoid arthritis. Immunologic Research*. [S.l.]: Humana Press Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30498956/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 15 dez. 2018

KAZI, Julhash U.; RÖNNSTRAND, Lars. Suppressor of cytokine signaling 2 (SOCS2) associates with FLT3 and negatively regulates downstream signaling. *Molecular Oncology*, v. 7, n. 3, p. 693–703, 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23548639/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

KIU, Hiu; NICHOLSON, Sandra E. *Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. Growth Factors*. [S.l.]: Growth Factors. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22339650/>>. Acesso em: 24 maio 2021. , abr. 2012

KNOSP, Camille A. *et al.* Regulation of Foxp3 + Inducible Regulatory T Cell Stability by SOCS2. *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 7, p. 3235–3245, 1 abr. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23455506/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

KUBLER, Paul. Janus kinase inhibitors: Mechanisms of action. *Australian Prescriber*, v. 37, n. 5, p. 154–157, 1 out. 2014. Disponível em: <<https://www.nps.org.au/australian-prescriber/articles/janus-kinase-inhibitors-mechanisms-of-action>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

LABRANCHE, Timothy P. *et al.* JAK inhibition with tofacitinib suppresses arthritic joint structural damage through decreased RANKL production. *Arthritis and Rheumatism*, v. 64, n. 11, p. 3531–3542, nov. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22899318/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

LARSEN, Lykke; RÖPKE, Carsten. *Suppressors of cytokine signalling: SOCS. APMIS*. [S.l.]: APMIS. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12645661/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 dez. 2002

LAWRENCE, Janna. Blocking the immune system in rheumatoid arthritis. *The Pharmaceutical Journal*, 17 maio 2016.

LETELLIER, E. *et al.* Identification of SOCS2 and SOCS6 as biomarkers in human colorectal cancer. *British Journal of Cancer*, v. 111, n. 4, p. 726–735, 12 ago. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25025962/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

LETELLIER, Elisabeth; HAAN, Serge. *SOCS2: Physiological and pathological functions. Frontiers in Bioscience - Elite*. [S.l.]: Frontiers in Bioscience. , 1 jan. 2016

LEVY, David E.; DARNELL, J. E. *STATs: Transcriptional control and biological impact. Nature Reviews Molecular Cell Biology*. [S.l.]: Nat Rev Mol Cell Biol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12209125/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 2002

LI, Ping; SCHWARZ, Edward M. *The TNF- α transgenic mouse model of inflammatory arthritis*.

Springer Seminars in Immunopathology. [S.l.: s.n.], ago. 2003

LOPES, Fernando *et al.* Resolution of neutrophilic inflammation by H₂O₂ in antigen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 63, n. 9, p. 2651–2660, set. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21567381/>>. Acesso em: 13 jun. 2021.

LUBBERTS, Erik; BERG, Wim B. Van den. Cytokines in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Collagen-Induced Arthritis. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6288/>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

MACHADO, Fabiana S. *et al.* Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nature Medicine*, v. 12, n. 3, p. 330–334, mar. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16415877/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

MALEMUD, Charles; PEARLMAN, Eric. Targeting JAK/STAT Signaling Pathway in Inflammatory Diseases. *Current Signal Transduction Therapy*, v. 4, n. 3, p. 201–221, 21 ago. 2009.

MCINNES, Iain B.; SCHETT, Georg. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, v. 365, n. 23, p. 2205–2219, 8 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1004965>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

MENG, Hailan *et al.* Double-negative T cells remarkably promote neuroinflammation after ischemic stroke. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 12, p. 5558–5563, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30819895/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

METCALF, Donald *et al.* Gigantism in mice lacking suppressor of cytokine signalling-2. *Nature*, v. 405, n. 6790, p. 1069–1073, 29 jun. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10890450/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

MITCHELL, Siobhan *et al.* Lipoxins, aspirin-triggered epi-lipoxins, lipoxin stable analogues, and the resolution of inflammation: Stimulation of macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils in vivo. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 13, n. 10, p. 2497–2507, 1 out. 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12239238/>>. Acesso em: 24 maio 2021.

MONACH, Paul A.; MATHIS, Diane; BENOIST, Christophe. *The K/BxN arthritis model. Current Protocols in Immunology*. [S.l.]: John Wiley and Sons Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18491295/>>. Acesso em: 28 jun. 2021. , 2008

MONTI-ROCHA, Renata *et al.* SOCS2 is critical for the balancing of immune response and oxidative stress protecting against acetaminophen-induced acute liver injury. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. JAN, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30723477/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

MORINOBU, Akio. *JAK inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. Immunological*

Medicine. [S.l.]: Taylor and Francis Ltd. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32501149/>>. Acesso em: 24 maio 2021. , 1 out. 2020

NANDAKUMAR, Kuty Selva; HOLMDAHL, Rikard. Collagen antibody induced arthritis.

Methods in molecular medicine, v. 136, p. 215–223, 2007. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17983151/>>. Acesso em: 28 jun. 2021.

O'SHEA, John J.; GADINA, Massimo. Selective Janus kinase inhibitors come of age. *Nature*

Reviews Rheumatology, v. 15, n. 2, p. 74–75, 1 fev. 2019. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30622297/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

ORTIZ, A.M. *et al.* AB0150 Regulation of SOCS1, SOCS2 and SOCS3 expression in patients

with early arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 71, n. Suppl 3, p. 646.4-646, jun. 2013.

PAREL, Yann *et al.* Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4

production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis and*

Rheumatism, v. 56, n. 10, p. 3459–3467, out. 2007. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17907151/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

PELLO, Oscar M. *et al.* SOCS up-regulation mobilizes autologous stem cells through CXCR4

blockade. *Blood*, v. 108, n. 12, p. 3928–3937, 1 dez. 2006. Disponível em:

<<http://ashpublications.org/blood/article-pdf/108/12/3928/1281738/zh802306003928.pdf>>.

Acesso em: 14 jun. 2021.

PERRETTI, Mauro *et al.* *Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis*. *Nature*

Reviews Rheumatology. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em:

<www.nature.com/nrrheum>. Acesso em: 13 jun. 2021. , 1 fev. 2017

PERRETTI, Mauro *et al.* *Resolution Pharmacology: Opportunities for Therapeutic Innovation in*

Inflammation. *Trends in Pharmacological Sciences*. [S.l.]: Elsevier Ltd. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26478210/>>. Acesso em: 12 jun. 2021. , 1 nov. 2015

PINTO, Larissa G. *et al.* IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in

mice. *Pain*, v. 148, n. 2, p. 247–256, fev. 2010. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19969421/>>. Acesso em: 24 maio 2021.

POLIZZOTTO, Mark N.; BARTLETT, Perry F.; TURNLEY, Ann M. Expression of “suppressor

of cytokine signalling” (SOCS) genes in the developing and adult mouse nervous system. *Journal*

of Comparative Neurology, v. 423, n. 2, p. 348–358, 24 jul. 2000. Disponível em:

<<http://europepmc.org/article/MED/10867663>>. Acesso em: 17 maio 2021.

POSSELT, Gernot *et al.* Suppressor of Cytokine Signaling 2 Is a Feedback Inhibitor of TLR-

Induced Activation in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, v.

187, n. 6, p. 2875–2884, 15 set. 2011. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/content/187/6/2875>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

PRIETO, P. *et al.* Lipoxin A4 impairment of apoptotic signaling in macrophages: Implication of the PI3K/Akt and the ERK/Nrf-2 defense pathways. *Cell Death and Differentiation*, v. 17, n. 7, p. 1179–1188, jul. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20094061/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

QUANDT, Dagmar *et al.* Peripheral CD4CD8 double positive t cells with a distinct helper cytokine profile are increased in rheumatoid arthritis. *PLoS ONE*, v. 9, n. 3, 25 mar. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24667579/>>. Acesso em: 24 maio 2021.

RANSOME, M. I.; TURNLEY, A. M. Analysis of neuronal subpopulations in mice over-expressing suppressor of cytokine signaling-2. *Neuroscience*, v. 132, n. 3, p. 673–687, 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15837129/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

RATTHÉ, Claude *et al.* Molecular mechanisms involved in interleukin-4-induced human neutrophils: expression and regulation of suppressor of cytokine signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 81, n. 5, p. 1287–1296, 1 maio 2007. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org>>. Acesso em: 18 maio 2021.

RAUBER, Simon *et al.* Resolution of inflammation by interleukin-9-producing type 2 innate lymphoid cells. *Nature Medicine*, v. 23, n. 8, p. 938–944, 1 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28714991/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

RHYS, Hefin I. *et al.* Neutrophil Microvesicles from Healthy Control and Rheumatoid Arthritis Patients Prevent the Inflammatory Activation of Macrophages. *EBioMedicine*, v. 29, p. 60–69, 1 mar. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29449195/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

RICO-BAUTISTA, Elizabeth; FLORES-MORALES, Amilcar; FERNÁNDEZ-PÉREZ, Leandro. *Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. Cytokine and Growth Factor Reviews*. [S.l.]: Cytokine Growth Factor Rev. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17070092/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , dez. 2006

RIVELLESE, Felice *et al.* Novel Therapeutic Approaches in Rheumatoid Arthritis: Role of Janus Kinases Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, v. 26, n. 16, p. 2823–2843, 9 fev. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29424301/>>. Acesso em: 19 maio 2021.

SAAS, Philippe *et al.* *Harnessing apoptotic cell clearance to treat autoimmune arthritis. Frontiers in Immunology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5640883/](https://pmc/articles/PMC5640883/)>. Acesso em: 29 jun. 2021. , 9 out. 2017

SACHS, Daniela *et al.* Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS. *Journal of Pharmacology*, v. 162, p. 72–83, 2011a. Disponível em: <www.brjpharmacol.org/72British>. Acesso em: 20 maio 2021.

SACHS, Daniela *et al.* Cooperative role of tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and neutrophils in a novel behavioural model that concomitantly demonstrates articular inflammation and hypernociception in mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 162, n. 1, p. 72–83, jan. 2011b. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20942867/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

SALAS, Azucena *et al.* JAK–STAT pathway targeting for the treatment of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. [S.l.]: Nature Research. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 jun. 2020

SCHAIBLE, Hans Georg *et al.* The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain: *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010, [S.l.]: Blackwell Publishing Inc., 2010. p. 60–69. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20398009/>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

SCHETT, Georg; NEURATH, Markus F. *Resolution of chronic inflammatory disease: universal and tissue-specific concepts*. *Nature Communications*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <www.nature.com/naturecommunications>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 dez. 2018

SCHRAMM, Christoph *et al.* Susceptibility to collagen-induced arthritis is modulated by TGF β responsiveness of T cells. *Arthritis research & therapy*, v. 6, n. 2, p. 1–6, 8 jan. 2004. Disponível em: <<http://arthritis-research.com/content/6/2/R114>>. Acesso em: 24 maio 2021.

SEIF, Farhad *et al.* The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Communication and Signaling*. [S.l.]: BioMed Central Ltd. Disponível em: <<https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-017-0177-y>>. Acesso em: 28 jun. 2021. , 21 jun. 2017

SILVAGNI, Ettore *et al.* One year in review 2019: novelties in the treatment of rheumatoid arthritis. v. 37, n. 4, p. 519–534, 2019. Disponível em: <https://www.mendeley.com/catalogue/57757ce6-0c37-343c-906c-afbfc39857fa/?utm_source=desktop&utm_medium=1.19.8&utm_campaign=open_catalog&userDocumentId=%7B0bf6dbf1-2245-3a78-8cc8-cd69d3b65eca%7D>. Acesso em: 14 jun. 2021.

SINGER, Jack W. *et al.* Comparative phenotypic profiling of the JAK2 inhibitors ruxolitinib, fedratinib, momelotinib, and pacritinib reveals distinct mechanistic signatures. *PLoS ONE*, v. 14, n. 9, 1 set. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35466664/>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

SMOLEN, Josef S.; ALETAHA, Daniel; MCINNIS, Iain B. *Rheumatoid arthritis*. *The Lancet*. [S.l.]: Lancet Publishing Group. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27156434/>>. Acesso em: 17 maio 2021. , 22 out. 2016

STARR, Robyn *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, v. 387, n. 6636, p. 917–921, 26 jun. 1997. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/43206>>. Acesso em: 14 jun. 2021.

STUMP, Kristine L. *et al.* A highly selective, orally active inhibitor of Janus kinase 2, CEP-33779, ablates disease in two mouse models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, v. 13, n. 2, p. 1–15, 21 abr. 2011. Disponível em: <<http://arthritis-research.com/content/13/2/R68>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

SUGIMOTO, Michelle A. *et al.* Resolution of inflammation: What controls its onset? *Frontiers in Immunology*. [S.l.]: Frontiers Media S.A. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4845539/](https://doi.org/10.3389/fimm.2016.00068)>. Acesso em: 13 jun. 2021. , 26 abr. 2016

SUGIMOTO, Michelle Amantéa *et al.* Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance. *Journal of Immunology Research*. [S.l.]: Hindawi Limited. , 2016

TAKAHASHI, Reiko *et al.* SOCS1 is essential for regulatory T cell functions by preventing loss of Foxp3 expression as well as IFN- γ and IL-17A production. *Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 10, p. 2055–2067, 26 set. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21893603/>>. Acesso em: 18 maio 2021.

THEOFILOPOULOS, Argyrios N.; KONO, Dwight H.; BACCALA, Roberto. *The multiple pathways to autoimmunity*. *Nature Immunology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28632714/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 20 jun. 2017

TSAO, Jeng Ting; KUO, Chia Chen; LIN, Shih Chang. The analysis of CIS, SOCS1, SOSC2 and SOCS3 transcript levels in peripheral blood mononuclear cells of systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Clinical and Experimental Medicine*, v. 8, n. 4, p. 179–185, dez. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18820827/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

UREN, Rachel T. *et al.* A novel role of suppressor of cytokine signaling-2 in the regulation of TrkA neurotrophin receptor biology. *Journal of Neurochemistry*, v. 129, n. 4, p. 614–627, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24484474/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

VAGO, Juliana P. *et al.* Annexin A1 modulates natural and glucocorticoid-induced resolution of inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 92, n. 2, p. 249–258, ago. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22493082/>>. Acesso em: 8 jun. 2021.

VAL, Cynthia Honorato *et al.* SOCS2 modulates adipose tissue inflammation and expansion in mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 76, 1 fev. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31816561/>>. Acesso em: 17 maio 2021.

VALIATE, Bruno V.S. *et al.* The immunoreceptor CD300a controls the intensity of inflammation and dysfunction in a model of Ag-induced arthritis in mice. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 106, n. 4, p. 957–966, 1 out. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31107994/>>. Acesso em: 24 maio 2021.

VAN DER WOUDE, Diane; VAN DER HELM-VAN MIL, Annette H.M. *Update on the*

epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis. Best Practice and Research: Clinical Rheumatology. [S.l.]: Bailliere Tindall Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30527425/>>. Acesso em: 17 maio 2021. , 1 abr. 2018

VERONESI, Francesca *et al.* *Novel therapeutic targets in osteoarthritis: Narrative review on knock-out genes involved in disease development in mouse animal models. Cytotherapy*. [S.l.]: Elsevier B.V. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27059198/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 maio 2016

VILLARINO, Alejandro V.; KANNO, Yuka; O'SHEA, John J. *Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. Nature Immunology*. [S.l.]: Nature Publishing Group. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ni.3691>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 22 mar. 2017

WONG, Peter K.K. *et al.* Interleukin-6 modulates production of T lymphocyte-derived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 54, n. 1, p. 158–168, jan. 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16385511/>>. Acesso em: 13 jun. 2021.

YAN, Zhaoqi *et al.* Role of the JAK/STAT signaling pathway in regulation of innate immunity in neuroinflammatory diseases. *Clinical Immunology*, v. 189, p. 4–13, 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27713030/>>. Acesso em: 24 maio 2021.

YANG, Xuezhi; CHANG, Yan; WEI, Wei. *Emerging role of targeting macrophages in rheumatoid arthritis: Focus on polarization, metabolism and apoptosis. Cell Proliferation*. [S.l.]: Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/cpr.12854wileyonlinelibrary.com/journal/cpr>>. Acesso em: 29 jun. 2021. , 1 jul. 2020

YANG, Y. H. *et al.* Endogenous estrogen regulation of inflammatory arthritis and cytokine expression in male mice, predominantly via estrogen receptor α . *Arthritis and Rheumatism*, v. 62, n. 4, p. 1017–1025, 1 abr. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.27330>>. Acesso em: 5 jul. 2021.

YOSHIMURA, Akihiko; NAKA, Tetsuji; KUBO, Masato. *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. Nature Reviews Immunology*. [S.l.]: Nat Rev Immunol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17525754/>>. Acesso em: 17 maio 2021. , jun. 2007

ZAMANPOOR, Mansour. *The genetic pathogenesis, diagnosis and therapeutic insight of rheumatoid arthritis. Clinical Genetics*. [S.l.]: Blackwell Publishing Ltd. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30578544/>>. Acesso em: 14 jun. 2021. , 1 maio 2019