

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Do Adulto**

Camilla Ribeiro Lima Machado

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DOS SINOVIÓCITOS  
FIBROBLASTOS SÍMILE DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE,  
OSTEOARTRITE E DE MODELO EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte – MG

2020

Camilla Ribeiro Lima Machado

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DOS SINOVIÓCITOS  
FIBROBLASTOS SÍMILE DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE,  
OSTEOARTRITE E DE MODELO EXPERIMENTAL**

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

Orientador: Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Co-orientadora: Profa. Adriana Maria Kakehasi

Belo Horizonte

2020

Machado, Camilla Ribeiro Lima.

M149a Avaliação Morfológica e Funcional dos Sinoviócitos Fibroblastos Símiles de pacientes com Artrite Reumatoide, Osteoartrite e Modelo Experimental [manuscrito]. / Camilla Ribeiro Lima Machado. - - Belo Horizonte: 2020.

75f.: il.

Orientador (a): Marcus Vinícius Melo de Andrade.

Coorientador (a): Adriana Maria Kakehasi.

Área de concentração: Ciências Clínicas.

Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Artrite Reumatoide. 2. Osteoartrite. 3. Sinoviócitos. 4. Fibroblastos. 5. Artrite. 6. Técnicas de Cultura de Células. 6. Dissertação Acadêmica. I. Andrade, Marcus Vinícius Melo de. II. Kakehasi, Adriana Maria. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WE 300

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

### **Reitora**

Profª. Sandra Regina Goulart Almeida

### **Vice-Reitor**

Alessandro Fernandes Moreira

### **Pró-Reitor de Pós Graduação**

Prof. Fábio Alves da Silva Júnior

### **Pró-Reitora de Pesquisa**

Profª. Mario Fernando Montenegro Campos

## **FACULDADE DE MEDICINA**

### **Diretor**

Prof. Humberto José Alves

### **Vice-Diretora**

Profª. Alamanda Kfoury Pereira

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

### **Coordenadora**

Profª. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

### **Subcoordenador**

**Profª. Suely Meireles Rezende**

### **Colegiado**

#### **Representantes Docentes**

Prof. Eduardo Garcia Viela

Profª. Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Prof. Luciana Costa Faria

Prof. Luciana Diniz Silva

Prof. Paulo Caramelli

Profª. Suely Meireles Rezende

**Representante Discente**

Letícia Lemos Jardim



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DOS SINVIÓCITOS FIBROBLASTOS  
SÍMILE DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE, OSTEOARTRITE E DE  
MODELO EXPERIMENTAL**

**CAMILLA RIBEIRO LIMA MACHADO**

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

Aprovada em 13 de março de 2020, pela banca constituída pelos membros:

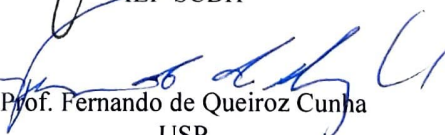
  
Prof. Marcus Vinicius Melo de Andrade - Orientador  
UFMG

  
Prof. Adriana Maria Kakehasi - Coorientadora  
UFMG

  
Prof. Débora Cerqueira Calderaro  
UFMG

  
Prof. Luciana de Oliveira Andrade  
UFMG

  
Prof. Karla Simone da Silva Fernandes  
IEP-SCBH

  
Prof. Fernando de Queiroz Cunha  
USP

Belo Horizonte, 13 de março de 2020.

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

*José de Alencar*

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

A minha irmã Raíssa, por todos os momentos de convívio, apoio e carinho.

Aos meus orientadores, Prof. Marcus Vinicius Melo de Andrade e Profa. Adriana Maria Kakehasi pela oportunidade, confiança, paciência e por partilharem seus conhecimentos. Obrigada por acreditarem em mim.

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

Ao Dr. Gustavo Resende, por além de disponibilizar de seu tempo para realizar as coletas, contribuiu e apoiou para a concretização deste trabalho.

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

A toda equipe do Laboratório Lineu Freire Maia.

Aos pacientes, por aceitarem fazer parte desta pesquisa.

A FAPEMIG pelo apoio financeiro.



## RESUMO

**Introdução.** Artrite reumatoide (AR) e Osteoartrite (OA) são doenças articulares crônicas que se manifestam por alterações articulares inflamatórias, estruturais e funcionais. Os sinoviócitos fibroblastos similares (FLS) presentes no ambiente sinovial, estão implicados no ciclo sinovite-dano estrutural, através da produção de citocinas inflamatórias e de enzimas degradadoras de cartilagem, as metaloproteinases (MMPs). Poucos estudos têm comparado resposta a estímulos de FLS derivados de líquido sinovial (FD-FLS) e FLS derivados de tecido sinovial (TD-FLS) de pacientes com OA, assim como as características ultraestruturais e funcionais de FLS de pacientes com AR (AR-FLS) e de camundongo com artrite induzida por colágeno (CIA-FLS).

**Objetivo.** Comparar a produção de MMP-1, MMP-3 e IL-6 em culturas de TD-FLS e FD-FLS estimulados e não estimulados (ns) de pacientes com OA. E comparar a morfologia e a produção de MMP-3 e IL-6 em AR-FLS e CIA-FLS e as vias de sinalização ativadas.

**Metodologia.** FLS foram cultivados de tecido e de líquido sinovial de pacientes com OA, AR e CIA. Após 22-24 horas de estímulo com TNF-alfa e IL-1beta, procedeu-se dosagens de IL-6, MMP-1 e 3 por ELISA. No lisado celular de AR-FLS e CIA-FLS as MAPKs foram avaliadas pela fosforilação quinases JNK, p38, ERK1/2 e o fator de transcrição: NF-κB através da técnica de *Western Blot*. AR-FLS e CIA-FLS foram comparadas morfológicamente por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV).

**Resultados.** Não ocorreu diferença estatística na expressão basal, células não estimuladas, de MMP-1, -3 e IL-6 entre FD-FLS e TD-FLS de OA. Após a estimulação com IL-1beta e TNF-alfa, não houve diferença na produção de MMP-3 e IL-6. Houve correlação positiva para produção de MMP-1, MMP-3 e IL-6 entre FD-FLS e TD-FLS. A análise por Bland-Altman mostrou uma distribuição homogênea dos valores e baixas taxas de discordância média entre todos os resultados de FD-FLS e TD-FLS. Em AR-FLS e CIA-FLS demonstraram a presença de corpúsculos lamelares. Observou-se maior quantidade de pinocitose e vesículas pinocitóticas em AR-FLS. A produção basal de MMP-3 e IL-6 está presente em AR-FLS e CIA-FLS. A produção de MMP-3 e IL-6 e a ativação das vias de sinalização após os estímulos com TNF-alfa e IL-1beta obtiveram respostas diferentes quando comparadas ambas as células.

**Conclusão.** Este estudo demonstrou a semelhança funcional entre as células de líquido e tecido sinovial de pacientes com OA através da produção de MMP-1, -3, IL-6. O que proporciona uma fonte mais acessível de FLS no líquido sinovial. A diferença na produção de importantes mediadores envolvidos na fisiopatologia da AR e nas vias de sinalização ativadas, como a

diferença morfológica entre AR-FLS e CIA-FLS, sugere uma limitação a adoção de FLS do modelo experimental para estudos *in vitro* relacionados etiopatogenia e teste de novos alvos terapêuticos na artrite reumatoide.

**Palavras-chave:** artrite reumatoide; osteoartrite; sinoviócitos fibroblastos símiles; artrite induzida por colágeno; cultura de células; fisiopatologia

## ABSTRACT

**Introduction.** Rheumatoid arthritis (RA) and Osteoarthritis (OA) are chronic joint diseases manifested by inflammatory, structural and functional joint changes. Synoviocytes fibroblast-like (FLS) present in the synovial environment are implicated in the synovitis-structural damage cycle through the production of inflammatory cytokines and cartilage degrading enzymes, metalloproteinases (MMPs). Few studies have compared stimuli response to synovial fluid-derived FLS (FD-FLS) and synovial tissue-derived FLS (TD-FLS) from OA patients, as well as the ultrastructural and functional characteristics of FLS from RA patients (RA- FLS) and mice with collagen-induced arthritis (CIA-FLS).

**Goal.** Compare the production of MMP-1, MMP-3 and IL-6 in stimulated and unstimulated TD-FLS and FD-FLS cultures from patients with osteoarthritis. And compare the morphology and production of MMP-3 and IL-6 in RA-FLS and CIA-FLS, and the activated signaling pathways.

**Methods.** FLS were cultured from tissue and synovial fluid from patients with OA, RA and CIA. After 22 hours of stimulation with TNF-alpha and IL-1beta, IL-6, MMP-1 and 3 dosages were performed by ELISA. In the cell lysate of AR-FLS and CIA-FLS MAPKs were evaluated by phosphorylation kinases JNK, p38, ERK1/2 and transcription factor: NF- $\kappa$ B by Western blot technique. RA-FLS and CIA-FLS were compared morphologically by transmission electron microscopy (TEM) and scanning (SEM).

**Results.** There was no statistical difference in basal expression, unstimulated cells, of MMP-1, -3 and IL-6 between FD-FLS and TD-FLS of OA. After stimulation with IL-1beta and TNF-alpha, there was no difference in MMP-3 and IL-6 production. There was a positive correlation for MMP-1, MMP-3 and IL-6 production between FD-FLS and TD-FLS. Bland-Altman analysis showed a homogeneous distribution of values and low average disagreement rates between all FD-FLS and TD-FLS results. In RA-FLS and CIA-FLS demonstrate the presence of lamellar bodies. It was observed a larger quantity of pinocytosis and pinocytic vesicles in RA-FLS. Basal production of MMP-3 and IL-6 is present in RA-FLS and CIA-FLS. The production of MMP-3 and IL-6 and activation of signaling pathways after TNF-alpha and IL-1beta stimuli obtained different responses when comparing both cells.

**Conclusion.** This study demonstrated the functional similarity between fluid cells and synovial tissue of OA patients by producing MMP-1, -3, IL-6. Which provides a more affordable source of FLS in synovial fluid. The difference in the production of important mediators involved in

the pathophysiology of RA and activated signaling pathways, such as the morphological difference between RA-FLS and CIA-FLS suggest a limitation of the adoption of experimental model FLS for in vitro studies related to etiopathogenesis and new therapeutic targets tests in rheumatoid arthritis.

**Keywords:** rheumatoid arthritis; osteoarthritis; synoviocytes fibroblastos-like; collagen-induced arthritis; cell culture; pathophysiology

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1. Fisiopatologia da Osteoartrite.....  | 20 |
| FIGURA 2. Articulação de paciente normal (saudável) e articulação de paciente com Artrite Reumatoide.....              | 22 |
| FIGURA 3. Eventos intracelulares de fosforilação que mediam a transdução de sinais de citocinas e metaloproteínas..... | 27 |

### ARTIGO PUBLICADO

|  |    |
|--|----|
| FIGURE 1. Production of metalloproteinases (MMP)-1, -3 (and interleukin (IL)-6 without stimulation and after stimulation with IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$ by fibroblast-like synoviocytes from tissue derived (TD) and synovial fluid derived (FD) of patients with osteoarthritis (n=4)..... | 45 |
| FIGURE 2. Correlations between concentrations of MMP-1, MMP-3, and IL-6 in supernatant of fibroblast-like synoviocytes cultures from synovial fluid-derived (FD) and tissue derived (TD) of patients with osteoarthritis (OAFLS) (stimulated and non-stimulated).....                            | 46 |

### ARTIGO A SER SUBMETIDO

|   |    |
|---|----|
| FIGURE 1. Immunophenotyping of fibroblasts-like synoviocytes culture from patients with rheumatoid arthritis and mice with collagen-induced arthritis verified by flow cytometry assays.....                                | 55 |
| FIGURE 2. Fibroblasts-like synoviocytes Scanning Electron Microscope.....   | 56 |
| FIGURE 3. Electron microscopic analysis of fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis and mice with collagen-induced arthritis.....   | 57 |
| FIGURE 4. Ultrastructural differences involved with the cellular pinocytosis process of fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis (RA-FLS) and mice with collagen-induced arthritis (CIA-FLS)..... | 58 |
| FIGURE 5. Activation of MAP kinase (p-ERK1/2, p-P38 and p-JNK) and transcription factor NF $\kappa$ B.....  | 60 |

FIGURE 6. Production of MMP-3 and IL-6 after stimulation with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in fibroblasts-like synoviocytes culture obtained from patients with rheumatoid arthritis and from mice with collagen-induced arthritis (CIA-FLS).....61

## **LISTA DE TABELAS**

|  |    |
|--|----|
| TABELA 1. Marcadores específicos de sinoviócitos fibroblastos símiles..... | 25 |
|--|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ac: *actin*

ADAMTs: desintegrinas e metaloproteinases com domínios trombospondina

AJ: adherent junction

AR: artrite reumatoide

AR-FLS: sinoviócitos fibroblastos símile de pacientes com artrite reumatoide

BMPs: proteínas morfogenéticas ósseas

CCP: peptídeos citrulinados

CD: agrupamento de diferenciação

CE: centríolos

CG: complexo de Golgi

CIA: artrite induzida por colágeno

CIA-FLS: sinoviócitos fibroblastos símile de camundongos com artrite induzida por colágeno

CL: corpúsculos lamelares

DMARDs: drogas anti-reumáticas modificadoras de doença

DMEM: meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco

DMOAs: drogas Modificadoras da Osteoartrite

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

FD-FLS: sinoviócitos fibroblastos símile derivados do fluido sinovial/líquido sinovial

FGF: fator de crescimento fibroblástico

FI: *intermediate filament*

FLS: sinoviócitos fibroblastos símile

GA: Golgi apparatus

HLA DRB1: alelos no locus do antígeno leucocitário humano

IL: interleucina

IL-1Ra: antagonista do receptor de IL-1

JNK: proteína quinase ativada por estresse

LB: *lamellar bodies*

MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos

MEC: matriz extracelular

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MLS: sinoviócitos macrófagos símiles

MMP: metaloproteinase



MS: membrana sinovial

MT: mitocôndria/*mitochondria*

N: núcleo

NF- $\kappa$ B: fator de transcrição nuclear kappa-B

NS: não estimulado

OA: osteoartrite

OA-FLS: sinoviócitos fibroblastos símile de pacientes com osteoartrite

OsO<sub>4</sub>: tetraóxido de ósmio

P: pinocitose/*pinocytosis*

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonilo

PBS: tampão fosfato-salino

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas

RA: rheumatoid arthritis

RANKL: ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B

RER: retículo endoplasmático rugoso/ *rough endoplasmic reticulum*

TLRs: *toll like receptors*

TD-FLS: sinoviócitos fibroblastos símile derivados do tecido sinovial/membrana sinovial

TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinase

TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa

UDPGD: *uridine diphosphoglucose dehydrogenase*

VCAM-1: molécula de adesão celular vascular 1

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

VP: vesículas pinocitóticas

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. APRESENTAÇÃO.....</b>  | <b>18</b> |
| <b>2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>  | <b>19</b> |
| <b>2.1. Osteoartrite .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>2.2. Artrite Reumatoide.....</b>  | <b>21</b> |
| 2.2.1. Camundongos com artrite induzida por colágeno.....                                      | 22        |
| <b>2.3. Membrana sinovial.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>2.4. Sinoviócitos fibroblastos símiles.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>   | <b>28</b> |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>3.1. Objetivo geral.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>3.2. Objetivos específicos.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>5. MÉTODOS.....</b>   | <b>30</b> |
| <b>5.1. Coleta das amostras.....</b>   | <b>30</b> |
| 5.1.1. Coleta de amostras de pacientes com OA.....   | 30        |
| 5.1.2. Coleta de amostras de pacientes com AR.....   | 31        |
| 5.1.3. Indução de camundongos com artrite induzida por colágeno e coleta de amostra.....       | 31        |
| <b>5.2. Cultivo das amostras.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>5.3. Estímulo das amostras.....</b>   | <b>32</b> |
| 5.3.1. Estímulo em OA-FLS (TD-FLS e FD-FLS).....   | 32        |
| 5.3.2. Estímulos em AR-FLS e CIA-FLS.....  | 33        |
| <b>5.4. Dosagens das amostras.....</b>   | <b>34</b> |
| 5.4.1. Técnica por ELISA.....  | 34        |
| 5.4.2. Técnica por Western Blotting.....   | 34        |
| <b>5.5. Imunofenotipagem.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>5.6. Microscopia eletrônica de AR-FLS e CIA-FLS.....</b>                                    | <b>35</b> |
| 5.6.1. Microscopia eletrônica de varredura.....  | 35        |
| 5.6.2. Microscopia eletrônica de transmissão.....  | 36        |
| <b>5.7. Análise estatística.....</b>   | <b>37</b> |
| 5.7.1. Análise estatística dos resultados obtidos com TD-FLS e FD-FLS de pacientes com OA..... | 37        |
| 5.7.2. Análise estatística dos resultados obtidos com AR-FLS e CIA- FLS.....                   | 37        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>38</b> |
| <b>7. ARTIGO PUBLICADO.....</b>           | <b>43</b> |
| <b>8. ARTIGO A SER SUBMETIDO.....</b>     | <b>48</b> |
| <b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>       | <b>67</b> |
| <b>APÊNDICE.....</b>                      | <b>68</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                        | <b>71</b> |

## 1. APRESENTAÇÃO

Esse estudo faz parte da linha de pesquisa “Estudo de Mediadores e Reguladores da Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica”, desenvolvido no Laboratório de Investigação Clínica - Lineu Freire Maia na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, com a coordenação do orientador desse estudo, o Professor Doutor Marcus Vinícius Melo de Andrade. O grupo de pesquisa envolvido nessa linha conta com a participação de médicos reumatologistas, representados pela coorientadora Professora Doutora Adriana Maria Kakehasi e pelo Doutor Gustavo Gomes Resende, e pela bióloga Mestre Camilla Ribeiro Lima Machado. Para contribuímos no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença reumatoide e outras doenças articulares inflamatórias, obtivemos a parceria do Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, chefiado pelo professor titular de Reumatologia, Ricardo Machado Xavier. Com essa colaboração, foi possível a troca de conhecimento sobre o desenvolvimento do modelo experimental de artrite induzida por colágeno e a obtenção dessas células com os mesmos. Esse fato teve grande relevância para o Laboratório Lineu Freire Maia, uma vez que, além de permitir a colaboração com um dos mais importantes grupos de pesquisa em Reumatologia, permitiu a realização do estudo comparativo morfológico e funcional dos fibroblastos murino e humano. Todo nosso estudo morfológico foi realizado no Centro de Microscopia, um órgão suplementar criado pelo Conselho Universitário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). De acordo com as diretrizes do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da UFMG, a tese será apresentada sob a seguinte forma: considerações iniciais, justificativa, objetivos, métodos, dois artigos científicos e considerações finais. Sobre os artigos, o primeiro já foi publicado, “*Fibroblast-like synoviocytes from fluid and synovial membrane from primary osteoarthritis demonstrate similar production of interleukin 6, metalloproteinases 1 and 3*”, e o segundo artigo ainda será submetido, “*Comparative electron microscopy and functional analysis of fibroblast-like synoviocytes from human rheumatoid arthritis and mice collagen-induced arthritis*”. Esta tese foi elaborada, segundo a norma técnica ABNT NBR 16748:2019, em vigor desde 26 de fevereiro de 2019.

## 2. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 2.1. Osteoartrite

A Osteoartrite (OA) é uma doença comum degenerativa progressiva e é a causa mais frequente de incapacidade física, afetando mais de 12,4 milhões de indivíduos com 65 anos ou mais [1]. Ela é considerada uma doença inflamatória e de alta atividade metabólica [2]. A doença pode ser influenciada por diversos fatores, como gênero, idade, trauma, genética e obesidade, que contribuem para iniciar o processo de lesão nos diferentes componentes da articulação e remodelação do osso [3, 4]. A prevalência da OA aumenta com a idade e é mais comum nas mulheres do que nos homens [5].

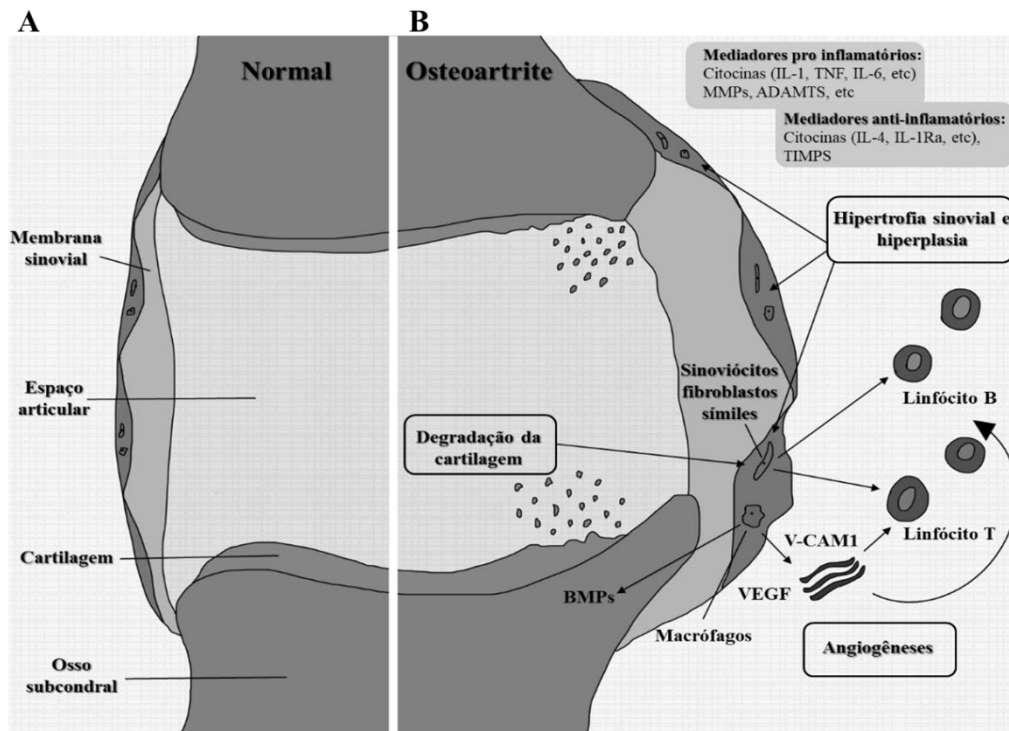
Ela está associada com a perda progressiva e destruição da cartilagem articular, espessamento do osso subcondral, graus variáveis de inflamação da sinóvia, denominada sinovite, hiperplasia sinovial, degeneração de ligamentos e do menisco no joelho e hipertrofia da cápsula articular, resultando em dor, deformidade e perda de função [6, 7].

Durante a progressão da OA, toda a articulação sinovial, incluindo cartilagem, osso subcondral e a membrana sinovial (MS), estão envolvidos no processo de inflamação [7, 8]. Conforme apresentado na Figura 1, quando os produtos da cartilagem degradada são liberados no líquido sinovial, esses são fagocitados pelos macrófagos presentes na MS. Estas células amplificam sinovite através da produção de mediadores catabólicos e pró-inflamatórios como interleucina (IL) -1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). Estes mediadores ativam os sinoviócitos fibroblastos similares (FLS), que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 responsável pela inflamação, e enzimas proteolíticas, como metaloproteinases da matriz (MMPs) e as desintegrinas e metaloproteinases com domínios trombospondina (ADAMTs), que são responsáveis pela degradação da cartilagem em excesso, resultando em um ciclo vicioso [9, 10]. Durante o desenvolvimento da doença, observa-se na MS a hiperplasia e hipertrofia sinovial. A resposta inflamatória é amplificada por linfócitos T e linfócitos B ativados e macrófagos, aumentando a angiogênese e contribuindo para o desenvolvimento de inflamação crônica [9, 11-13]. Para neutralizar essa resposta inflamatória, células presentes na MS e na cartilagem produzem citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 (contribuinte para a inibição da apoptose celular), o agonista do receptor IL-1 (IL-1Ra) e o inibidor tecidual de MMP (TIMP). Além desses efeitos na inflamação e degradação da cartilagem, os macrófagos presentes na MS inflamada contribuem para a formação de osteócitos via proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que irão auxiliar na espessura do osso subcondral [9, 14].

A OA apresenta uma evolução heterogênea, quando o paciente apresenta o sintoma da dor, esta começa a ser recorrente ou constante pelo resto da vida e a sua incapacidade funcional tende a piorar lentamente. Contudo, grande parte dos pacientes podem apresentar uma sintomatologia estável ou mesmo melhorar [15, 16].

O tratamento clínico da OA é pouco eficaz e permanece paliativo [14]. Apesar disso, um novo conceito terapêutico que vem sendo explorado, são medicamentos chamados Drogas Modificadoras da Osteoartrite (DMOAs). Estes compostos apresentam elementos que bloqueiam a ação de enzimas degradadoras da matriz extracelular (MEC), citocinas pró-inflamatórias, consequentemente, alterando o metabolismo ósseo [17].

A Figura 1 abaixo descreve esquematicamente a fisiopatologia da osteoartrite.



**Figura 1.** Fisiopatologia da Osteoartrite. Articulação normal (saudável) (A) e articulação com Osteoartrite (B). B. Ativação de células sinoviais através de produtos de cartilagem degradada, levando a sinovite, hipertrofia e hiperplasia sinovial. Infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos B e linfócitos T ativados) levando a angiogênese aumentada. Abreviações: ADAMTS, uma desintegração e metaloproteinase com motivos de trombospondina; BMP, proteína morfogenética óssea; IL, interleucina; IL-1Ra, antagonista do receptor de IL-1; MMP, metaloproteinase; TIMP, inibidor tecidual de metaloproteinase; TNF, fator de necrose tumoral; VCAM-1, molécula de adesão celular vascular 1; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular. Modificado de Sellam J., 2010 [9].

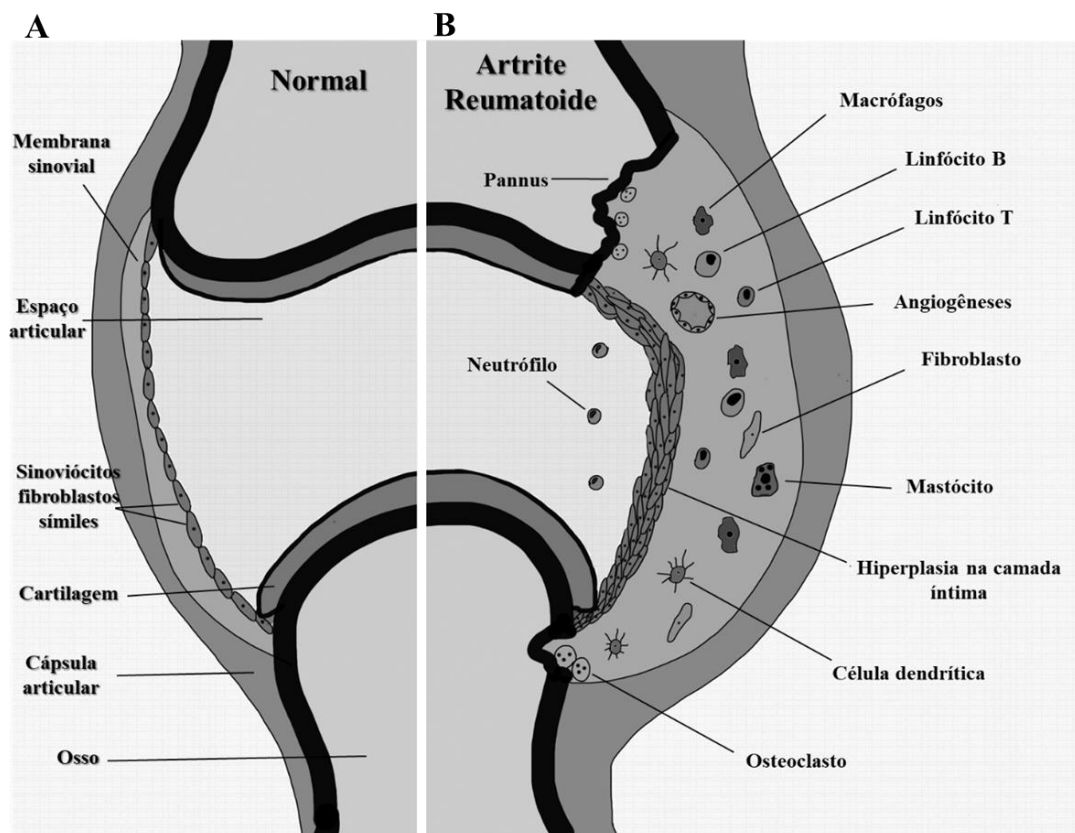
## 2.2. Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune crônica sistêmica que acomete principalmente a articulação sinovial [18]. Essa doença degenerativa é caracterizada pela sinovite hiperplásica crônica devido a inflamação por infiltração de células do sistema imunológico, conseqüentemente, contribuindo para a destruição da cartilagem e da articulação [18]. Acomete 0,5 a 2% da população, tem distribuição mundial e ocorre em ambos os sexos com predominância feminina (duas a quatro mulheres para cada homem). A doença acarreta um aumento na morbidade e mortalidade em relação à população geral, sendo que um terço dos pacientes não se encontrarão aptos ao trabalho após dez anos de doença [19]. Pacientes com AR apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de doença cardiovascular, pulmonar, nos nervos periféricos, entre outros, todas em parte explicado pelo processo inflamatório sistêmico persistente da doença [19, 20].

A etiologia da AR é desconhecida e sua fisiopatologia é multifatorial e complexa. acredita-se que metade do risco de desenvolvimento da doença seja por fatores genéticos [21]. Alguns alelos no locus do antígeno leucocitário humano (HLA DRB1) se associam à suscetibilidade à AR e à presença de autoanticorpos, como o fator reumatoide (FR) e anticorpos direcionados contra peptídeos citrulinados (anti-CCP). Além disso, diversos fatores ambientais foram sugeridos como fator “gatilho” da manifestação da doença, mas apenas o tabagismo mostrou-se definitivamente relacionado ao risco aumentado para a doença [19]. Avanços no conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos na AR levaram ao desenvolvimento de terapias efetivas para o controle da doença. O benefício do uso dos agentes biológicos em AR, mediados pelo bloqueio de citocinas ou seu receptor (ex. drogas antirreumática modificadoras de doença (DMARDs)), ou atuação nas células B e linfócitos T (CTLA4), alterou de modo expressivo o manejo da doença reumatoide [19]. O objetivo principal para o tratamento é controlar a dor e a inflamação, reduzir o dano e a incapacidade das articulações e manter ou melhorar a função física e a qualidade de vida do paciente [19].

A AR se inicia pela inflamação na MS presente nas articulações. A interação de células do sistema imunológico, FLS e macrófagos residentes da MS, leva a uma resposta inflamatória, com conseqüente destruição de tecidos, como a cartilagem e o osso subcondral (Figura 2). A resposta inflamatórias na MS é mediada pelo grande aumento da produção e expressão de citocinas pro-inflamatórias, como TNF-alfa, IL-1beta, IL-5, IL-15 e IL-17, e enzimas degradadoras de cartilagem, as MMPs [22, 23]. Os FLS possuem um papel expressivo no processo inflamatório, mas também na destruição óssea pela invasão da cartilagem. Eles se

tornam hiperplásicos na MS e nela ocorrerá uma extensiva angiogênese [23, 24]. Através da ativação das moléculas de adesão nas células endoteliais, ocorre a liberação de citocinas, as quais irão induzir a migração de células do sistema imune para a MS, formando um infiltrado celular. Logo após, surge-se o pannus reumatoide (Figura 2), um tecido de granulação vascular composto de células de proliferação sinovial, pequenos vasos sanguíneos e células inflamatórias [10, 25]. Ele causa destruição do tecido articular localizado entre a membrana sinovial e da cartilagem [23, 25].



**Figura 2.** Articulação de paciente normal (saudável) (A) e articulação de paciente com Artrite Reumatoide (B). B. É possível observar a formação do pannus onde observa-se várias células imunes e sinoviais ativadas, além dos processos envolvidos na resposta inflamatória. Modificado de Strand V., 2007 [23].

### 2.2.1. Camundongo com artrite induzida por colágeno

A artrite induzida por colágeno (CIA) é um modelo animal de AR que tem sido amplamente utilizado no estudo da patogênese da doença e na validação de alvos terapêuticos [26]. Esse modelo é usado em diferentes tipos de ensaios, incluindo testes de novas terapias, identificação



de mediadores pró-inflamatórios, análise de fatores genéticos e busca de marcadores de progressão da doença [27].

A CIA é um modelo de artrite, que se assemelha a AR, induzida por imunização ativa dos animais. O primeiro modelo foi desenvolvido em ratos, e a seguir foi adaptado para camundongos. A CIA é induzida por inoculação com colágeno heterólogo do tipo II (geralmente bovino) no adjuvante de Freund em camundongos, levando a uma inflamação relativamente aguda, e formando uma artrite [28]. O tipo de camundongo mais utilizado como modelo de CIA são os DBA/1. O modelo requer pelo menos 6 a 8 semanas para obter sinais clínicos da AR, como poliartrite caracterizada por células inflamatórias sinoviais, infiltração de células do sistema imune, formação do pannus, hiperplasia sinovial, destruição da cartilagem e erosão óssea [26, 28-30]. A presença do fator reumatoide e de anticorpos contra peptídeos citrulinados também é encontrada neste modelo experimental. Como na AR, citocinas pró-inflamatórias, TNF-alfa, IL-1beta, IL-6 e MMPs são abundantemente expressas nas articulações artríticas de camundongos com CIA e o bloqueio dessas moléculas resultam em uma redução da gravidade da doença [26, 31]. Outra semelhança importante entre AR e CIA é que a suscetibilidade a ambas as doenças está fortemente associada a genes que codificam complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, indicando o envolvimento de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na patogênese de ambas as formas de artrite. Essas características do modelo de CIA fazem dele um modelo *in vivo* mais utilizado para estudos de AR [26, 28].

### **2.3. Membrana sinovial**

A Membrana Sinovial (MS) é um componente importante e altamente específico das articulações sinoviais, sua presença garante suporte estrutural, lubrificação e nutrição da cartilagem articular [32]. Ela consiste de uma camada celular fina e superficial, em contato direto com a cavidade articular (íntima, *lining* no inglês), composta por sinoviócitos macrófagos similares (MLS), também conhecidos como sinoviócitos tipo A, FLS, ou sinoviócitos do tipo B [25, 33]. Os MLS estão em baixa quantidade e têm como principal função a fagocitose. Já os FLS, além de fornecer nutrientes e fatores lubrificantes para a cavidade sinovial, têm como principal função a produção de componentes da MEC [34, 35]. Ao contrário de outras membranas, a MS não possui uma membrana basal que a separe da camada de tecido conjuntivo frouxo subjacente (subíntima, *sublining* no inglês), que contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibroblastos, adipócitos e neutrófilos [25, 33].

A inflamação da MS, também chamada de sinovite, está presente em níveis variados nas diversas doenças articulares inflamatórias, e ela ocorre por hiperplasia da camada íntima, com uma grande proliferação de células, neoangiogênese, e infiltrado inflamatório na camada subíntima, como mostrado anteriormente nas figuras 1 e 2 [33].

#### **2.4. Sinoviócitos fibroblastos símiles**

Os FLS são células de origem mesenquimal com características distintas de outras linhagens de fibroblastos, dois terços dessas células predominam na camada íntima da MS, tendo um papel importante na sua constituição [25, 36]. Essas células asseguram a integridade estrutural e dinâmica das articulações sinoviais, controlando a composição do líquido sinovial e da MEC, secretando componentes proteicos, como colágeno, fibronectina, glicoproteínas lubrificantes e ácido hialurônico [25, 32, 37].

Algumas características morfofuncionais que distinguem os FLS dos fibroblastos presentes na camada subíntima, são a expressão de marcadores de superfície como a glicoproteína Thy-1 (CD90), a glicoproteína CD44, proteínas da matriz extracelular como a vimentina, colágenos tipo IV e V [10, 25]. Mas os FLS, em especial, são caracterizados pela expressão específica de UDPGD (*uridine diphosphoglucose dehydrogenase*), uma enzima indispensável na síntese de ácido hialurônico [38-40], e caderina-11 (*calcium-dependent adhesion molecule-11*), uma molécula de adesão que funciona como uma junção aderente entre os FLS, auxiliando no remodelamento sinovial, mas também regula a secreção de IL-6 e de outras citocinas pró-inflamatórias [41-44]. A Tabela 1 abaixo mostra os principais marcadores de FLS e sua localização

**Tabela 1.** Marcadores específicos de sinoviócitos fibroblastos símiles.

| <b>Marcadores de FLS</b> | <b>Localização</b> |
|--------------------------|--------------------|
| <i>VCAM-1</i>            | Superfície         |
| <i>Caderina 11</i>       | Superfície         |
| <i>CD-90</i>             | Superfície         |
| <i>UDPGP</i>             | Intracelular       |
| <i>CD44</i>              | Superfície         |
| <i>Vimentina</i>         | Intracelular       |

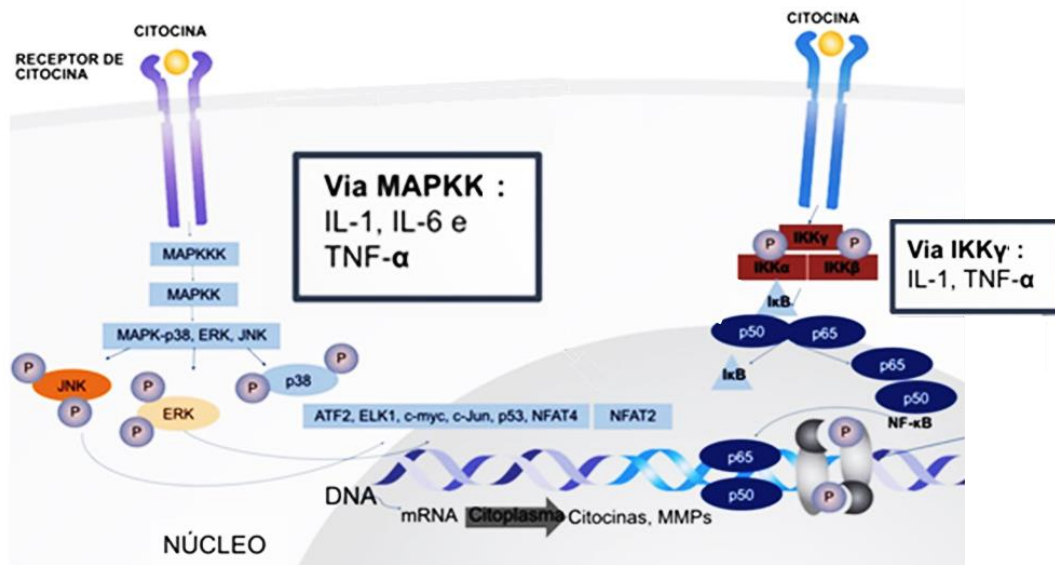
Abreviações: FLS: sinoviócitos fibroblastos símiles; caderina-11: calcium-dependent adhesion molecule-11; UDPGP: Uridina difosfato glicose desidrogenase; VCAM-1: Proteína 1 de adesão celular vascular; CD-90: Glicoproteína Thy-1; CD44: glicoproteína CD44.

Estudos demonstram que os FLS apresentam um retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, com um proeminente complexo de Golgi, núcleo eucromático, com uma fina camada de heterocromatina. Estas células também apresentam invaginações na membrana plasmática denominada pinocitose. Estas estruturas são responsáveis pelo transporte celular, endocitose, transdução de sinais e proliferação celular e possuem uma grande concentração de microfilamentos de actina [37, 45, 46]. Algo que diferencia os FLS de outros tipos de fibroblastos, é a presença dos corpúsculos lamelares [37]. Essas estruturas internas consistem de lamelas concêntricas circulares (bicamada lipídica) ao redor do centro eletrondenso. Os corpúsculos lamelares têm como função o armazenamento de substância surfactante, composta de 10% de proteína e 90% de fosfolipídios. Estes fosfolipídios são sintetizados no retículo endoplasmático rugoso e transportados para o complexo de Golgi, e em seguida são levados para os corpúsculos lamelares. Os corpúsculos irão secretar este surfactante por exocitose para o fluido sinovial presente nas articulações [37].

Além de serem responsáveis pela deposição de moléculas na MEC e sua organização, os FLS também estão envolvidos na sua destruição e remodelamento [25, 47, 48]. Essas células produzem uma diversidade de enzimas degradantes da matriz, que inclui diferentes catepsinas e membros da família metaloproteinase, como MMPs e ADAMTs [25, 32]. A maioria das MMPs não são expressas constitutivamente. Sua expressão é induzida mediante estímulos específicos, como citocinas, fatores de crescimento ou moléculas da MEC. As citocinas pró-inflamatórias TNF-alfa e IL-1beta, são consideradas importantes indutoras da expressão das

MMP-1 e MMP-3, por exemplo. Elas são secretadas pelos MLS na MS e ativam os FLS [10, 49]. A regulação dessas enzimas por TNF-alfa e IL-1beta envolve múltiplos mecanismos (Figura 3), como a ativação da via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e das vias dos três grupos da Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK), como a proteína kinase de regulação de sinal extracelular (ERK) 1 e 2, a c-Jun N-terminal kinase/proteína kinase ativada por estresse (JNK/SAPK) 1 e 2, e as proteínas p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  e a [49-56]. Fatores de crescimento como fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) também induzem a expressão de MMPs em fibroblastos [57].

Somente os FLS têm a característica específica de produzir ácido hialurônico e secretar MMPs, quando comparados com outros fibroblastos [25, 35]. Além disso, essas células podem ser consideradas células efetoras da imunidade inata, principalmente pelo fato de expressarem receptores do tipo Toll (Toll-like receptors, TLRs) e o receptor das famílias de domínio de oligomerização ligante de nucleotídeo (NLR). Estes receptores estão envolvidos na resposta imune a antígenos, a endógenos como cristais de urato e a exógenos como componentes bacterianos. A partir da ativação desses receptores, os FLS produzem quimiocinas, proteases e citocinas, em especial a Interleucina-6 (IL-6) [25, 58]. Essas células são grandes produtores de IL-6, uma citocina considerada importante na regulação da resposta imune inata, da hematopoese e da inflamação, além de ter um papel importante nas doenças articulares inflamatórias [25]. Como ocorre com as MMPs, a expressão de IL-6 também aumenta com o estímulo de TNF-alfa e IL-1beta. Esses estímulos são transmitidos ao núcleo através das vias MAPK e NF- $\kappa$ B (Figura 3) [50-53, 55, 56].



**Figura 3.** Eventos intracelulares de fosforilação que mediam a transdução de sinais de citocinas e metaloproteínas. Via da Proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPK) que é ativada por IL-1, IL-6 e TNF-alfa, que ativam fatores de transcrição no núcleo e levam a expressão de citocinas e MMPs. Via do Inibidor do fator nuclear B (NF-κB) kinase-γ (IKKγ) que é uma subunidade de complexo IκB quinase que ativa o fator de transcrição NF-κB, ela é ativada por IL-1 e TNF-alfa, levando a expressão de citocinas e MMPs. Abreviações: TNF-alfa: fator de necrose tumoral; IL: interleucina; MAPK: Proteína-quinases ativadas por mitógenos; ERK: proteína kinase de regulação de sinal extracelular; JNK: c-Jun N-terminal kinase; MAPKK: Proteína-quinase quinases ativadas por mitógenos; IKK: Inibidor do fator nuclear B (NF-κB) kinase; NF-κB: fator nuclear kappa B. Modificado de Kim, E.K. 2010 [56].

Os FLS têm sido implicados na mudança de um processo inflamatório agudo/reparável para um crônico/persistente, desempenhando um papel fundamental no início e na perpetuação da inflamação articular e na contribuição com a destruição da cartilagem e dos ossos [59]. Eles são capazes de degradar a matriz cartilaginosa, através da expressão de moléculas de adesão que promovem sua aderência (ex.: caderinas) e de proteases (ex: MMPs) que promovem sua destruição [25, 60]. Adicionalmente, essas células causam o desenvolvimento da sinovite, degradação da cartilagem e osso, inibem a apoptose, levando a hiperplasia e auxiliam no crescimento do pannus [10, 25, 61, 62]. Estudos em animais e humanos demonstram que o dano articular dessas doenças pode prosseguir com a participação de FLS isolados da MS, ou seja, presentes no líquido sinovial [63-65]. Estes FLS presentes no fluido são fenotipicamente e funcionalmente semelhantes que o FLS derivados da MS [48, 66].

### 3. JUSTIFICATIVA

Estudos *in vitro* que utilizam culturas de FLS de pacientes com doenças articulares inflamatórias representam um modelo básico para a pesquisa translacional. Contudo, existe uma grande dificuldade na obtenção de FLS provenientes da membrana sinovial de pacientes, visto que é necessário realizar uma artroplastia para a coleta da amostra. Nesta acepção, existem poucos estudos relacionados à substituição de células provenientes da membrana sinovial por células do líquido sinovial, e nenhum emprega células do mesmo paciente.

Além disso, muitos estudos utilizam FLS de modelo experimental de AR como substituto para FLS humanos. Mas poucos procuram entender as diferenças morfológicas e funcionais entre essas células, o que seria útil para estudar os efeitos de novos alvos terapêuticos e o papel dessas células na etiopatogenia da AR.

O melhor entendimento dessas repostas pode abrir novas perspectivas terapêuticas em AR e OA, assim como trazer a praticidade nas coletas de materiais para estudos futuros. Toda esta metodologia já vem sendo utilizada no Laboratório de Pesquisa Científica - Professor Lineu Freire-Maia.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Avaliar funcionalmente sinoviócitos fibroblastos símiles derivados de membrana e líquido sinovial de pacientes com osteoartrite, e avaliar morfológicamente e funcionalmente sinoviócitos fibroblastos símiles de pacientes com artrite reumatoide e comparar com modelo experimental de artrite induzida por colágeno.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Comparar a produção basal e após estimulação com TNF-alfa e IL-1beta, a produção de MMP-1, MMP-3 e IL-6 por FLS proveniente de tecido/membrana sinovial (TD-FLS) e FLS proveniente de fluido/líquido sinovial (FD-FLS) de pacientes com OA.
- Comparar as ultraestruturas dos FLS derivados de líquido sinovial de pacientes com AR (AR-FLS) com os FLS de camundongos com artrite induzida por colágeno (CIA-FLS).
- Comparar a produção de IL-6 e MMP-3 e a ativação de vias de sinalização intracelular (NF- $\kappa$ B e MAPK: p-ERK1 / 2, p-P38 e p-JNK) após estímulo com TNF-alfa e IL-1beta, em culturas de FLS obtidas de pacientes com AR (AR- FLS) e camundongos com artrite induzida por colágeno (CIA-FLS).

## 5. MÉTODOS

### 5.1. Coleta das amostras

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

#### 5.1.1. Coleta de amostras de pacientes com OA

A membrana/tecido sinovial e o líquido sinovial (n=4) de pacientes com OA (n=4), média de idade 65 anos e todos do sexo feminino, foram coletadas e diagnosticadas de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) e os critérios ACR/EULAR [67, 68]. Para obter amostras de tecido sinovial, pacientes submetidos à artroplastia de joelho ou quadril doaram tecido sinovial que foi ressecado durante a cirurgia. Após a coleta, o fragmento removido foi imerso em DMEM em frascos estéreis a 4°C. O espécime cirúrgico foi separado da cartilagem e do tecido adiposo adjacente, e o conteúdo sinovial foi cortado em pedaços de dois milímetros de comprimento usando uma tesoura cirúrgica estéril. A amostra foi então incubada com colagenase tipo IV (Gibco, Life Technologies, EUA) em 0,1% de DMEM durante duas horas sob agitação (100 rpm a 37 °C). No final da digestão com colagenase, o material foi centrifugado e o sedimento foi transferido para um frasco de cultura com meio completo.

Antes de iniciar a artroplastia, as amostras de líquido sinovial foram obtidas dos mesmos pacientes. O aspirado foi coletado e centrifugado a uma velocidade de 1200 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. Após centrifugação, o sedimento foi semeado em frascos de cultura de células com meio completo (DMEM mais soro bovino fetal a 10% (soro fetal bovino, Gibco, Life Technologies, EUA), 1% de estreptomicina/penicilina/anfotericina B (Gibco, Life Technologies, USA) e 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco, Life Technologies, USA)).



O comitê de ética aprovou o protocolo (Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos CAAE: 08387918.6.0000.5149). O consentimento informado foi obtido de todos os participantes individuais incluídos no estudo.

#### 5.1.2. Coleta de amostras de pacientes com AR

Os líquidos sinoviais de pacientes com AR (n=8), média de idade 52,7 anos e todos do sexo feminino, foram coletados e diagnosticados de acordo com os critérios do *American College of Rheumatology* (ACR) e os critérios ACR/EULAR [67, 68].

As amostras de líquido sinovial foram obtidas de pacientes submetidos à punção articular para infiltração de corticosteróides. O procedimento de preparação das amostras foi o mesmo realizado com as amostras de OA. O aspirado foi coletado e centrifugado a uma velocidade de 1200 rotações por minuto (rpm) por 15 minutos. Após centrifugação, o sedimento foi semeado em frascos de cultura de células com meio completo (DMEM mais soro bovino fetal a 10% (soro fetal bovino, Gibco, Life Technologies, EUA), 1% de estreptomicina/penicilina/anfotericina B (Gibco, Life Technologies, USA) e 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco, Life Technologies, USA)). O comitê de ética aprovou o protocolo (Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos CAAE: 08387918.6.0000.5149). O consentimento informado foi obtido de todos os participantes individuais incluídos no estudo.

#### 5.1.3. Indução de camundongos com artrite induzida por colágeno e coleta de amostra

Foram utilizados camundongos DBA1/J machos (8-12 semanas, peso médio 20 gramas). Os animais foram alojados em caixas de plástico de 30x20x12cm, cobertas com maravalhas e sob um ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 18 e 22°C. Água e ração foram oferecidos à vontade.

Os animais foram imunizados com 50 µL de emulsão contendo o mesmo volume de colágeno bovino tipo II (Chondrex; Washington, EUA) e adjuvante de Freund (Merck, Saint Louis, EUA) por injeção intradérmica a uma distância de 1,5 cm da base da cauda no dia zero. A imunização de reforço foi realizada no dia 18 com a mesma concentração de colágeno bovino tipo II (2 mg/ml) emulsionado com adjuvante incompleto de Freund (Merck, Saint Louis, EUA). Após dez dias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O tecido sinovial foi removido da articulação (rádio fêmur-tibial, tíbio-társico e carpal), transferido em placas de seis poços com solução de collagenase I (Merck, Saint Louis, EUA) a 1 mg/ml e incubado a 37°C

com agitação por uma hora em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 1100 rpm durante dez minutos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o líquido foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em meio completo (o mesmo para amostras de pacientes). Todas as manipulações foram realizadas em um de fluxo laminar (VCO) empregando a técnica asséptica. Os animais receberam anestesia com isoflurano por inalação para as imunizações e eutanásia. Todos os procedimentos realizados em estudos envolvendo animais estavam de acordo com os padrões éticos da instituição. A Comissão de Ética no Uso de Animais (Protocolo nº 293/2018) aprovou o estudo animal.

## 5.2. Cultivo das amostras

FLS derivados do tecido sinovial (TD-FLS) e líquido sinovial (FD-FLS) de pacientes com OA (OA-FLS), FLS de pacientes com AR (AR-FLS) e de camundongo com artrite induzida por colágeno (CIA-FLS) foram cultivados seguindo um método similar. Eles foram mantidos em uma estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> com troca do meio de cultura a cada três dias, quando as culturas atingiam a confluência, as células eram submetidas a remoção enzimática com solução de tripsina a 0,05 % em EDTA 0,02 % (Trypsin-EDTA, Gibco nº cat. 25300-062) a 37°C por 3 minutos, logo eram semeadas em três garrafas de mesmo tamanho ou congeladas de acordo com suas passagens.

As culturas foram avaliadas por microscopia invertida diariamente para avaliação do crescimento e morfologia celular, além da averiguação do estado de contaminação. Para os experimentos, foram utilizadas as culturas de FLS a partir da quinta passagem (>95% de pureza do FLS).

## 5.3. Estímulo das amostras

### 5.3.1. Estímulo em OA-FLS (TD-FLS e FD-FLS)

Para as amostras de TD-FLS e FD-FLS de pacientes com OA, foram semeadas em placas com 24 poços (150.000 células/poço) mantidas por 24 horas imersas em meio DMEM com 1% de soro fetal bovino e 1% de solução estreptomina em uma estufa a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Em placas de 24 poços, as células foram estimuladas (e não estimuladas) com 1; 5; 10 e 50 ng/ml de TNF-alfa (Peprotech, ref.: 300-01A) e 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 1 ng/ml de IL-1beta (Peprotech, ref.: 200-01B). Após 22 horas de estimulação, o sobrenadante foi coletado para a dosagem de

IL-6, MMP-1 e -3 (human MMP-3 DuoSet® – R&D systems ref.: DY513, USA, human MMP-1 DuoSet®- R&D systems ref.: DY901B , USA and human IL-6 DuoSet® – R&D systems ref.: DY206, USA). Todo o processo foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

### 5.3.2. Estímulos em AR-FLS e CIA-FLS

Para as amostras de AR-FLS e CIA-FLS, o processo de preparo para estímulo nas placas de 24 poços foi similar ao de OA-FLS. As células foram estimuladas com 50 ng/mL de TNF-alfa (Peprotech, ref.: human 300-01A e murine 315-01A) e 1 ng/ml de IL-1beta (Peprotech, ref.: human 200-01B e murine 211-11B) por 24 horas. Para todas as amostras houve controles sem estímulo. O sobrenadante foi colhido para a detecção da IL-6 e MMP-3 por ELISA (human MMP-3 DuoSet® – R&D systems ref.: DY513; Mouse Total MMP-3 DuoSet ELISA ref.: DY548; human IL-6 DuoSet® – R&D systems ref.: DY206; Mouse IL-6 DuoSet ELISA DY406). Todo o processo foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a análise das vias de sinalização, ambos os grupos de células foram transferidos para placas com seis poços (1 X 10<sup>6</sup> células/poço) e estimuladas com 50 ng/mL de TNF-alfa e 1 ng/ml de IL-1beta por 30 minutos. Para todas as amostras houve controles sem estímulo. Após o tempo de estimulação, as culturas foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,4 a 4°C e submetidas à lise celular, por 3 minutos, pela adição de 300 µL de solução de tampão de lise (25mM Tris [2-Amino-2hidroximetil-propano-1,3-diol], pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 5 mM pirofosfato de sódio; 1 mM ortovanato de sódio; 10 mM fluoreto de sódio; 10% glicerol; 1 mM PMSF [fluoreto de fenilmetilsulfonilo]; 25 µg/ml leupeptina; 25 µ/ml aprotinina; 2 µ/ml pepstatina; 1 tablete de inibidor de protease – Complete (Roche)) a 4°C. Logo após a lise celular, as placas foram raspadas com uma espátula de borracha. A concentração de proteínas foi determinada nas amostras pelo método de Bradford e carregado em cada poço dos géis a quantidade de 45 µg de proteína para eletroforese. No lisado celular foram determinadas por Western Blotting (Invitrogen) as seguintes proteínas fosforiladas: ERK1/2 (Cell signaling ref: 9101), p38 (Cell signaling ref: 4511), JNK (Cell signaling ref: 9251), o fator de transcrição: NF-κB (Cell signaling ref: 3033) e β-actin (Arigo ref: ARG53987). Todo o processo foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

## 5.4. Dosagens das amostras

### 5.4.1. Técnica por ELISA

As concentrações de IL-6, MMP-1 e MMP-3 (human MMP-3 DuoSet® – R&D systems ref.: DY513; Mouse Total MMP-3 DuoSet ELISA; human MMP-1 DuoSet®- R&D systems ref.: DY901B; human IL-6 DuoSet® – R&D systems ref.: DY206; Mouse IL-6 DuoSet ELISA DY406) no sobrenadante das células foram medidas pela técnica de ELISA utilizando o seguinte protocolo. Inicialmente uma placa de 96 poços (Mikrotestplat 96 well, Sarstedt, catálogo 821581) foi sensibilizada com um anticorpo primário por 18 horas a temperatura ambiente. Toda a solução dos poços foi aspirada e a placa foi lavada 3 vezes com o tampão de lavagem (Tween 20 a 0,05% em PBS). A seguir foi adicionado o tampão diluente padrão (Soro fetal bovino a 1% em PBS 1X (Albumin, bovine serum, Fraction V, approx. 99%)) por 1 hora. Realizou-se novamente o processo de lavagem. Em seguida o padrão e as amostras foram colocados em seus respectivos poços e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas. Repetiu-se o processo de lavagem. Logo, adicionou-se o anticorpo conjugado com biotina em cada poço com exceção dos poços do branco e a placa foi novamente incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Realizou-se novamente o processo de lavagem. Em seguida, adicionou-se a solução de streptavidina-HRP em cada poço e a placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. Repetiu-se o processo de lavagem. O cromógeno foi adicionado e a incubação foi realizada por 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Neste momento foi adicionado à solução de ácido sulfúrico 2 N para parar a reação. A espectrofotometria foi realizada em um leitor de placas com um filtro de comprimento de onda calibrado a 450 nm. Com os valores fornecidos pelo leitor foi possível determinar a concentração de cada proteína nas amostras. Todas as dosagens foram feitas conforme recomendações do fabricante dos kits (R&D System).

### 5.4.2. Técnica por Western Blotting

Dosagem das proteínas fosforiladas ERK1/2, JNK e P38 e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B foram realizadas pela técnica de *Western Blotting*. Foram utilizados géis de SDS-poliacrilamida (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel 1.0X12 well, Invitrogen, catálogo NP0322BOX) nas quais as amostras foram carregadas juntamente com o padrão de peso molecular. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Nitrocellulose Membrane

Filter Paper Sandwich, 0,45 $\mu$ m Pore Size, Invitrogen, catálogo LC2001) e incubada com o tampão de bloqueio (TBS 1X com Tween 20 e leite em pó 4 %) por 1 hora à temperatura ambiente, logo foi realizada a lavagem com TBS 1X com 0.1% de tween 20 (TBST) por 3 vezes a cada 5 minutos. Adicionou-se o anticorpo primário anti-fosfo-tirosina sob baixa agitação permanecendo pernoite a 4°C. Repetiu-se o processo de lavagem e logo incubou-se a membrana com o anticorpo secundário anti-rabbit IgG sob baixa agitação à temperatura ambiente por 1 hora. Novamente repetiu-se o processo de lavagem e a leitura foi realizada através do Kodak Image Station 4000R.

## **5.5. Imunofenotipagem**

Para caracterização, foram preparadas culturas de OA-FLS (TD-FLS e OA-FLS), CIA-FLS e de AR-FLS. Estas foram mobilizadas por tripsinização 0,05 % em EDTA 0,02 % a 37°C e lavadas duas vezes com PBS 1X. Após a contagem das células, estas foram plaqueadas em  $2 \times 10^5$  células/poço em uma quantidade de 20ul/poço e diluídas em 20ul de solução de tampão de citometria de fluxo (PBS contendo 1% soro fetal bovino e 0.01% azida). Para FLS humanos, utilizou-se anticorpos monoclonais anti-human CD14 PerCP-Cyanine 5.5, anti-human CD45 V450, anti-human CD90 PhicoEritrine (PE), e os anticorpos do controle de isotipo marcados com PE, V450 e PerCP (todos da BD Biosciences) e um controle de células não marcadas foi incluído em todos os experimentos. Para os FLS de camundongo, utilizou-se o anticorpo monoclonal anti-mouse CD45 V450, anti-rat CD90.1 PE e os anticorpos do controle de isotipo marcados com V450 e PE (todos os anticorpos monoclonais de camundongo são da BD Biosciences) e células não marcadas. As células foram marcadas com os anticorpos durante 20 min à 4°C no escuro, lavadas, ressuspensas com PBS 1X e analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). Foi utilizado um mínimo de 100 mil eventos para cada amostra e a aquisição foi processada usando o software Diva (BD Biosciences). Os dados foram analisados no software Flowjo (Tree Star).

## **5.6. Microscopia eletrônica de AR-FLS e CIA-FLS**

### **5.6.1. Microscopia eletrônica de varredura**

Para análise por microscopia eletrônico de varredura (MEV), AR-FLS e CIA-FLS foram depositadas em lamínulas tratadas com poli-L-lisina. Após a aderência das células, o meio

DMEM foi aspirado e as células foram lavadas com tampão fosfato salino 1X (PBS). As culturas foram então imersas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M. Após 120 minutos, a solução de fixação foi aspirada e substituída por tampão cacodilato 0,1M. Em seguida as amostras foram lavadas com três passagens de 10 minutos cada em tampão cacodilato 0,1 M, e imergidas em uma solução de tetraóxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) 1% em tampão cacodilato 0,1 M por uma hora, a temperatura ambiente. As amostras fixadas em OsO<sub>4</sub> foram lavadas com água destilada e desidratadas com soluções crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%) e acetona, permanecendo por 10 minutos em cada uma. As amostras desidratadas foram submetidas a secagem em ponto crítico. O material seco foi montado de forma adequada sobre um suporte de amostras para MEV. As amostras foram visualizadas por MEV (FEG - Quanta 200 FEI). O formato celular, a distensão e a emissão de projeções citoplasmáticas foram analisadas em 20 células AR-FLS e 20 células CIA-FLS.

#### 5.6.2. Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET), a preparação incluiu a aspiração de meio de cultura DMEM seguido por lavagem com PBS. As culturas foram então fixadas durante 120 minutos com glutaraldeído a 2,5% (EM grade, 50% aqueous solution, Electron Microscopy Sciences-EMS, Hatfield, PA, EUA) em tampão cacodilato 0,1 M, a 4°C. As amostras fixadas foram lavadas, soltas por uma espátula, e transferidas para tubos falcons estéreis de 50 ml. Em seguida, centrifugou-se o material a 3000 rpm por 5 minutos, e os pellets foram fixados em tetróxido de ósmio a 2% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em tampão cacodilato 0,1M por 2h, à temperatura ambiente. Depois de lavar três vezes com água destilada por 15 minutos cada, as amostras foram contrastadas em bloc com acetato de uranila (EMS) a 2% em água por 24h, à temperatura ambiente, sem exposição à luz. Em seguida, foram lavadas com água destilada como descrito acima e desidratadas em série crescente de alcoóis (35°, 50°, 70°, 85°, 95°, 100°) e acetona por 20 minutos cada. Após a desidratação, seguiu-se a infiltração em mistura de acetona-resina Epon (Resina EMBed 812, EMS) na proporção de 1:2, 1:1 e 1:2, durante 12 h cada, e resina pura por 3 horas. Posteriormente, as células foram incluídas na mesma resina dentro de cápsulas BEEM® (Ted Pella, Redding, CA, EUA) e polimerizadas a 60°C por 48 h. Após a polimerização da resina, cortes semifinos de 300 nm foram obtidos da superfície dos blocos com auxílio de navalhas de vidro e corados com azul de toluidina-borato de sódio. Após a seleção da área de interesse, seções ultrafinas (~60 nm) foram obtidas em ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) utilizando-

se navalha de diamante. As secções foram montadas em telas de cobre de 200 mesh (Ted Pella), contrastadas com citrato de chumbo (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos e analisadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai G2-12 Spirit Biotwin Thermo Fischer Scientific/FEI 2006, Eindhoven, Holanda) a 120 kV. As amostras foram visualizadas por MET (Tecnai G2-12 Spirit Biotwin FEI - 120 kV). Para investigação das características dos AR-FLS e CIA-FLS, foram obtidas imagens de 20 células por grupo revelando todo o perfil celular, incluindo o núcleo e detalhes subcelulares em ampliações de 4200, 16500 e 20500 vezes. As análises ultraestruturais básicas concentraram-se nas organelas envolvidas na síntese clássica das células: núcleo, retículo endoplasmático rugoso, aparelho de Golgi e mitocôndrias. As análises morfométricas foram concentradas em organelas envolvidas com o processo de pinocitose celular (pinocitose e vesículas pinocitóticas), corpúsculos lamelares e mitocôndrias. A morfometria foi baseada na quantidade relativa de cada organela por número de células.

## **5.7. Análise estatística**

### **5.7.1. Análise estatística dos resultados obtidos com TD-FLS e FD-FLS de pacientes com OA**

Para a análise de TD-FLS e FD-FLS de pacientes com OA, utilizou-se o teste t pareado, a correlação de Spearman e a concordância de Bland Altman, para comparações entre as concentrações de MMP-1, MMP-3 e IL-6 medidas no sobrenadante das culturas de FLS. O GraphPad Prisma versão 6.01 foi usado para análise de dados e produção de gráficos. Considerou-se evidência de significância, efeitos com valores de  $p < 0,05$ .

### **5.7.2. Análise estatística dos resultados obtidos com AR-FLS e CIA-FLS**

Para a análise comparativa entre AR-FLS e CIA-FLS, utilizou-se o teste não paramétrico U de Mann-Whitney (distribuição das variáveis não normal) para a comparação das concentrações de MMP-3 e IL-6 entre os estímulos TNF-alfa e IL-1beta de cada grupo, e para comparar as quantidades de pinocitose, vesículas pinocitóticas, mitocôndrias e corpúsculos lamelares entre os dois grupos. O GraphPad Prisma versão 6.01 foi usado para análise de dados e produção de gráficos. Considerou-se evidência de significância, efeitos com valores de  $p < 0,05$ .

## 6. REFERÊNCIAS

1. Vuorio, E., et al., *Effects of sodium aurothiomalate on hyaluronic acid synthesis in normal and rheumatoid synovial fibroblast cultures*. Scand J Rheumatol, 1979. **8**(3): p. 173-6.
2. Attur, M.G., et al., *Osteoarthritis or osteoarthrosis: the definition of inflammation becomes a semantic issue in the genomic era of molecular medicine*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(1): p. 1-4.
3. Krasnokutsky, S., et al., *Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2008. **16 Suppl 3**: p. S1-3.
4. Sharma, L., D. Kapoor, and S. Issa, *Epidemiology of osteoarthritis: an update*. Curr Opin Rheumatol, 2006. **18**(2): p. 147-56.
5. Felson, D.T., *Clinical practice. Osteoarthritis of the knee*. N Engl J Med, 2006. **354**(8): p. 841-8.
6. Felson, D.T., *An update on the pathogenesis and epidemiology of osteoarthritis*. Radiol Clin North Am, 2004. **42**(1): p. 1-9, v.
7. Scanzello, C.R. and S.R. Goldring, *The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis*. Bone, 2012. **51**(2): p. 249-57.
8. Martel-Pelletier, J., *Pathophysiology of osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2004. **12 Suppl A**: p. S31-3.
9. Sellam, J. and F. Berenbaum, *The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2010. **6**(11): p. 625-35.
10. Tu, J., et al., *Ontology and Function of Fibroblast-Like and Macrophage-Like Synoviocytes: How Do They Talk to Each Other and Can They Be Targeted for Rheumatoid Arthritis Therapy?* Front Immunol, 2018. **9**: p. 1467.
11. Haywood, L., et al., *Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(8): p. 2173-7.
12. Nakamura, H., et al., *T-cell mediated inflammatory pathway in osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 1999. **7**(4): p. 401-2.
13. Bonnet, C.S. and D.A. Walsh, *Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(1): p. 7-16.
14. Chen, D., et al., *Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism*. Bone Res, 2017. **5**: p. 16044.



15. Dieppe, P., et al., *The Bristol 'OA500 study': progression and impact of the disease after 8 years*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000. **8**(2): p. 63-8.
16. Peters, T.J., et al., *Factors associated with change in pain and disability over time: a community-based prospective observational study of hip and knee osteoarthritis*. *Br J Gen Pract*, 2005. **55**(512): p. 205-11.
17. Dieppe, P., *Disease modification in osteoarthritis: are drugs the answer?* *Arthritis Rheum*, 2005. **52**(7): p. 1956-9.
18. Garnero, P., J.C. Rousseau, and P.D. Delmas, *Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(5): p. 953-68.
19. Pincus, T., et al., *Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years*. *Arthritis Rheum*, 1984. **27**(8): p. 864-72.
20. Pinto, M.R.C.B., M.B.; Kakehasi, A.M.; Carvalho, M.A.P., *Artrite Reumatoide*. 4 ed. *Reumatologia diagnóstico e tratamento*, ed. M.A.P.L. Carvalho, C.C.D.; Bértolo, M.B.; Ferreira, G.A. 2014, Rio de Janeiro: AC Farmacêutica LTDA.
21. Scott, D.L., F. Wolfe, and T.W. Huizinga, *Rheumatoid arthritis*. *Lancet*, 2010. **376**(9746): p. 1094-108.
22. Feldmann, M., F.M. Brennan, and R.N. Maini, *Rheumatoid arthritis*. *Cell*, 1996. **85**(3): p. 307-10.
23. Strand, V., R. Kimberly, and J.D. Isaacs, *Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions*. *Nat Rev Drug Discov*, 2007. **6**(1): p. 75-92.
24. Neumann, E., et al., *Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts*. *Trends Mol Med*, 2010. **16**(10): p. 458-68.
25. Bartok, B. and G.S. Firestein, *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. *Immunol Rev*, 2010. **233**(1): p. 233-55.
26. Williams, R.O., *Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis*. *Methods Mol Med*, 2004. **98**: p. 207-16.
27. Williams, R.O., *Rodent models of arthritis: relevance for human disease*. *Clin Exp Immunol*, 1998. **114**(3): p. 330-2.
28. Caplazi, P., et al., *Mouse Models of Rheumatoid Arthritis*. *Vet Pathol*, 2015. **52**(5): p. 819-26.

29. Herbage, D., J. Bouillet, and J.C. Bernengo, *Biochemical and physiochemical characterization of pepsin-solubilized type-II collagen from bovine articular cartilage*. *Biochem J*, 1977. **161**(2): p. 303-12.
30. Geiger, T., et al., *Neutralization of interleukin-1 beta activity in vivo with a monoclonal antibody alleviates collagen-induced arthritis in DBA/1 mice and prevents the associated acute-phase response*. *Clin Exp Rheumatol*, 1993. **11**(5): p. 515-22.
31. Elliott, M.J., et al., *Repeated therapy with monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) in patients with rheumatoid arthritis*. *Lancet*, 1994. **344**(8930): p. 1125-7.
32. Moraes, S., *Histologia Básica*. 11 ed. 2008, Rio de Janeiro.
33. van de Sande, M.G. and D.L. Baeten, *Immunopathology of synovitis: from histology to molecular pathways*. *Rheumatology (Oxford)*, 2016. **55**(4): p. 599-606.
34. Kunisch, E., et al., *IL-33 regulates TNF-alpha dependent effects in synovial fibroblasts*. *Int J Mol Med*, 2012. **29**(4): p. 530-40.
35. Pap, T., et al., *Synovial fibroblasts and articular tissue remodelling: Role and mechanisms*. *Semin Cell Dev Biol*, 2020.
36. Kiener, H.P., et al., *Synovial fibroblasts self-direct multicellular lining architecture and synthetic function in three-dimensional organ culture*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(3): p. 742-52.
37. Vandenabeele, F., et al., *Morphological and immunocytochemical characterization of cultured fibroblast-like cells derived from adult human synovial membrane*. *Arch Histol Cytol*, 2003. **66**(2): p. 145-53.
38. Morales-Ducret, J., et al., *Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes*. *J Immunol*, 1992. **149**(4): p. 1424-31.
39. Cavaillon, J.M., *The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff*. *J Leukoc Biol*, 2011. **90**(3): p. 413-24.
40. Li, F., et al., *Nomenclature clarification: synovial fibroblasts and synovial mesenchymal stem cells*. *Stem Cell Res Ther*, 2019. **10**(1): p. 260.
41. Valencia, X., et al., *Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes*. *J Exp Med*, 2004. **200**(12): p. 1673-9.
42. Chang, S.K., et al., *Cadherin-11 regulates fibroblast inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(20): p. 8402-7.
43. Hardy, R.S., et al., *Characterisation of fibroblast-like synoviocytes from a murine model of joint inflammation*. *Arthritis Res Ther*, 2013. **15**(1): p. R24.

44. Okazaki, M., et al., *Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts*. J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 12092-8.
45. Sinha, B., et al., *Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae*. Cell, 2011. **144**(3): p. 402-13.
46. Panariti, A., G. Misericocchi, and I. Rivolta, *The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions?* Nanotechnol Sci Appl, 2012. **5**: p. 87-100.
47. Mor, A., S.B. Abramson, and M.H. Pillinger, *The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction*. Clin Immunol, 2005. **115**(2): p. 118-28.
48. Machado, C.R.L., et al., *Fibroblast-like synoviocytes from fluid and synovial membrane from primary osteoarthritis demonstrate similar production of interleukin 6, and metalloproteinases 1 and 3*. Clin Exp Rheumatol, 2019. **37**(2): p. 306-309.
49. Pap, T., et al., *Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(6): p. 1226-32.
50. Xu, H., et al., *Anti-malarial agent artesunate inhibits TNF-alpha-induced production of proinflammatory cytokines via inhibition of NF-kappaB and PI3 kinase/Akt signal pathway in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(6): p. 920-6.
51. Guo, X., et al., *Fractalkine stimulates cell growth and increases its expression via NF-kappaB pathway in RA-FLS*. Int J Rheum Dis, 2012. **15**(3): p. 322-9.
52. Thalhamer, T., M.A. McGrath, and M.M. Harnett, *MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation*. Rheumatology (Oxford), 2008. **47**(4): p. 409-14.
53. Vincenti, M.P., C.I. Coon, and C.E. Brinckerhoff, *Nuclear factor kappaB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1beta-stimulated synovial fibroblasts*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(11): p. 1987-94.
54. Firestein, G.S. and A.M. Manning, *Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(4): p. 609-21.
55. Hammaker, D., S. Sweeney, and G.S. Firestein, *Signal transduction networks in rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2003. **62 Suppl 2**: p. ii86-9.
56. Kim, E.K. and E.J. Choi, *Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(4): p. 396-405.
57. Rosengren, S., M. Corr, and D.L. Boyle, *Platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta synergistically potentiate inflammatory mediator synthesis by fibroblast-like synoviocytes*. Arthritis Res Ther, 2010. **12**(2): p. R65.

58. Baumann, H. and I. Kushner, *Production of interleukin-6 by synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis*. Am J Pathol, 1998. **152**(3): p. 641-4.
59. Bottini, N. and G.S. Firestein, *Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors*. Nat Rev Rheumatol, 2013. **9**(1): p. 24-33.
60. Buckley, C.D., et al., *Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation*. Trends Immunol, 2001. **22**(4): p. 199-204.
61. Pap, T., et al., *Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, 2000. **2**(5): p. 361-7.
62. Chan, A., et al., *Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondylarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(3): p. 707-17.
63. Neidhart, M., et al., *Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(7): p. 1873-80.
64. Muller-Ladner, U., et al., *Progressive joint destruction in a human immunodeficiency virus-infected patient with rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(9): p. 1328-32.
65. O'Sullivan, F.X., W.J. Koopman, and S. Gay, *Scanning electron microscopic evaluation of the arthritis in MRL/lpr mice*. Rheumatol Int, 1992. **12**(3): p. 115-20.
66. Stebulis, J.A., et al., *Fibroblast-like synovial cells derived from synovial fluid*. J Rheumatol, 2005. **32**(2): p. 301-6.
67. Aletaha, D., et al., *2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(9): p. 2569-81.
68. Arnett, F.C., et al., *The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1988. **31**(3): p. 315-24.

## 7. ARTIGO PUBLICADO

Clinical and Experimental Rheumatology. 2019 Mar-Apr;37(2):306-309. Epub 2018 Dec 19.

### **Fibroblast-like synoviocytes from fluid and synovial membrane from primary osteoarthritis demonstrate similar production of interleukin 6, metalloproteinases 1 and 3**

Camilla Ribeiro Lima Machado <sup>1</sup>, Gustavo Gomes Resende <sup>1</sup>, Rafaela Bicalho Viana Macedo <sup>1</sup>, Vanuza Chagas do Nascimento <sup>1</sup>, Angela Soares da Cunha Castello Branco <sup>1</sup>, Adriana Maria Kakehasi <sup>1</sup>, Marcus Vinicius Andrade <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Scientific Research “Professor Lineu Freire-Maia”, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG);

Please address correspondence to:

Dr Marcus Vinicius Andrade  
Avenida Alfredo Balena 190,  
Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil  
30130-100  
Tel.: +55-31-3409 8054 (Lab)  
Cel.: +55-31-98805 3393  
E-mail: [andradem@medicina.ufmg.br](mailto:andradem@medicina.ufmg.br)

PMID: 30620271

## Fibroblast-like synoviocytes from fluid and synovial membrane from primary osteoarthritis demonstrate similar production of interleukin 6, and metalloproteinases 1 and 3

C.R.L. Machado, G.G. Resende, R.B.V. Macedo, V.C. do Nascimento, A.S. Branco, A.M. Kakehasi, M.V. Andrade

<sup>1</sup>Laboratory of Scientific Research #30 "Professor Lineu Freire-Maia", Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil.

Camilla Ribeiro Lima Machado, MSc  
Gustavo Gomes Resende, MSc  
Rafaela Bicalho Viana Macedo, MD, MSc  
Vanuza Chagas do Nascimento, Biol.  
Angela Soares da Cunha

Castello Branco, Sta, MSc

Adriana Maria Kakehasi, MD, PhD  
Marcus Vinicius Andrade, MD, PhD

Please address correspondence to:  
Dr Marcus Vinicius Andrade,  
Avenida Alfredo Balena 190,  
Belo Horizonte,  
Minas Gerais 30130-100, Brazil.  
E-mail: andradem@medicina.ufmg.br

Received on May 8, 2018; accepted in revised form on September 3, 2018.

© Copyright CLINICAL AND EXPERIMENTAL RHEUMATOLOGY

**Key words:** fibroblast-like synovial, osteoarthritis, metalloproteinases

*Funding:* this study received support from: Fundo de Apoio à Pesquisa e Ensino - Sociedade Brasileira de Reumatologia (FAPE-SBR), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq).  
*Competing interests:* none declared.

### ABSTRACT

**Objective.** *The objective of the study was to compare the production of metalloproteinases (MMP)-1, -3 and interleukin (IL)-6 by fibroblast-like synoviocytes (FLS) derived from synovial fluid (FD-FLS), and FLS derived from synovial tissue (TD-FLS) of patients with primary osteoarthritis (OA). The more accessible FD-FLS could facilitate the study of the role of these cells in OA pathophysiology.*

**Methods.** *MMP-1, MMP-3, and IL-6 levels were measured in the supernatant culture at baseline and 22 hours after stimulation with TNF- $\alpha$  and IL-1  $\beta$ .*

**Results.** *There was no difference at baseline between MMP-1, MMP-3 and IL-6 production by FD-FLS and TD-FLS. Analogous to baseline, stimulation of FD-FLS and TD-FLS with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  did not result in difference on MMP-3 and IL-6 production. However, TD-FLS produced more MMP-1 than FD-FLS after stimulation with IL-1 $\beta$  ( $p=0.01$ ). Additionally, there was a positive correlation for production of MMP-1, MMP-3 and IL-6 between FD-FLS and TD-FLS ( $r=0.40$  and  $p<0.0008$ ;  $r=0.66$  and  $p<0.0001$ ;  $r=0.76$  and  $p<0.0001$ , respectively). Supporting this statistical significant positive correlation, the Bland-Altman plotting, showed a homogeneous distribution of the values and low mean disagreement rates between all results of FD-FLS and TD-FLS (23.1%, 56.8% and 48.1%, respectively).*

**Conclusion.** *Our data demonstrated functional similarity between FD-FLS and TD-FLS and support the use of a more accessible source of FLS for the study of the pathogenesis of joint destruction and therapeutic targets in primary OA.*

### Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common joint disease, but its pathogenic process of cartilage destruction remains largely unknown (1). Biomechanical factors, pro-inflammatory mediators, and proteases determine the damage of cartilage and subchondral bone tissues in OA. The synovial membrane becomes inflamed and the cartilage is degraded by catabolic enzymes. Syno-

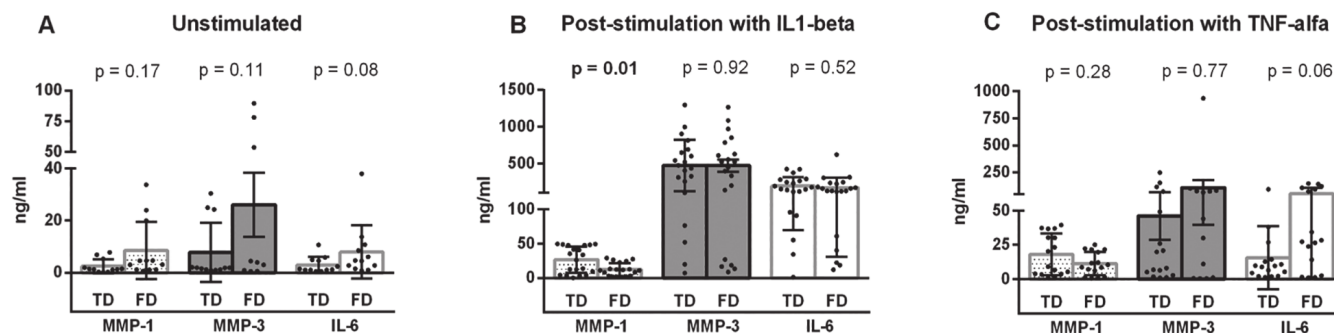
vial membrane and the synovial fluid show an increase in inflammatory cells population and cytokines (2). Fibroblast-like synoviocytes (FLS) actively participate in the synovitis-structural damage cycle of OA through the production of inflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6), and cartilage-degrading enzymes, such as metalloproteinases (MMPs) (3). Of special interest, interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) and tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) have been shown to be involved in the initiation and progression of articular cartilage destruction. The capability of IL-1  $\beta$  and TNF- $\alpha$  to promote cartilage degradation is associated to their ability to promote the synthesis and release of MMPs and to suppress proteoglycan and collagen synthesis by human synovial cells and chondrocytes (4, 5). *In vitro* studies using FLS cultures from patients with joint diseases represent a basic model for translational research but there is a substantial difficulty in obtaining synovial tissue-derived FLS (TD-FLS) in patients with primary OA. It is debatable if synovial fluid-derived FLS (FD-FLS) can replace TD-FLS as a cell source for experiments addressing this lineage. There are few studies comparing functionality of FD-FLS and TD-FLS of patients with OA, but almost no studies that have utilised cells from fluid and tissue from the same patient.

The aim of this study was to compare, baseline and after stimulation with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , the production of MMP-1, MMP-3 and IL-6 by TD-FLS and FD-FLS from patients with primary osteoarthritis.

### Materials and methods

#### Sample collection and cell culture

Liquid and synovial tissue samples from the same patients with primary knee osteoarthritis classified according to the 1986 American College of Rheumatology criteria (6) ( $n=4$ ) were collected during their total knee arthroplasty. The mean age of patients was 65 years (range 55–79 years). Samples of synovial fluid were centrifuged at 1200 rpm for 15 minutes, the supernatant discarded and the pellet seeded into cell culture flasks with Dulbecco's



**Fig. 1.** Production of metalloproteinases (MMP)-1, -3 (and interleukin (IL)-6 without stimulation (A) and after stimulation with IL-1 $\beta$  (B) and TNF- $\alpha$  (C) by fibroblast-like synoviocytes from tissue derived (TD) and synovial fluid derived (FD) of patients with osteoarthritis (n=4).

Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Life Technologies, USA), plus 10% fetal bovine serum (Gibco, Life Technologies, USA), 1% streptomycin/penicillin/amphotericin B solution (Gibco, Life Technologies, USA) and 1% non-essential amino acids (Gibco, Life Technologies, USA). Tissue samples were separated from adjacent cartilaginous and adipose structures, cut into 2 mm thick pieces and incubated with 0.1% collagenase type IV (Gibco, Life Technologies, USA) in overnight DMEM medium with shaking of 100 rpm at 37°C. At the end of the collagenase digestion, the material was centrifuged and the pellet transferred to culture bottle with the same culture medium described above for liquid samples.

Cultures were maintained in an oven at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> with exchange of the culture medium every three days until freezing of appropriate passages. For all experiments, cultures were used in the 9th passage (P9).

All patients enrolled in the study signed a free and informed consent form, approved by the local Research Ethics Committee (ETIC 0637.0.203.00-10), prior to any study procedure.

#### Stimuli and dosages

The cells were transferred to 24-well plates (150,000 cells / well) and maintained for 24 hours immersed in DMEM medium enriched with 1% fetal bovine serum and 1% streptomycin/penicillin/amphotericin B solution and kept in the 37°C incubator and 5% CO<sub>2</sub> to be stimulated (and non-stimulated) with TNF- $\alpha$  at concentrations 1; 5; 10 and 50 ng/ml and IL-1 $\beta$  at concentra-

tions 0.1; 0.2; 0.3; 0.5; 1 ng/ml. After 22 hours of stimulation with these agonists, the supernatant was harvested for the detection of IL-6, MMP 1 and 3 by ELISA (human MMP-3 DuoSet® - R&D systems, USA, human total MMP-1 DuoSet® - R&D systems, USA and human IL-6 DuoSet® - R&D systems, USA) following the manufacturer's protocols.

#### Immunophenotyping

For human FLS, monoclonal antibodies, including anti-human CD14 PerCP-Cyanine 5.5, anti-human CD45 V450, anti-human CD90 PE, isotype control antibodies labelled with PE, V450 and PerCP (all human monoclonal antibodies are from BD Biosciences), and a non-labelled cell control, were included in all experiments. Cells were stained with these antibodies for 20 min at 4°C in dark, washed, resuspended in PBS and analysed by a flow cytometer in FACS Canto II (BD Biosciences). At least 100,000 events were used for each sample, and the acquisition was processed using the software Diva (BD Biosciences). Data were analysed with Flowjo software (Tree Star).

#### Statistical analysis

It was used the paired *t*-test, the Spearman correlation and the Bland Altman concordance analysis, for the comparisons between the concentrations of MMP-1, MMP-3 and IL-6 measured in the culture supernatant of FLS derived from synovial fluid and synovial tissue. GraphPad Prism v. 6.01 was used for data analysis and graph production. It was considered evidence of significance, effects with *p*-values <0.05.

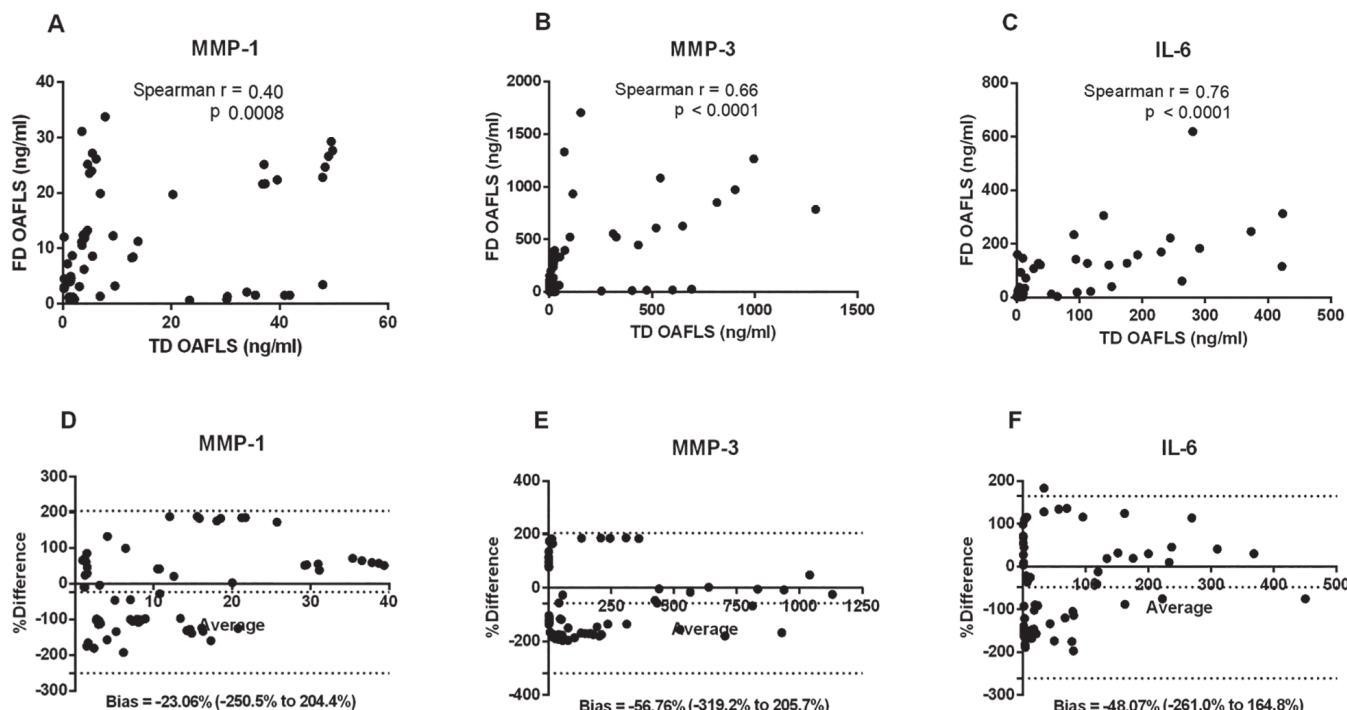
#### Results

The cell immunophenotyping showed that OAFLS cells from synovial fluid and from synovial membrane were anti-CD90 positive. The anti-CD45, expressed on leukocytes, and anti-CD14, expressed on monocytes and macrophages, did not mark the FLS. The positivity for the CD90 marker confirmed the FLS origin and cell culture pureness (data not shown).

Figure 1 shows production of MMP-1, MMP-3 and IL-6 by TD- and FD-FLS at baseline and after stimulation with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . At baseline, TD- and FD-FLS constitutively produced metalloproteinases and IL-6 with no statistical difference between samples (Fig. 1A). Stimulation of TD- and FD-FLS with IL-1 $\beta$  (Fig. 1B) and TNF- $\alpha$  (Fig. 1C) resulted an increase release of MMP-1, -3 and IL-6. When production of metalloproteinases and IL-6 by TD- and FD-FLS were compared, both at baseline and after pro-inflammatory stimulation, there was no statistical difference between cells, except for MMP-1 after stimulation with IL-1 $\beta$  (*p*=0.01). Additionally, for all three products (MMP-1, MMP-3 and IL-6) we found a positive correlation between FD-FLS and TD-FLS values (*r*=0.40 and *p*<0.0008; *r*=0.66 and *p*<0.0001; *r*=0.76 and *p*<0.0001, respectively) (Fig. 2). Using the Bland-Altman plotting, we found a homogeneous distribution of the values and low mean disagreement rates between all the observations of TD- and FD-FLS (23.1%, 56.8% and 48.1%, respectively) (Fig. 2).

#### Discussion

Recent advances in management of



**Fig. 2.** Correlations between concentrations of MMP-1 (A), MMP-3 (B), and IL-6 (C) in supernatant of fibroblast-like synoviocytes cultures from synovial fluid-derived (FD) and tissue derived (TD) of patients with osteoarthritis (OAFS) (stimulated and non-stimulated). Bland-Altman plot for percentage of discordance (Bias) between supernatant concentrations of MMP-1 (D), MMP-3 (E) and IL-6 (F) on fibroblast-like synoviocytes cultures from synovial tissue and fluid of osteoarthritis patients. MMP-1: metalloproteinase-1; MMP-3: metalloproteinase-3; IL-6: interleukin-6.

patients with OA have resulted in reduced access by investigators to synovial tissue. As a result, there is a substantial difficulty in obtaining TD-FLS from patients with OA. Thus, a more accessible source of synovial cells than the tissue from replaced joint may increase the availability of FLS to perform *in vitro* studies. Additionally, it is more convenient to obtain cells at different times (before and after treatment) from synovial fluid from the same patient with rheumatic disease through synovial joint effusion approach.

In the present study, we have shown similar responses of FLS from tissue and fluid at baseline and after stimulation with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . Also, our results show that IL-6, MMP-1 and MMP-3 are produced constitutively by FD-FLS and TD-FLS and their synthesis is up-regulated by IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are considered important players in OA because they stimulate the synthesis and secretion of many proteases and MMPs (7). IL-1 $\beta$  is related to the destruction of cartilage, and TNF- $\alpha$  is associated to induction of downstream inflammatory cascade.

These two cytokines induce the production of a number of inflammatory diseases and catabolic factors (8).

MMP-1 and MMP-3 are expressed by TD-FLS and production of these enzymes increases markedly when exposed to these pro-inflammatory cytokines (9). Previous studies demonstrated that both tissue and fluid synovial fibroblasts secrete metalloproteinases, which it is most likely to be important in the process of cartilage degradation (7, 10). They found consistent secretion of MMP-1 and MMP-3 in all synovial fibroblast cultures with greater increased levels after cytokine stimulation (8). MMP-3 levels are found increased in OA synovial fluids (7) and the significant concentrations of MMP-3 released at baseline and after stimulation in our study and theirs indicate a synovia inflammation as a source of this protease (7). In contrast to our study, some differences were found in production of MMP-1 and -3 after stimulation with IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , but with no difference at MMP-3 baseline levels (7). Although we observed a difference of MMP-1 production after stimulation

with IL-1 $\beta$ , we still believe these cells are similar, due the Spearman correlation and Bland Altman analysis have shown similarity. Other studies with fluid and tissue-derived FLS from rheumatoid arthritis patients showed similar production of MMP-1 and -3 after IL-1 $\beta$  stimulation (10), however they did not utilised cells from the same patient. For comparison, we believe to be important methodologically to use cells from tissue and fluid-derived FLS from the same patient as in our study.

Local levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-6 produced by FLS are detectable in OA (11, 12). The production of IL-6 in the tissues of the inflamed joint is usually in response to IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  and is mainly released by FLS and macrophages (13, 14). In accordance to our data, one study reported that levels of IL-6 expression are identical for TD-FLS and FD-FLS from different patients with rheumatoid arthritis when stimulated by TNF- $\alpha$  (15).

### Conclusion

Considering our findings, FD-FLS and TD-FLS produce MMPs and IL-6



at baseline and after stimulation, that MMPs have the potential to degrade cartilage matrix components which provides strong evidence for a major impact of synovial MMPs in the pathophysiology of OA. The expression pattern of MMP-1, -3 and IL-6 in FD-FLS seems to be equivalent to that of TD-FLS and may replace tissue-derived synovial cells as a source to perform *in vitro* studies and test potential new pharmacological molecules for primary osteoarthritis.

## References

1. GREENE MA, LOESER RF: Aging-related inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2015; 23: 1966-71.
2. KAPOOR M, MARTEL-PELLETIER J, LAJEUNESSE D, PELLETIER JP, FAHMI H: Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7: 33-42.
3. ALAAEDDINE N, DIBATTISTA JA, PELLETIER JP *et al.*: Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha. *J Rheumatol* 1997; 24: 1985-94.
4. PELLETIER JP, MCCOLLUM R, CLOUTIER JM, MARTEL-PELLETIER J: Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43: 109-14.
5. VAN DE VAN DEN VAN DEN arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 164-72.
6. ALTMAN R, ASCH E, BLOCH D *et al.*: Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1039-49.
7. FUCHS S, SKWARA A, BLOCH M, DANKBAR B: Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 409-18.
8. MARTEL-PELLETIER J, PELLETIER JP: New insights into the major pathophysiological processes responsible for the development of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34 (Suppl. 2): 6-8.
9. HUBER LC, DISTLER O, TARNER I, GAY RE, GAY S, PAPT: Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (Oxford) 2006; 45: 669-75.
10. AHN JK, KIM H, LEE J, BAE EK, CHA HS, KOH EM: Phenotypic characterization and invasive properties of synovial fluid-derived adherent cells in rheumatoid arthritis. *Inflammation* 2008; 31: 365-71.
11. SMITH MD, TRIANTAFILLOU S, PARKER A, YOUSSEF PP, COLEMAN M: Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis. *J Rheumatol* 1997; 24: 365-71.
12. VIGNON E, BALBLANC JC, MATHIEU P, LOUISOT P, RICHARD M: Metalloprotease activity, phospholipase A2 activity and cytokine concentration in osteoarthritis synovial fluids. *Osteoarthritis Cartilage* 1993; 1: 115-20.
13. BONDESON J, WAINWRIGHT SD, LAUDER S, AMOS N, HUGHES CE: The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006; 8: R187.
14. DISTEL E, CADOU DAL T, DURANT S, POIGNARD A, CHEVALIER X, BENELLI C: The infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis: an important source of interleukin-6 and its soluble receptor. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 3374-7.
15. STEBULIS JA, ROSSETTI RG, ATEZ FJ, ZURIER RB: Fibroblast-like synovial cells derived from synovial fluid. *J Rheumatol* 2005; 32: 301-6.

## 8. ARTIGO A SER SUBMETIDO

### **Comparative morphofunctional analysis of fibroblast-like synoviocytes from human rheumatoid arthritis and mice collagen-induced arthritis**

Camilla Ribeiro Lima Machado <sup>1</sup>, Adriana Maria Kakehasi <sup>2</sup>, Felipe Ferraz Dias <sup>3</sup>, Gustavo Gomes Resende <sup>4</sup>, Patrícia Gnieslaw de Oliveira <sup>5</sup>, Ricardo Machado Xavier <sup>6</sup>, Marcus Vinicius Melo de Andrade <sup>1</sup>

#### Affiliations:

1. Laboratory of Scientific Research - Professor Lineu Freire-Maia, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais.
2. Post Graduate Program in Sciences Applied to Adult Health Care, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil
3. Laboratory of Scientific Research, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais.
4. Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
5. Assistant Project Scientist at Medicine Department, University of California of San Diego.
6. Internal Medicine Department, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Funding: this study received support from: Fundo de Apoio à Pesquisa e Ensino - Sociedade Brasileira de Reumatologia (FAPE-SBR), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq).

Competing interests: none declared.

Address correspondence to: Marcus Vinicius Melo de Andrade

190 Alfredo Balena Ave. room 290, Belo Horizonte, Minas Gerais, 30130-100.

E-mail: andrademufmg@gmail.com

## ABSTRACT

**Objective.** The objective of the study was to compare ultrastructural characteristics, IL-6 and MMP-3 production and the activation of intracellular pathways in FLS cultures obtained from patients with RA and from mice with collagen-induced arthritis.

**Methods.** FLS were obtained from RA patients (RA-FLS) (n=8) and mice with collagen-induced arthritis (CIA-FLS) (n=4). Morphology was demonstrated by transmission and scanning electron microscopy. IL-6 and MMP-3 production were assayed by ELISA and activation of intracellular signaling pathways (NF- $\kappa$ B and MAPK: p-ERK1/2, p-P38 and p-JNK) by Western blotting in cultures of RA-FLS and CIA-FLS stimulated with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

**Results.** RA-FLS and CIA-FLS culture exhibited a rich cytoplasm, rough endoplasmic reticulum and prominent and well-developed Golgi complex. Transmission electron microscopy demonstrated the presence of lamellar bodies, cytoplasmic structures related to the surfactant production, in FLS of both sources. Higher number of pinocytosis and pinocytotic vesicles were observed in RA-FLS (p <0.05). Basal production of MMP-3 and IL-6 was present in RA-FLS and CIA-FLS. Regarding the production of MMP-3 and IL-6 and activation of signaling pathways, the present study demonstrated a lower response to IL-1 $\beta$  by CIA-FLS compared to RA-FLS.

**Conclusion.** There are differences between RA-FLS and CIA-FLS in their ultrastructural morphology and functional responses. The differences found in our study indicate that the adoption of a RA-FLS human model is a better alternative than to the CIA-FLS animal model for *in vitro* studies of RA etiopathogenesis and new therapeutic targets.

**Keywords:** fibroblast-like synoviocytes; rheumatoid arthritis; collagen-induced arthritis; lamellar corpuscles; signaling transduction, interleukin-6, metalloproteinases, electronic microscopy

## INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is the most common inflammatory rheumatic disease. Destructive damage of the joints, resulting in physical disability, is the final result of bone and cartilage damage mediated by production of chemokines and matrix components by synoviocytes (1). The etiopathogenesis of RA involves an intricate network of cellular interactions in the synovial

membrane characterized by the proliferation of cells in the synovial lining, resulting in hyperplasia, pannus formation, and tissue destruction (1, 2).

Fibroblast-like synoviocyte (FLS) is a mesenchymal derived cell responsible for providing support, nourishment and lubrication to the joint tissue. It is one of the most prominent cells in inflamed tissue from RA (2). In the chronic inflammatory milieu of rheumatoid synovium, these cells become autonomous, hyperplastic, invasive, and produce large amounts of proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix-degrading enzymes (2). Among these products, the metalloproteinases (MMPs) are of fundamental importance in the pathophysiology of RA by promoting bone and cartilage degradation (3, 4). Stromelysin (MMP-3) is one of the most important in RA (5, 6). In addition, FLS produces interleukin 6 (IL-6), an important cytokine in the inflammatory cascade, leading to the interaction of FLS and other immune cells in the synovium and aggravating the inflammatory processes (7-10). Previous studies in FLS from patients with RA indicate that both IL-6 and MMPs production increases after IL-1 and TNF- $\alpha$  stimulation and are dependent on NF- $\kappa$ B and MAPK pathways (ERK, JNK and p38), all contributing to the pathogenesis of RA (11-16).

Animal models have contributed to a better understanding of human disease and provide a useful tool for therapeutic testing. However, discrepant results from animal and human studies are worrisome, and efforts to evaluate morphological and functional similarities between animal and human cells are required. One of the most commonly used experimental models to study RA is the mice collagen-induced arthritis (CIA). This animal model is characterized by peripheral symmetrical joint involvement that shares many histopathological features with human RA, including synovitis, pannus formation, cartilage and bone erosion (17, 18). Furthermore, as in patients with RA, IL-6 and MMP-3 also play a key role in this model (19-21). Despite that, we could only find one study showing the effect of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in FLS of CIA have been published (20).

FLS primary cell cultures from CIA and RA patients have been used as an *in vitro* exchange model to study the responses of these cells to different stimulus and pharmacological drugs. There are no studies that have compared the morphological ultrastructure and the responses in FLS culture derived from patients with RA (RA-FLS) and mice with CIA (CIA-FLS). Our objective was to compare RA-FLS with CIA-FLS cultures regarding their ultrastructural characteristics as well as their functional responses, such as the signaling pathways activated and the production of IL-6 and MMP-3 after stimulation human and mice FLS with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

## **METHODS**

### ***Sample collection and cell culture of RA patient***

Synovial fluid was obtained from eight (n=8) RA patients according to the American College of Rheumatology (ACR) criteria (22). The mean age of patients was 52,62 years (range 37-66 years). Samples of synovial fluid were collected and centrifuged at 1200 revolutions per minute (rpm) for 10 minutes, the pellet was seeded into complete medium cell culture flasks (DMEM high glucose plus 10% fetal bovine serum [FBS, Gibco, Life Technologies, USA], 1% streptomycin(S)/penicillin(P) and amphotericin B [Gibco, Life Technologies, USA] and 1% nonessential amino acids [Gibco, Life Technologies, USA]), and kept at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in culture medium exchanged every three days until freezing. FLS were used for experiments after five passages.

The ethics committee approved the protocol (CAAE Human Research Ethics Committee: 08387918.6.0000.5149). Informed consent was obtained from all participants on the study.

### ***Sample collection and cell culture of mice collagen-induced arthritis***

Four (n=4) male DBA1/J mice (8-12 weeks, average weight of 20 grams) were used to obtain CIA-FLS. The animals were immunized with 50 µL of emulsion containing an equal volume of type II bovine collagen (Chondrex; Washington, USA) and Freund's complete adjuvant (Merck, Saint Louis, USA) by intradermal injection at a distance of 1.5 cm from the base of the tail on day zero. The booster was made on day 18. After ten days, the animals were sacrificed by cervical dislocation. The synovial tissue was removed from the joint and processed with 1 mg/ml of collagenase solution I (Merck, Saint Louis, USA) for one hour. After centrifugation, the pellet was resuspended in complete medium and cultivated in the same way described on for human samples until freezing. FLS were used for experiments after five passages.

All procedures using mice were in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Animals. The Animal Use Ethics Committee (Protocol 293/2018) approved the animal study.

### ***Immunophenotyping***

RA-FLS and CIA-FLS were plated at  $2 \times 10^5$  cells/well in 20µl/well and diluted in 20µl flow cytometry buffer solution (PBS containing 1% fetal bovine serum and 0.01% azide). For human FLS the monoclonal antibodies, anti-human CD14 PerCP-Cyanine 5.5 (ref. 45-0149, eBioscience), anti-human CD45 V450 (ref. 560368, BD Biosciences), anti-human CD90 PhicoEritrine (PE) (ref. 561970, BD Biosciences), V450, PE and PerCP-labeled isotype control

antibodies were used (all from BD Biosciences) and unlabeled control cells were included in all experiments. For mice FLS it was used monoclonal antibodies anti-mouse CD45 V450 (ref. 19264, BD Biosciences), anti-rat CD90.1 PE (ref. 554898, BD Biosciences), V450 and PE labeled isotype control antibodies (all BD Biosciences) and unlabeled cells were used. Cells were labeled with antibodies for 20 min at 4°C in the dark, washed, resuspended with 1X PBS and analyzed on the FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences). A minimum of 100,000 events were used for each sample and acquisition was processed using Diva software (BD Biosciences). Flowjo software (Tree Star) was used for analyzing the samples.

### ***Electron microscopy***

Morphological analysis was performed by scanning electron microscope (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). For SEM, RA-FLS and CIA-FLS were cultivated without stimulation on poly-L-lysine treated coverslips. After cell fixation, media was aspirated and the cells were washed with 1X saline phosphate buffer (SPB). The cultures were then immersed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer. After 120 minutes, the fixation solution was aspirated and replaced by 0.1 M cacodylate buffer. The samples were washed in aldehyde with three passes 10 minutes each in 0.05 M cacodylate buffer and immersed in 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) solution in 0.05 M cacodylate buffer for one hour at room temperature. The samples were washed in distilled water and dehydrated with increasing concentrated solutions of alcohol (30, 50, 70, 90 and 100%) and acetone remaining for 10 minutes each. Dehydrated samples were dried until acetone was completely removed. The samples were visualized by SEM (FEG - Quanta 200 FEI). Cell format, emission of cytoplasmic projections, filopodium and lamellipodia presence were analyzed in 20 RA-FLS cells and 20 CIA-FLS cells.

For TEM analysis of unstimulated RA-FLS and CIA-FLS, the preparation included aspiration of DMEM culture medium followed by washing with SPB. The cultures were then fixed for 120 minutes with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer at 4°C. The fixed samples were scraped off with a spatula and transferred to sterile 50 ml tubes and centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes. The pellets were fixed in 2% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil) in 0.1M cacodylate buffer for 2h at room temperature. After washing three times with distilled water for 15 minutes each, the samples were blown in contrast with 2% uranyl acetate (EMS) for 24h at room temperature at dark. They were then washed with distilled water as described above and dehydrated in increasing series of alcohol (35°, 50°, 70°, 85°, 95°, 100°) and acetone for 20 minutes each. After dehydration, infiltration was followed by a 1:2, 1:1 and

1:2 mixture of acetone-Epon resin (EMBed Resin 812, EMS) and pure resin for 3 hours. Subsequently, cells were included in the same resin into BEEM® capsules (Ted Pella, Redding, CA, USA) and polymerized at 60 °C for 48 h. After polymerization of the resin, 300 nm semifine sections were obtained from the surface of the blocks with the aid of glass razors and stained with toluidine-sodium borate blue. Ultra-thin sections (~ 60 nm) were obtained on a Leica EM UC6 ultramicrotome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) using a diamond razor. The sections were mounted on 200 mesh copper (Ted Pella), lead citrate stained (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 5 minutes and analyzed under a transmission electron microscope (Tecnai G2-12 Spirit Biotwin Thermo Fischer Scientific / FEI 2006, Eindhoven, the Netherlands) at 120 kV. Cells were visualized by MET (Tecnai G2-12 Spirit Biotwin FEI - 120 kV). For investigation of morphological characteristics of synoviocytes, images of 20 cells per group revealing the entire cellular profile, including the nucleus, and subcellular details were obtained at 4200-fold, 16500-fold and 20500-fold magnifications. The basic ultrastructural analyzes focused on organelles involved with the classical cell synthesis and secretion pathway: nucleus (N), rough endoplasmic reticulum (RER), Golgi apparatus (GA) and mitochondria (MT). The morphometric analyzes were concentrated in organelles involved with the process of cellular pinocytosis (pinocytosis (P) and pinocytic vesicles (PV)), lamellar bodies (LB) and MT. The morphometry was based on the relative quantity of each organelle per number of cells.

### ***Stimuli and Dosages***

RA-FLS and CIA-FLS were plated in 24-well plates ( $1,5 \times 10^5$  cells/well) immersed in DMEM medium with 1% P/S/amphotericin B and 1% FBS for 24 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The cells were then stimulated for 24 hours with 50 ng/ml TNF- $\alpha$  (Peprotech, ref.: human 300-01A e murine 315-01A) and 1 ng/ml IL-1 $\beta$  (Peprotech, ref.: human 200-01B e murine 211-11B). A dose-response curve was obtained to determine the appropriate stimulus (TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) concentration (data not shown).

After the stimulus, the supernatant was used to detect the production of IL-6 and MMP-3 by ELISA (human MMP-3 DuoSet® – R&D systems ref.: DY513; Mouse Total MMP-3 DuoSet ELISA ref.: DY548; human IL-6 DuoSet® – R&D systems ref.: DY206; Mouse IL-6 DuoSet ELISA DY406) following the manufacturer's protocols. For analysis of signaling pathways, both cells were transferred to six-well plates ( $1 \times 10^6$  cells/well) and stimulated with 50 ng/ml of TNF- $\alpha$  and 1 ng/ml of IL-1 $\beta$  for 30 minutes, after the stimulus the cells were lysate. The cell lysate buffer was prepared with 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 5

mM Sodium pyrophosphate, 1 mM Sodium orthovanadate, 10 mM Sodium fluoride, 10% glycerin, 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride and 1 Protease Inhibitor Cocktail Set I (Calbiochem, San Diego, CA, USA). The following phosphorylated proteins in the cell lysate were tested: ERK1/2 (Cell signaling ref: 9101), p38 (Cell signaling ref: 4511), JNK (Cell signaling ref: 9251), the transcription factor: NF- $\kappa$ B (Cell signaling ref: 3033) and  $\beta$ -actin (Arigo ref: ARG53987).

### ***Statistical analysis***

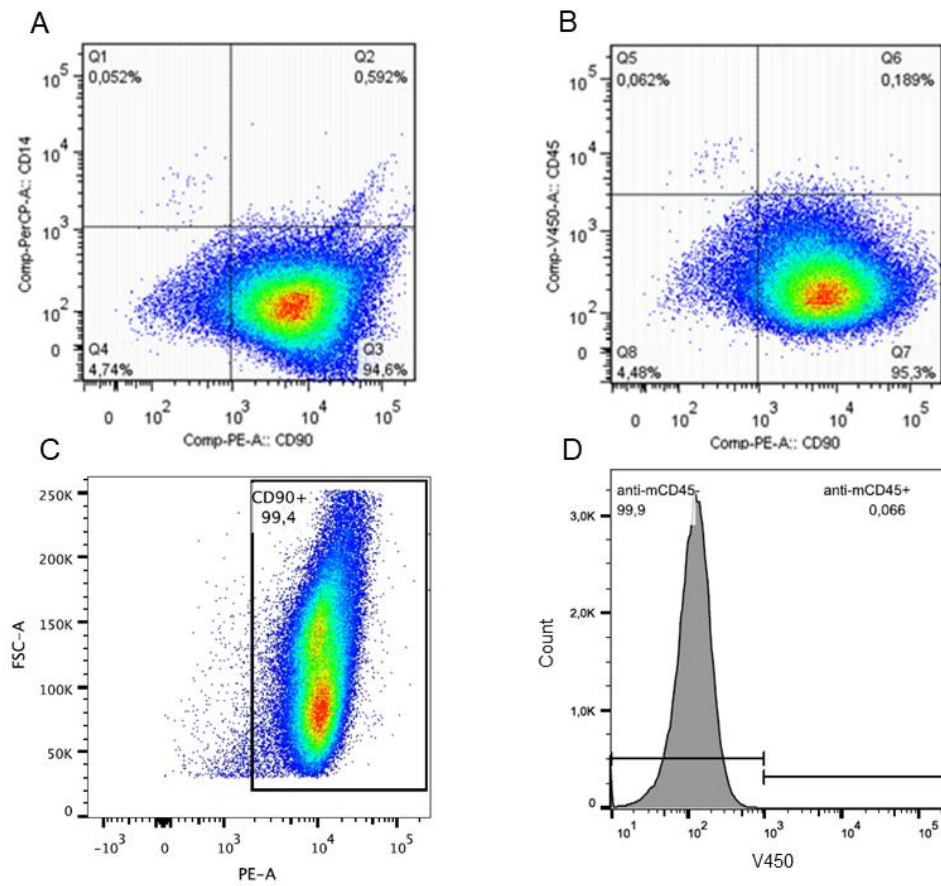
The Mann-Whitney U test non-parametric analysis was used to compare MMP-3 and IL-6 concentrations between the TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  stimuli of each group, and to compare the amounts of pinocytosis, pinocytic vesicles, mitochondria and lamellar bodies between RA-FLS and CIA-FLS. GraphPad Prisma version 6.01 was used for data analysis and graph production. We considered evidence of significant effects with p-values <0.05.

## **RESULTS**

### **Immunophenotyping**

RA-FLS and CIA-FLS were positive for the anti-CD90 marker, expressed in FLS (Figures 1 A and B, and C). The anti-CD45 marker, expressed in leukocyte, and anti-CD14, expressed in monocytes and macrophages, were negative for RA-FLS (Figure 1A and B). For CIA-FLS, controls against leukocyte markers (CD45) also demonstrated a culture of pure FLS (<1% CD45 +) (Figure 1D).





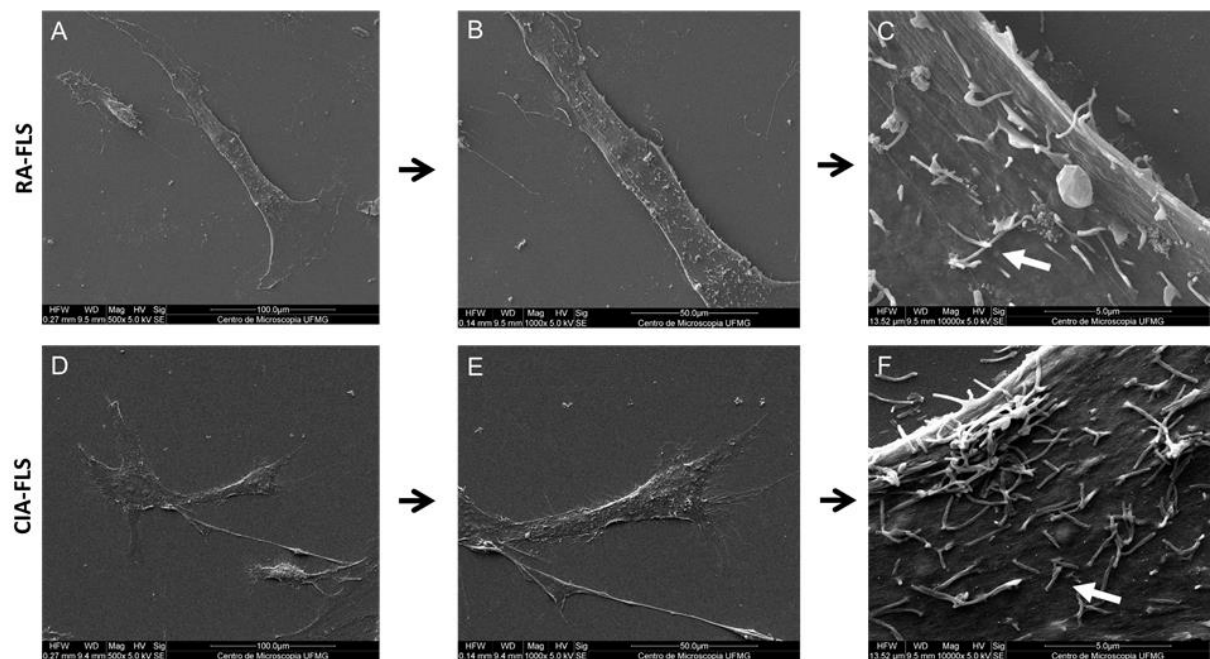
**Figure 1.** Immunophenotyping of fibroblasts-like synoviocytes culture from patients with rheumatoid arthritis and mice with collagen-induced arthritis verified by flow cytometry assays. (A-B) Cell cultures from RA patients were stained with CD90, CD14 and CD45 surface markers. A) (CD90 + CD14-) and B) (CD90 + CD45-); (C-D) Cell cultures from mice with collagen-induced arthritis were stained with CD90 and CD45 surface marker. C) (CD90 +). D) (CD45-).

## Electron microscopy

### *Scanning Electron Microscopy (SEM)*

RA-FLS and CIA-FLS cultures exhibited a population of fusiform FLS and cytoplasmic expansion forming branches. Both cells were anchored to the substrate with numerous cytoplasmic projections at the lamellipodia ends, the protein structure of the actin-composed cytoskeleton protruding at the mobile end of the cell (23). Lamellipodia propels the entire cell structure through the substrate (Figure 2).

The cytoplasmic projections that extend beyond the lamellipodia border on migrating cells, were often seen anchored in neighboring cells (Figure 2).



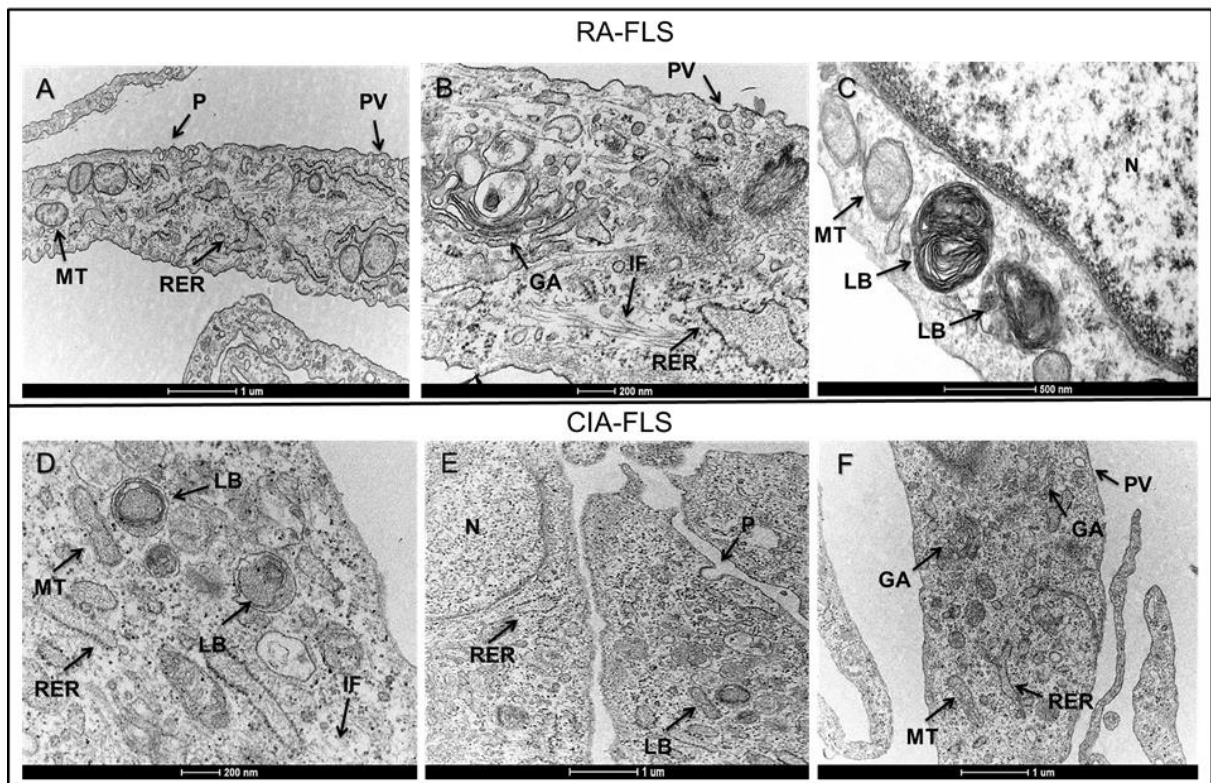
**Figure 2.** Fibroblasts-like synoviocytes Scanning Electron Microscope. (A-C) Fibroblasts-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis showing the image of cytoplasmic extension and the presence of filopodium (white arrow); (D-F) Fibroblasts-like synoviocytes of mice with collagen-induced arthritis with the presence of filopodium (white arrow).

### ***Transmission Electron Microscopy (TEM)***

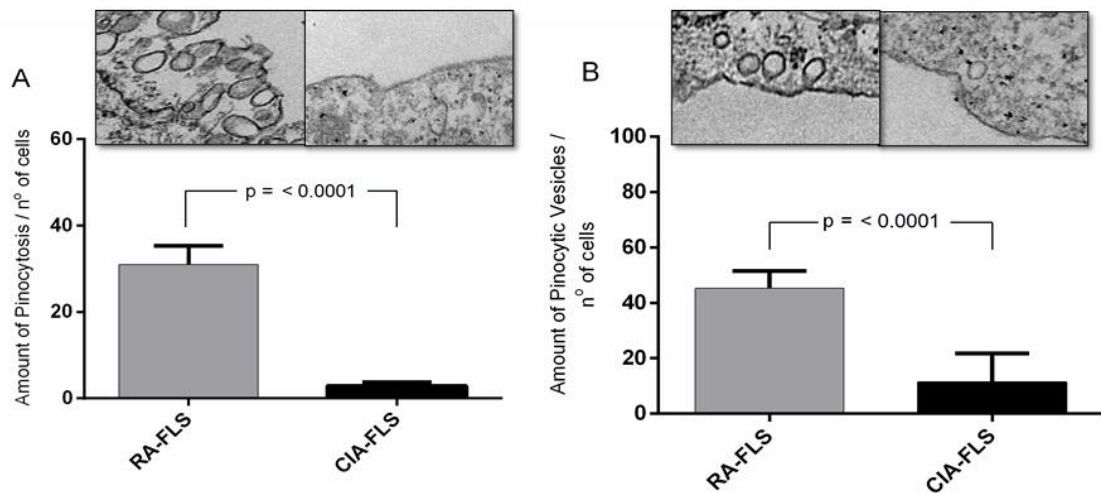
Evaluation of RA-FLS and CIA-FLS by TEM revealed subcellular characteristics of intense cellular activity, represented by large and euchromatic nucleus with thin layer of heterochromatin, prominent and well-developed rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and presence of several mitochondria close to these organelles (Figure 3). In figure 4 we could observe a high concentration of intermediate filaments have been identified, which are filamentous protein structures that make up the cytoskeleton of cells and assist in cell morphology. Ultrastructural difference was observed between RA-FLS and CIA-FLS in the number of pinocytosis (plasma membrane invaginations) and pinocytotic vesicles, related to the process of cellular pinocytosis. Both structures were more frequently seen in RA-FLS ( $p < 0.05$ ) (Figure 4). No statistical difference was observed in the number of mitochondria.

The lamellar bodies were found in RA-FLS and CIA-FLS cultures (Figure 3). Lamellar bodies consist of cavitory structures with circular walls in unique juxtaposition to FLS in the synovial environment, they are secreted by exocytosis in the synovial fluid, and secrete hyaluronic acid

and surfactant (proteins and lipids) (24). They were identified at various stages of maturation in the same cell (Figure 3C). No statistical difference was observed in the number of lamellar bodies between RA-FLS and CIA-FLS (data not shown). Adjacent FLS were observed in close contact through their cytoplasmic projections, corresponding to the electron-dense regions at the communicating/adherent junction sites.



**Figure 3.** Electron microscopic analysis of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis (A-C) and mice with collagen-induced arthritis (D-F). A. Cytoplasm with extensive rough endoplasmic reticulum and pinocytotic vesicle in the cell membrane, presence of pinocytosis, all indicating high cellular activity; B. Golgi apparatus and extensive rough endoplasmic reticulum, pinocytotic vesicles and intermediate filaments in abundance; C. Lamellar bodies, euchromatic nucleus and mitochondria; D. Abundant cytoplasm with mitochondria, rough endoplasmic reticulum, intermediate filaments, and lamellar bodies showing typical concentric walls; E. Euchromatic nucleus, extensive rough endoplasmic reticulum, presence of pinocytosis and lamellar bodies; F. Abundant cytoplasm with mitochondria, rough endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lamellar bodies, pinocytotic vesicles identifying a cell with high activity. LB = lamellar bodies; MT = mitochondria; RER = rough endoplasmic reticulum; P = pinocytosis; N = nucleus; FI = intermediate filament; GA = Golgi apparatus; PV = pinocytic vesicle

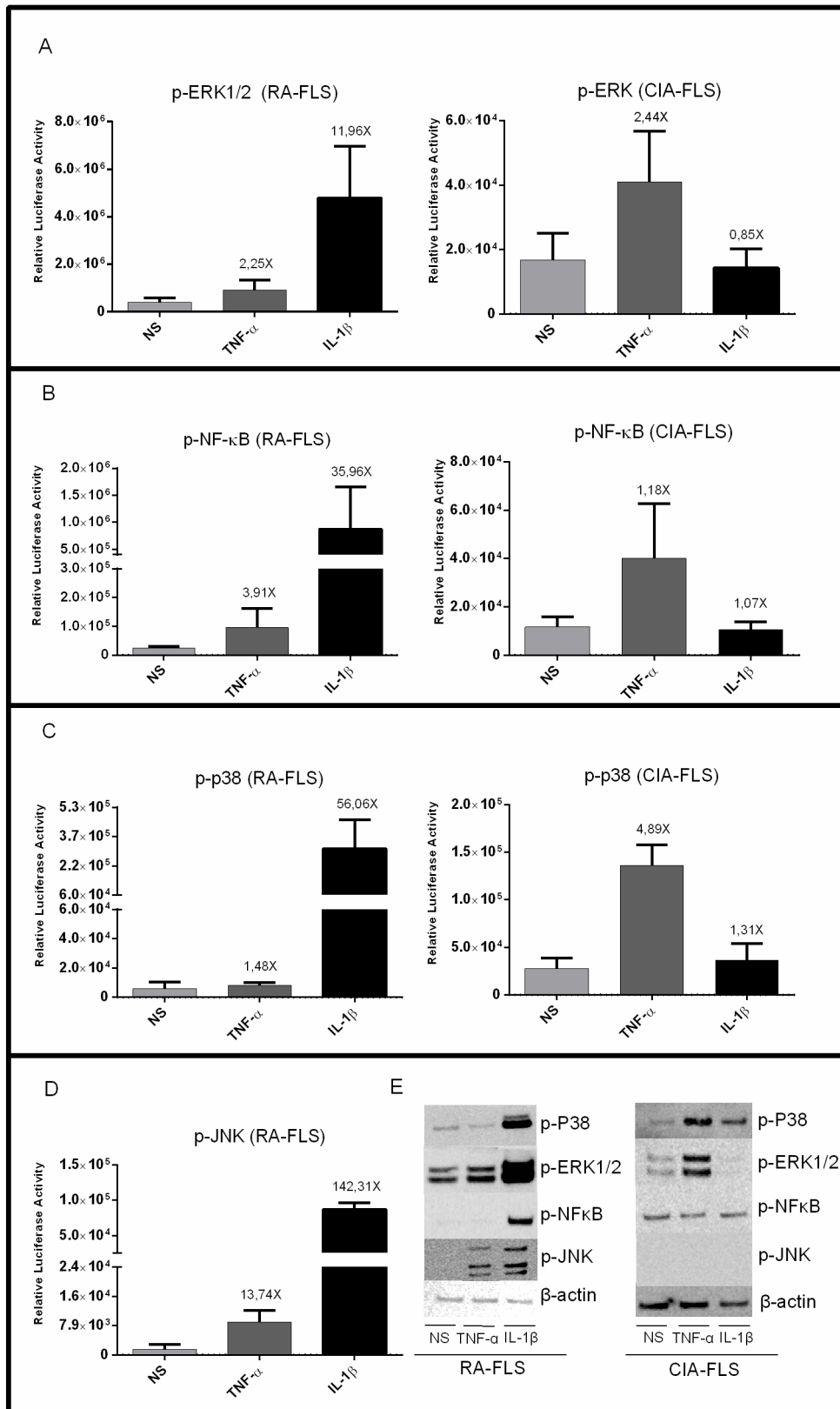


**Figure 4.** Ultrastructural differences involved with the cellular pinocytosis process of fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis (RA-FLS) and mice with collagen-induced arthritis (CIA-FLS). A. Larger number of pinocytosis in RA-FLS than CIA-FLS. B. Higher amount of pinocytotic vesicles in RA-FLS than CIA-FLS.  $P < 0.05$  was taken as statistically significant.

### Functional analysis

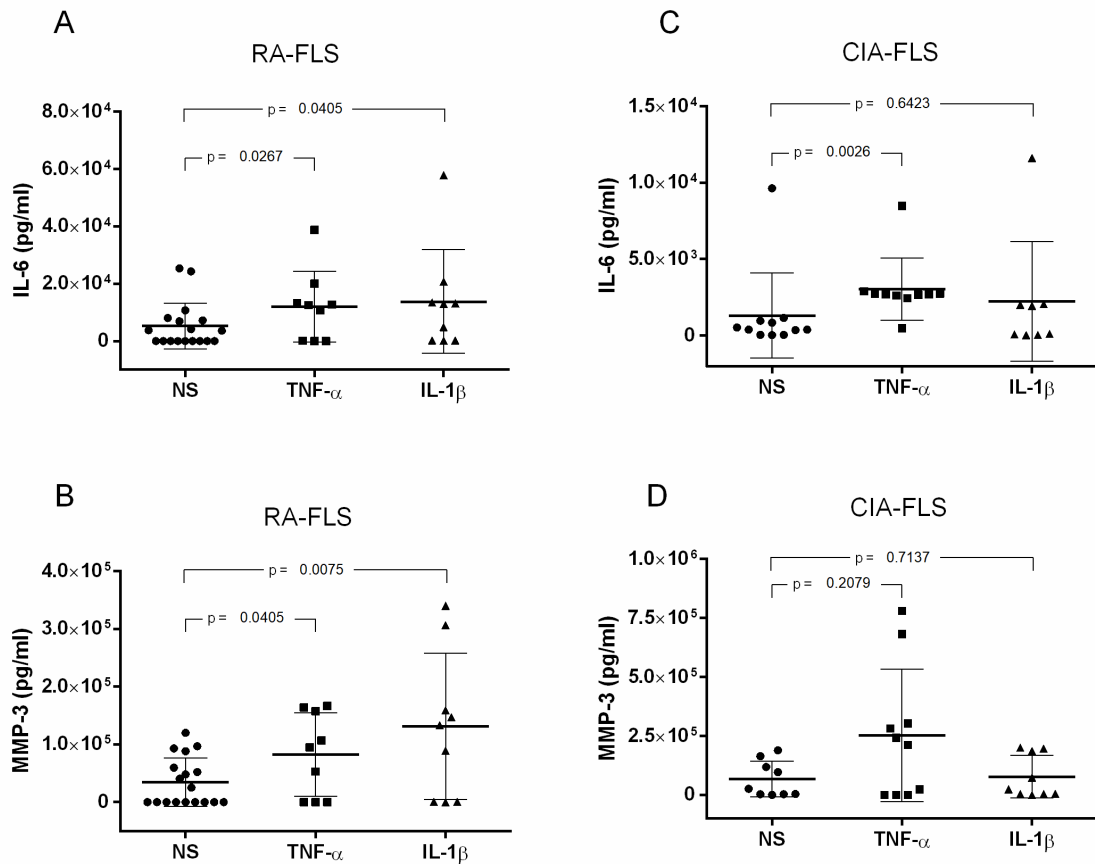
Figure 5 shows the signaling activation of MAPK and p-NF- $\kappa$ B by RA-FLS and CIA-FLS after stimulation with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . In RA-FLS and CIA-FLS, TNF- $\alpha$  activated p-ERK1/2 (2,25 times and 2,44 times, respectively), p-NF- $\kappa$ B (3,91 times and 1,18 times, respectively) and p-P38 (1,48 times and 4,89 times, respectively), and only in RA-FLS, TNF- $\alpha$  activated p-JNK (13,74 times). On the other side, IL-1 $\beta$  activated p-P38 in RA-FLS and CIA-FLS (56,06 times and 1.31 times, respectively) and p-NF $\kappa$ B (35,96 times and 1,07 times, respectively), also only activated p-ERK1/2 and p-JNK in RA-FLS (11,96 times and 142.31 times, respectively) (Figure 5).

Similarly, with regard to production of MMP-3 and IL-6 (Figure 6), both were constitutively expressed by RA-FLS and CIA-FLS even when unstimulated. In RA-FLS, an increase in IL-6 and MMP-3 production was observed after stimuli with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , all with statistical significance ( $p=0.0267$ ;  $p=0.0405$ ;  $p=0.0405$  and  $p=0.0075$ , respectively) (Figure 6A and 6B)). But in CIA-FLS, there was an increase in IL-6 production only after TNF- $\alpha$  stimulation ( $p = 0.0026$ ). No difference in MMP-3 production after TNF- $\alpha$  stimulation, neither IL-6 or MMP-3 after IL-1 $\beta$  stimulation (Figures 6C and 6D) was detected.



**Figure 5.** Activation of MAP kinase (p-ERK1/2, p-P38 and p-JNK) and transcription factor NF- $\kappa$ B. Fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis (RA-FLS) and mice with collagen-induced arthritis (CIA-FLS) were stimulated for 30 minutes with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . A. Activation of p-ERK1/2 in RA-FLS and CIA-FLS. B. Activation of p-NF- $\kappa$ B in RA-FLS and CIA-FLS. C. Activation of p-p38 in RA-FLS and CIA-FLS. D.

Activation of p-JNK in RA-FLS. E. Representative figure. NS = unstimulated, TNF-alpha = tumor necrosis factor alpha, IL-1beta = interleukin 1 beta.



**Figure 6.** Production of MMP-3 and IL-6 by TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  stimulated. Fibroblasts-like synoviocytes in culture obtained from patients with rheumatoid arthritis (A and B) (n=4) and from mice with collagen-induced arthritis (CIA-FLS) (C and D) (n=4).  $P < 0.05$  was taken as statistically significant. NS= non stimulated, TNF=tumor necrosis factor alpha, IL-1= interleukin 1 beta, IL-6= interleukin 6, MMP-3= metalloproteinase 3.

## DISCUSSION

Many *in vitro* studies use cell culture from experimental models to study the etiopathogenesis of RA (25). FLS from experimental models are frequently used in search of therapeutic targets and to study the effects of new drugs, and it is well established that FLS plays an important role in cartilage and bone destruction in the joints of patients with RA (2). Previous studies have shown that histopathological and pathological characteristics between inflamed tissues of mice with CIA and patients with RA are similar (26). However, the present study showed differences in the profile of production of important mediators of inflammation in RA, and its signaling pathways activated between human and mice derived FLS cells *in vitro*, that may be explained by their ultrastructural differences.

In accordance with our data, an up-regulation of IL-6 and MMP-3 after *in vitro* stimulation with TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in RA-FLS has been previously demonstrated (20, 27-29). This stimulation was mediated by activation of MAPK pathways (ERK, p38 and JNK) as well as NF-kB transcription factor, as well supported by other studies (5, 14, 15, 29-37). Unlike RA-FLS, we observed in CIA-FLS, after IL-1 $\beta$  stimulation, a lack of activation of MAPK pathways and NF-kB and, consequently, the absence of increase in production of IL-6 and MMP-3. Although this cytokine is present on the inflamed synovia in CIA (38, 39), few studies demonstrated an expression of IL-1 $\beta$  receptor (IL1r1) in CIA-FLS (37). The low expression of IL-1 $\beta$  receptor in CIA-FLS could explain the lack of activation of downstream signaling pathways and induce the increase of MMP-3 and IL-6 production (40). Nevertheless, it has been observed IL-6 production after IL-1 $\beta$  stimulus in CIA-FLS (40), but they did not analyze the activation of the signaling pathways as reported in our work. Our results suggest that the low activation and non-activation of signaling pathways (p-ERK, p-p38, p-JNK and NF-kB transcription factor) is consistent with the lack of incremented production of MMP-3 and IL-6 (41).

Furthermore, TNF- $\alpha$  plays a major role in the pathogenesis of RA as well as in CIA (2, 39, 42, 43). Both groups of cells respond to TNF- $\alpha$  stimulation with activation of p-ERK, p-p38 and p-NF-kB signaling pathways, these activations mediate an increase of IL-6 production, but only p-JNK that did not show phosphorylation in CIA-FLS. Despite studies showing the activation of this pathway in CIA-FLS (38), we demonstrate that MMP-3 production was insignificant and this is consistent with the non-activation p-JNK (33, 36). Possibly, MMP-3 does not play as important a role in CIA as it does in RA patients (6, 44, 45).

In addition to differences in stimulus responses between RA-FLS and CIA-FLS, we found important morphological differences between them. Our data demonstrate for the first time a larger number of pinocytosis and pinocytotic vesicles in human cells than in mouse cells. Pinocytosis, a type of endocytosis, plays a critical role in cell transport, endocytosis, signal transduction, and cell proliferation (46-48). In the moment that the endocytosis occurs, the cell membrane extends and folds around the extracellular material, forming a pocket, and then creating the pinocytic vesicles that are absorbed (49, 50). So, these morphological differences could indicate a higher cellular functional activity in RA-FLS.

Despite these differences, it was also observed many similarities between RA-FLS and CIA-FLS morphology, the presence of lamellar bodies, fusiform shape, presence of lamellipodia, large euchromatic nucleus, prominent and well-developed rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and presence of several mitochondria nearby to these organelles (24).

Experimental models play an important role in studying the mechanism of the disease and seeking a possible treatment. But despite all the benefits they bring to science, the models must be interpreted with care since they do not completely resemble human disease. Our results, despite demonstrating significant differences *in vitro* between FLS human and FLS model, do not diminish the relevance of experimental models in studies.

In conclusion, our results show differences between *in vitro* RA-FLS and CIA-FLS in their ultrastructural morphology and functional responses, regarding inflammatory cytokines involved in the pathophysiology of RA. The differences found in our study suggest a possible limitation of the adoption of CIA-FLS for *in vitro* studies related to etiopathogenesis and new therapeutic targets in RA.

## REFERENCES

1. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*. 2011;365(23):2205-19.
2. Tu J, Hong W, Zhang P, Wang X, Korner H, Wei W. Ontology and Function of Fibroblast-Like and Macrophage-Like Synoviocytes: How Do They Talk to Each Other and Can They Be Targeted for Rheumatoid Arthritis Therapy? *Frontiers in immunology*. 2018;9:1467.
3. Croft AP, Naylor AJ, Marshall JL, Hardie DL, Zimmermann B, Turner J, et al. Rheumatoid synovial fibroblasts differentiate into distinct subsets in the presence of cytokines and cartilage. *Arthritis research & therapy*. 2016;18(1):270.
4. Ekwall AK, Eisler T, Anderberg C, Jin C, Karlsson N, Brisslert M, Bokarewa MI. The tumour-associated glycoprotein podoplanin is expressed in fibroblast-like synoviocytes of the hyperplastic synovial lining layer in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(2):R40.
5. Hammaker DR, Boyle DL, Chabaud-Riou M, Firestein GS. Regulation of c-Jun N-terminal kinase by MEKK-2 and mitogen-activated protein kinase kinases in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology*. 2004;172(3):1612-8.
6. Sugiyama E. Role of matrix metalloproteinase-3 in joint destruction in rheumatoid arthritis. *Clinical calcium*. 2007;17(4):528-34.
7. Jiao Z, Wang W, Ma J, Wang S, Su Z, Xu H. Notch signaling mediates TNF-alpha-induced IL-6 production in cultured fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis. *Clinical & developmental immunology*. 2012;2012:350209.



8. Migita K, Iwanaga N, Izumi Y, Kawahara C, Kumagai K, Nakamura T, et al. TNF-alpha-induced miR-155 regulates IL-6 signaling in rheumatoid synovial fibroblasts. *BMC research notes*. 2017;10(1):403.
9. Mor A, Abramson SB, Pillinger MH. The fibroblast-like synovial cell in rheumatoid arthritis: a key player in inflammation and joint destruction. *Clinical immunology*. 2005;115(2):118-28.
10. Tran CN, Lundy SK, White PT, Endres JL, Motyl CD, Gupta R, et al. Molecular interactions between T cells and fibroblast-like synoviocytes: role of membrane tumor necrosis factor-alpha on cytokine-activated T cells. *The American journal of pathology*. 2007;171(5):1588-98.
11. Bucala R, Ritchlin C, Winchester R, Cerami A. Constitutive production of inflammatory and mitogenic cytokines by rheumatoid synovial fibroblasts. *The Journal of experimental medicine*. 1991;173(3):569-74.
12. Neumann E, Lefevre S, Zimmermann B, Gay S, Muller-Ladner U. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(10):458-68.
13. Perlman H, Bradley K, Liu H, Cole S, Shamiyeh E, Smith RC, et al. IL-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts. *Journal of immunology*. 2003;170(2):838-45. doi: 10.4049/jimmunol.170.2.838.
14. Sweeney SE, Firestein GS. Mitogen activated protein kinase inhibitors: where are we now and where are we going? *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65 Suppl 3:iii83-8.
15. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology*. 2008;47(4):409-14.
16. Rosengren S, Corr M, Boyle DL. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta synergistically potentiate inflammatory mediator synthesis by fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(2):R65.
17. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*. 1980;283(5748):666-8.
18. Holmdahl R, Andersson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K, Jansson L, Mo JA. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunological reviews*. 1990;118:193-232. PubMed PMID: 2079326.
19. Inoue T, Kohno M, Nagahara H, Murakami K, Sagawa T, Kasahara A, et al. Upregulation of sphingosine-1-phosphate receptor 3 on fibroblast-like synoviocytes is associated with the

- development of collagen-induced arthritis via increased interleukin-6 production. *PloS one*. 2019;14(6):e0218090.
20. Lee A, Choi SJ, Park K, Park JW, Kim K, Choi K, et al. Detection of active matrix metalloproteinase-3 in serum and fibroblast-like synoviocytes of collagen-induced arthritis mice. *Bioconjugate chemistry*. 2013;24(6):1068-74. doi: 10.1021/bc4001273.
21. Zhai T, Gao C, Huo R, Sheng H, Sun S, Xie J, et al. Cyr61 participates in the pathogenesis of rheumatoid arthritis via promoting MMP-3 expression by fibroblast-like synoviocytes. *Modern rheumatology*. 2017;27(3):466-75.
22. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(3):315-24.
23. Vuorio E, Takala I, Pulkki K, Einola S. Effects of sodium aurothiomalate on hyaluronic acid synthesis in normal and rheumatoid synovial fibroblast cultures. *Scandinavian journal of rheumatology*. 1979;8(3):173-6.
24. Vandenameele F, De Bari C, Moreels M, Lambrechts I, Dell'Accio F, Lippens PL, et al. Morphological and immunocytochemical characterization of cultured fibroblast-like cells derived from adult human synovial membrane. *Archives of histology and cytology*. 2003;66(2):145-53.
25. Hu Y, Cheng W, Cai W, Yue Y, Li J, Zhang P. Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis. *Clinical rheumatology*. 2013;32(2):161-5.
26. Jia Q, Wang T, Wang X, Xu H, Liu Y, Wang Y, et al. Astragalosin Suppresses Inflammatory Responses and Bone Destruction in Mice With Collagen-Induced Arthritis and in Human Fibroblast-Like Synoviocytes. *Frontiers in pharmacology*. 2019;10:94.
27. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological reviews*. 2010;233(1):233-55.
28. Baumann H, Kushner I. Production of interleukin-6 by synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *The American journal of pathology*. 1998;152(3):641-4.
29. El-Kady IM, El-Masry SA. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines profile in rheumatoid arthritis patients. *The Egyptian journal of immunology*. 2008;15(1):109-14.
30. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nature reviews Rheumatology*. 2013;9(1):24-33.
31. Firestein GS, Manning AM. Signal transduction and transcription factors in rheumatic disease. *Arthritis and rheumatism*. 1999;42(4):609-21.

32. Gortz B, Hayer S, Tuerck B, Zwerina J, Smolen JS, Schett G. Tumour necrosis factor activates the mitogen-activated protein kinases p38alpha and ERK in the synovial membrane in vivo. *Arthritis research & therapy*. 2005;7(5):R1140-7.
33. Han Z, Boyle DL, Chang L, Bennett B, Karin M, Yang L, et al. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(1):73-81.
34. Kaneko M, Tomita T, Nakase T, Ohsawa Y, Seki H, Takeuchi E, et al. Expression of proteinases and inflammatory cytokines in subchondral bone regions in the destructive joint of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2001;40(3):247-55.
35. Lu H, Sun T, Yao L, Zhang Y. Role of protein tyrosine kinase in IL-1 beta induced activation of mitogen-activated protein kinase in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis. *Chinese medical journal*. 2000;113(10):872-6.
36. Simmonds RE, Foxwell BM. Signalling, inflammation and arthritis: NF-kappaB and its relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology*. 2008;47(5):584-90.
37. Van Holten J, Reedquist K, Sattonet-Roche P, Smeets TJ, Plater-Zyberk C, Vervoordeldonk MJ, et al. Treatment with recombinant interferon-beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(3):R239-49.
38. Lee J, Hong EC, Jeong H, Hwang JW, Kim H, Bae EK, et al. A novel histone deacetylase 6-selective inhibitor suppresses synovial inflammation and joint destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *International journal of rheumatic diseases*. 2015;18(5):514-23.
39. Liu Z, Zhou L, Ma X, Sun S, Qiu H, Li H, et al. Inhibitory effects of tubeimoside I on synoviocytes and collagen-induced arthritis in rats. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(11):8740-53.
40. Wang X, Xia S, Fu B. RNAseq analysis of synovial fibroblasts in human rheumatoid arthritis. *Molecular medicine reports*. 2014;10(1):241-7.
41. Shimizu K, Nakajima A, Sudo K, Liu Y, Mizoroki A, Ikarashi T, et al. IL-1 receptor type 2 suppresses collagen-induced arthritis by inhibiting IL-1 signal on macrophages. *Journal of immunology*. 2015;194(7):3156-68.
42. Joosten LA, Helsen MM, van de Loo FA, van den Berg WB. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. A comparative study using anti-TNF alpha, anti-IL-1 alpha/beta, and IL-1Ra. *Arthritis and rheumatism*. 1996;39(5):797-809.

43. Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, et al. A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate. *The New England journal of medicine*. 1999;340(4):253-9.
44. Hammaker D, Sweeney S, Firestein GS. Signal transduction networks in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2003;62 Suppl 2:ii86-9.
45. Woolley DE, Evanson JM. Collagenase and its natural inhibitors in relation to the rheumatoid joint. *Connective tissue research*. 1977;5(1):31-5.
46. Panariti A, Misericocchi G, Rivolta I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnology, science and applications*. 2012;5:87-100.
47. Sinha B, Koster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, et al. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*. 2011;144(3):402-13.
48. Soldati T, Schliwa M. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(12):897-908.
49. Singer, II. Microfilament bundles and the control of pinocytotic vesicle distribution at the surfaces of normal and transformed fibroblasts. *Experimental cell research*. 1979;122(2):251-64.
50. Stillwell W. *An Introduction to Biological Membranes*. 2 edition ed2016. 590 p.

## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho representa um importante passo para o fortalecimento desta linha de pesquisa, ampliando o conhecimento sobre o sinoviócito fibroblasto símile de indivíduos com doenças articulares inflamatórias e de modelo experimental com artrite induzida por colágeno. Nosso grupo demonstrou que FLS derivados de tecido/membrana e líquido sinovial de pacientes com OA são semelhantes, facilitando as coletas de amostras para estudos *in vitro* e auxiliando no descobrimento de novas moléculas farmacológicas. Adicionalmente, embora muitos estudos demonstrem que modelos experimentais de artrite são extremamente úteis para o estudo da fisiopatologia da AR e de novas terapias, nosso estudo observou diferenças ultraestruturais e funcionais importantes entre os FLS humanos e de modelo experimental, demonstrando uma possível limitação da adoção de FLS de camundongos com CIA para estudos *in vitro* relacionados a etiopatogenia e a novos testes de alvos terapêuticos em AR.

A linha de pesquisa continuará, com uma análise morfológica e funcional de FLS derivados de líquido e membrana sinovial de pacientes com OA e FLS de pacientes sem artrite (grupo controle). Iremos explorar ainda os efeitos de inibidores farmacológicos das vias de sinalização das MAPK, JAK/STAT, PI3 quinase e dos fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B, ATF e AP1) em FLS de pacientes com AR, OA e camundongo CIA, a fim de detectar potenciais alvos terapêuticos. Nossa linha de pesquisa visa contribuir com a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos das doenças articulares crônicas para que, no futuro, esses dados possam ser utilizados para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e específicas.

## APÊNDICE

Apêndice - Termo de consentimento livre e esclarecido

### FACULDADE DE MEDICINA

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / 2º andar

Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100

Fone: (031) 3409-9762



UFMG

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG:** Av. Antônio Carlos, 6627 – Unidade Administrativa II – 2º andar – SL 2005 – CEP: 31.270-901 – BH/MG – Tel: (031) 3409-4592 – Fax: (31) 3409-4516 – e-mail: prpq@coep.ufmg.br

### Prezado Paciente,

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa sobre artrite reumatoide. Antes de decidir se quer participar, é importante que o senhor(a) entenda a razão deste estudo, os possíveis benefícios, riscos e desconfortos. Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto. Por favor, faça perguntas se tiver qualquer dúvida. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma, ou seja, todo o seu tratamento continuará da mesma maneira como foi programado. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento.

**TÍTULO DA PESQUISA: ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR ATIVADAS POR IL-33 EM FIBROBLASTOS DE MEMBRANA SINOVIAL DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE.**

**PESQUISADORES:** PROFA. DRA. ADRIANA MARIA KAKEHASI, PROF. DR. MARCUS VINICIUS MELO DE ANDRADE, DOUTORANDA CAMILLA RIBEIRO LIMA MACHADO, PROF. DR. SAULO FERNANDES SATURNINO, DRA. RAFAELA BICALHO VIANA MACEDO, DR. RODOLFO ASSIS LISBOA.

A artrite reumatoide é uma doença crônica do sistema articular, ou seja, acomete as articulações. As manifestações clínicas podem variar de pessoa para pessoa, mas, de modo geral, os pacientes apresentam as juntas inchadas, avermelhadas e doloridas. O diagnóstico é feito pelo conjunto de sintomas que você apresenta e pela interpretação de exames complementares (sangue e imagem) solicitados pelos médicos. Em um grupo de pacientes a doença pode evoluir sem complicações, mas em outros ela pode levar até à deformidade óssea, o que impede os pacientes de exercerem suas atividades diárias, lazer ou trabalho. O tratamento inclui o uso de medicamentos por tempo prolongado e tem por objetivo impedir que ocorram as deformidades nas juntas. Infelizmente, nem todos os pacientes apresentam melhora satisfatória com as medicações disponíveis e, por isso, justificam-se as pesquisas que tentam investigar os mecanismos que levam à artrite reumatoide, com vistas ao desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e com menos efeitos indesejáveis. Como ainda não conhecemos a causa da artrite reumatoide, não dispomos de cura definitiva e, como cada pessoa pode apresentar manifestações diversas da doença, é importante que pesquisas contínuas busquem conhecer melhor os mecanismos da doença, para que disso possa resultar um melhor tratamento para as pessoas com esse reumatismo. Em alguns casos as articulações inflamadas são tratadas com a cirurgia para substituição por prótese, que é um aparelho que pode ficar dentro do seu corpo no lugar da articulação.

Nesta pesquisa para a qual o Sr.(a) está sendo convidado a participar, se você tiver que fazer uma cirurgia por causa da artrite reumatoide para colocar uma prótese no joelho, pé ou quadril, e concordar em participar, um fragmento do tecido que será retirado da articulação doente será coletado para estudos sobre as células e as substâncias que fazem parte do processo inflamatório da doença. Esse fragmento será obtido do tecido que deve ser retirado do seu corpo para a colocação da prótese durante a cirurgia, sendo que, em hipótese alguma, será retirado qualquer fragmento de tecido que não faça parte daquele que já seria retirado no procedimento cirúrgico. Caso o Sr.(a) seja submetido a punção articular, previamente à infusão da medicação anti-inflamatória, realizaremos aspiração do líquido articular inflamado. Esse processo visa ao alívio da dor e em alguns casos à análise em laboratório das características desse aspirado. Solicitamos autorização para que o líquido excedente seja utilizado na pesquisa acima mencionada.

Não está previsto a realização de qualquer exame ou procedimento que não faça parte da avaliação habitual necessária ao cuidado de qualquer pessoa com artrite reumatoide. Em nenhum momento sua identidade será revelada e o material colhido da sua articulação ou os resultados desse estudo não serão utilizados para outros fins que não sejam o desse estudo. Não

existem riscos ou desconfortos para o senhor(a) uma vez que todos os procedimentos serão realizados somente com o fragmento do tecido, já em laboratório de pesquisa.

Os objetivos deste estudo são propiciar o conhecimento sobre o que acontece dentro da célula das articulações inflamadas de pacientes com artrite reumatoide, e os produtos dessas células.

Se concordar em participar pedimos que assine esse papel dizendo que entendeu as explicações e está concordando. Se o Sr.(a) deseja mais esclarecimentos ou se tem qualquer dúvida sobre a pesquisa nós estamos dispostos a responder qualquer pergunta em qualquer momento. As dúvidas podem ser esclarecidas com os médicos do estudo, pelo telefone 31 3409-9762 ou diretamente com os pesquisadores. Sua participação é totalmente voluntária e o Sr.(a) pode não querer participar ou pode desistir em qualquer momento, sem que isso implique em qualquer prejuízo para a sua pessoa ou familiares, e você pode continuar normalmente o seu acompanhamento no serviço. Uma cópia deste documento será entregue a você.

Tenho ciência do exposto e concordo em participar deste estudo.

Nome sujeito da pesquisa: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_



## ANEXOS

### ANEXO A - Aprovação pelo COEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 0637.0.203.000-10

Interessado(a): **Profa. Adriana Maria Kakehasi**  
Departamento de Aparelho Locomotor  
Faculdade de Medicina- UFMG

#### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 23 de março de 2011, o projeto de pesquisa intitulado “Estudo das vias de sinalização intracelular ativadas por interleucina-33 em fibroblastos de membrana sinovial de pacientes com artrite reumatóide.” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO B - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO INTRACELULAR ATIVADAS POR INTERLEUCINA-33 EM FIBROBLASTOS DE MEMBRANA SINOVIAL DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATÓIDE

**Pesquisador:** ADRIANA MARIA KAKEHASI

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 08387918.6.0000.5149

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da UFMG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.293.068

**Apresentação do Projeto:**

Estudo experimental com 20 participantes com artrite reumatoide, segundo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR), em acompanhamento do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG e que tiverem indicação de serem submetidos à artrocentese (de tornozelos, joelhos, punhos ou cotovelos) segundo avaliação clínica, independentemente de seu tratamento sistêmico, com coleta de líquido sinovial no Ambulatório de Artrite Reumatoide do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG, no Hospital Bias Fortes, 2º andar.

**Objetivo da Pesquisa:**

Segundo PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_753781.pdf:

**Objetivo Primário:** Avaliar as vias de sinalização intracelular ativadas por IL-33 em sinoviócitos fibroblastos-like de pacientes com artrite reumatóide, identificando possíveis biomarcadores ou potenciais alvos terapêuticos.

**Objetivo Secundário:** Estudar as respostas à utilização de inibidores farmacológicos das vias de sinalização que se mostrarem relevantes após ativação por IL-33. Estudar as vias de sinalização intracelular ativadas por interleucina-33 (IL-33) em sinoviócitos fibroblastos-like de pacientes com artrite reumatóide.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo TCLE\_Atualizado.pdf:

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.293.068

"Não se espera que o(a) senhor(a) tenha nenhum risco por participar deste estudo, a não ser o relacionado aos procedimentos aos quais o(a) senhor(a) tenha indicação médica de se submeter, de maneira idêntica ao procedimento habitual. Tanto para fragmento do tecido que será retirado da articulação doente quanto o líquido articular inflamado, serão realizadas o cultivo das células presentes nesse tecido e líquido, e realizaremos dosagens de substâncias que fazem parte do processo inflamatório da doença nessas células. Todo o material ficará de responsabilidade dos pesquisadores. Não está previsto a realização de qualquer exame ou procedimento que não faça parte da avaliação habitual necessária ao cuidado de qualquer pessoa com artrite reumatoide. Em nenhum momento sua identidade será revelada e o material colhido da sua articulação ou os resultados desse estudo não serão utilizados para outros fins que não sejam o desse estudo. Não existem riscos ou desconfortos adicionais para o senhor(a) uma vez que os procedimentos serão realizados somente com o fragmento do tecido, já em laboratório de pesquisa. Os médicos que lhe assistem para sua doença terão conhecimento de que o senhor(a) está participando da pesquisa. Apesar disso, após a coleta do material todos os procedimentos serão conduzidos sem identificação de seu nome e dados. Os objetivos deste estudo são propiciar o conhecimento sobre o que acontece dentro da célula das articulações inflamadas de pacientes com artrite reumatoide, e os produtos dessas células."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Conforme resposta do pesquisador ao Parecer deste Comitê, nº 3.203.633, Resposta\_Parecer.pdf:

Segundo a pesquisadora, este projeto é uma atualização do Projeto já aprovado no Comitê, em 2011, antes da Plataforma Brasil, nº ETIC 0637.0.203.00-10, que não foi finalizado, e que agora, seriam realizadas as dosagens das coletas realizadas na época.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Em atendimento ao Parecer deste Comitê, nº 3.203.633:

- Anexada declaração da Gerência de Ensino e Pesquisa - GEP HC-UFMG/Ebserh, em 27/03/2019.
- Anexada a anuência do Laboratório Lineu Freire Maia, em 26/03/2019.
- Correção do TCLE.

**Recomendações:**

Como o material já foi colhido anteriormente, o TCLE anteriormente aprovado já foi aplicado. Se houver nova aplicação do TCLE para alguma amostra já colhida sem o consentimento do termo, já

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.293.068

que as coletas já foram realizadas, o texto deverá ser corrigido em:

"Nesta pesquisa para a qual o Sr.(a) está sendo convidado a participar, se Sr.(a) tiver que fazer uma cirurgia por causa da artrite reumatoide para colocar uma prótese no joelho, pé ou quadril, e concordar em participar, um fragmento do tecido que será retirado da articulação doente será coletado para estudos sobre as células e as substâncias que fazem parte do processo inflamatório da doença. Esse fragmento será obtido do tecido que deve ser retirado do seu corpo para a colocação da prótese durante a cirurgia, sendo que, em hipótese alguma, será retirado qualquer fragmento de tecido que não faça parte daquele que já seria retirado no procedimento cirúrgico. Caso o Sr.(a) seja submetido a punção articular, previamente à infusão da medicação anti-inflamatória, realizaremos aspiração do líquido articular inflamado. Esse processo visa ao alívio da dor e em alguns casos à análise em laboratório das características desse aspirado. Solicitamos autorização para que o líquido excedente seja utilizado na pesquisa acima mencionada."

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Este projeto, trataria-se de uma emenda e não de um novo projeto, com novo CAAE, no entanto, como se trata de um projeto anterior à Plataforma Brasil, e não seria possível emenda via Plataforma Brasil, este projeto encontra-se aprovado. As próximas alterações do projeto, como extensão do prazo, deverão ser encaminhadas via emenda, na Plataforma Brasil.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento                 | Arquivo                                      | Postagem               | Autor                     | Situação |
|--------------------------------|--|------------------------|---------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_753781.pdf | 03/04/2019<br>11:23:55 |                           | Aceito   |
| Outros                         | Resposta_Parecer.pdf                         | 03/04/2019<br>11:22:15 | ADRIANA MARIA<br>KAKEHASI | Aceito   |
| Outros                         | Anuencia_Lab_Lineu_Freire.pdf                | 03/04/2019             | ADRIANA MARIA             | Aceito   |

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.293.068

|   |                               |                        |                                 |        |
|---|-------------------------------|------------------------|---------------------------------|--------|
| Outros  | Anuencia_Lab_Lineu_Freire.pdf | 11:21:59               | KAKEHASI                        | Aceito |
| Outros  | Anuencia_Hospital.pdf         | 03/04/2019<br>11:21:36 | ADRIANA MARIA<br>KAKEHASI       | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_Atualizado.pdf           | 03/04/2019<br>11:21:09 | ADRIANA MARIA<br>KAKEHASI       | Aceito |
| Outros  | Aprovacao_anterior.pdf        | 03/04/2019<br>11:19:29 | ADRIANA MARIA<br>KAKEHASI       | Aceito |
| Parecer Anterior  | Parecer.PDF                   | 12/02/2019<br>16:11:31 | ADRIANA MARIA<br>KAKEHASI       | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | PROJETO.doc                   | 09/07/2018<br>15:17:33 | ADRIANA MARIA<br>KAKEHASI       | Aceito |
| Folha de Rosto  | Folha_de_Rosto.PDF            | 09/08/2016<br>13:10:37 | Camilla Ribeiro Lima<br>Machado | Aceito |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 29 de Abril de 2019

Assinado por:

**Eliane Cristina de Freitas Rocha**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br