

FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

TAMIRIS DE PAULA SILVA

Avaliação da expressão gênica de agonistas e antagonistas da via Wnt em células do tipo fibroblastos sinoviócitos
símile humanos.

Belo Horizonte

2020

TAMIRIS DE PAULA SILVA

Avaliação da expressão gênica de agonistas e antagonistas da via Wnt em células *ex-vivo* de fibroblastos do tipo sinoviócitos humanos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Saúde do Adulto.
Área de concentração: Ciências Clínicas.

Orientador: Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Belo Horizonte

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Silva, Tamiris de Paula.
SI586a Avaliação da expressão gênica de agonistas e antagonistas da via Wnt em células do tipo fibroblastos sinoviócitos símile humanos [manuscrito]. / Tamiris de Paula Silva. - - Belo Horizonte: 2020.
75f.: il.
Orientador (a): Marcus Vinicius Melo de Andrade. Área de concentração: Ciências Clínicas.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Proteínas Wnt. 2. Doenças Reumáticas. 3. Doenças Ósseas.
4. Expressão Gênica. 5. Dissertação Acadêmica. I. Andrade, Marcus Vinicius Melo de. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
III. Título.

NLM: WE 544

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor

Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Prof. Fábio Alves da Silva Júnior

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Prof. Humberto José Alves

Vice-Diretora

Prof. Alamanda Kfoury Pereira

Chefe do Departamento de Clínica Médica

Eliane Viana Mancuzo

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

Coordenadora

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenadora

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

Colegiado

Representantes Docentes

Prof. Eduardo Garcia Vilela

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

Profa. Luciana Costa Faria

Profa. Luciana Diniz Silva

Prof. Maria de Lourdes de Abreu Ferrari

Profa. Suely Meireles Rezende

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Representante Discente

Fernanda Aziz Barbosa – Discente Titular

Mariana Benevides Paiva Machado – Discente Suplente



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE AGONISTAS E ANTAGONISTAS DA VIA WNT EM CÉLULAS DO TIPO FIBROBLASTOS SINOVIÓCITOS SÍMILE HUMANOS

TAMIRIS DE PAULA SILVA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada com correções, no dia vinte e nove de outubro de dois mil e vinte, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto da Universidade Federal de Minas Gerais. Deverão ser realizadas na Dissertação de Mestrado as seguintes modificações: reelaboração do texto e colocação no formato segundo as orientações do Programa; redação e ajustes nos resultados com escrita do manuscrito em inglês em formato para submissão; reelaboração das tabelas e figuras, conforme orientação da banca, assim como revisão da análise estatística. Todas estas alterações/modificações deverão ser discutidas e avaliadas pelo orientador para a aprovação final. A versão corrigida da dissertação deverá ser entregue no prazo máximo de 90 (noventa) dias. Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores doutores:

Marcus Vinicius Melo de Andrade - orientador
UFMG

Cristina Costa Duarte Lanna

UFMG

Lirlândia Pires de Sousa

UFMG

Belo Horizonte, 29 de outubro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Lirlândia Pires de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 04/01/2021, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Costa Duarte Lanna, Professora do Magistério Superior**, em 19/02/2021, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcus Vinicius Melo de Andrade, Professor do Magistério Superior**, em 19/02/2021, às 14:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0317903** e o código CRC **19F99E46**.

DEDICAÇÃO

Dedico esse trabalho, e todo o meu coração, à mulher que me inspira a ser sempre a minha melhor versão diariamente. À mulher que não só me deu o dom da vida, mas que todos os dias me dá motivos para viver.

Ao meu amor, minha paixão, minha melhor amiga e meu presente de Deus nesse mundo, minha mãe, Rosângela.

I carry your heart with me, Poema de E.E. Cummings

I carry your heart with me (I carry it in my heart)
I am never without it (anywhere I go you go, my dear; and whatever is done by only me is you doing, my darling)
I fear no fate (for you are my fate, my sweet)
I want no world (for beautiful you are my world, my true)
And it's you are whatever a moon has always meant
And whatever a sun will always sing is you
Here is the deepest secret nobody knows
(Here is the root of the root and the bud of the bud
And the sky of the sky of a tree called life; which grows
Higher than soul can hope or mind can hide)
And this is the wonder that's keeping the stars apart
I carry your heart (I carry it in my heart)

Eu carrego o seu coração comigo, Poema de E.E. Cummings

Eu carrego o seu coração comigo (Eu o carrego no meu coração)
Eu nunca estou sem ele (aonde quer que eu vá, minha querida; e o que quer que eu faça, é você que está fazendo, minha querida)
Eu não temo o destino (pois você é o meu destino, minha querida)
Eu não quero o mundo (pois você é o meu mundo, minha verdade)
E você é o que a lua sempre quis dizer
E o que um sol sempre cantará é você
Aqui está o segredo mais profundo que ninguém conhece
(Aqui está a raiz da raiz e o botão do botão)
E o céu do céu de uma árvore chamada vida; que cresce
Mais alto que a alma pode ter esperança ou a mente pode se esconder)
E essa é a maravilha que mantém as estrelas separadas
Eu carrego seu coração (eu o carrego em meu coração)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me permitir ter vida e saúde para trilhar meus objetivos sob sua luz.

Agradeço a minha família por todo o apoio, suporte e incentivo para que eu pudesse concluir essa etapa de minha vida. Mãe, conseguimos!!!! Muito obrigada por tudo sempre, amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcus Vinicius, obrigada por ter sido meu orientador desde a iniciação científica até a conclusão desse mestrado.

Ao Dr. Gustavo Gomes Resende por ter me confiado seu projeto, por todo o suporte e disponibilidade, desde o início até a conclusão desse estudo.

A Dra. Camila Ribeiro Lima Machado, minha companheira no laboratório Lineu Freire Maia ao longo desses 5 anos. Obrigada pela parceria e companheirismo.

Ao laboratório de reprodução humana do HC-UFGM do Prof. Dr. Fernando Reis e, especialmente à minha amiga a doutoranda Maíra Casalechi e a todos os seus colegas do laboratório pela acolhida, disponibilidade e todo o auxílio para que eu conseguisse fazer os experimentos de PCR. Sem vocês, a conclusão desse trabalho não seria possível. Muito obrigada por tudo!!! Principalmente a você minha amiga querida!!! Gratidão eterna!!!!

Ao laboratório de hematologia molecular da Faculdade de Medicina, da Profa. Dra. Sandra Guerra e das técnicas Valéria Câmara e Bárbara Quinan pela parceria.

Às amigas queridas Ana Maria Santi e Paula Alves pela amizade, por todas as trocas e toda a ajuda durante essa árdua caminhada.

Às minhas amigas pessoais que sempre me fortalecem e me dão alento diante das dificuldades da caminhada, meu muito obrigada: Ana Paula Rabelo, Lívia Pires, Mariana Brandão Franco.

RESUMO

INTRODUÇÃO: a via Wnt regula vários fenômenos e processos fisiológicos ao longo da vida humana incluindo o desenvolvimento ósseo. O metabolismo ósseo consiste em uma estabilidade entre a formação e a absorção do tecido. Quando esse equilíbrio é perdido as pessoas afetadas podem sofrer erosão ou osteoproliferação óssea. Atualmente para os pacientes com absorção óssea há vários medicamentos enquanto que para os pacientes com osteoproliferação óssea não há muitas opções eficazes. **OBJETIVOS:** analisar a expressão genética de agonistas e antagonistas da via Wnt de pacientes com artrite reumatoide- AR e espondiloartrites- EpAs (espondilite anquilosante e artrite psoriásica). **METODOLOGIA:** foram cultivados fibroblastos sinoviais de sete pacientes sendo quatro com artrite reumatoide e três com espondiloartrites (um com espondilite anquilosante e dois com artrite psoriásica) em meio de cultura DMEM com soro fetal bovino. Depois, dos fibroblastos foi extraído o mRNA, convertido em cDNA. Com o cDNA foi feito o RT-qPCR pelo método TAQMAN. **RESULTADOS:** Em todos os genes houve uma diferença de expressão entre os fibroblastos estimulados e os não estimulados, mas o resultado estatisticamente significativo foi o do gene WNT-9A. Com esse gene houve uma redução de expressão nos fibroblastos estimulados com IL-17, IL-22 e TNF-alfa nos pacientes com artrite reumatoide e com espondiloartrites. A maioria dos resultados desse estudo foram não estatisticamente significativas comprovando que a hipótese de que os estímulos alterariam a expressão gênica dos fibroblastos se tornou nula. **CONCLUSÕES:** Alguns fatores podem ter contribuído para esses resultados como baixo N amostral, estímulo com as citocinas, estímulo não completo em condições *in vitro* pois foram desconsideradas as interações entre os genes e entre os antagonistas e agonistas. Dessa forma a mais estudos se tornam necessários para que se possa confirmar ou não que os estímulos com as citocinas realmente não afetam a expressão dos genes antagonistas e agonistas que compõe a via Wnt. **PALAVRAS CHAVE:** proteínas Wnt, doenças reumáticas, doenças ósseas, expressão gênica.

ABSTRACT

INTRODUCTION: the Wnt pathway regulates various physiological phenomena and processes throughout human life including bone development. Bone metabolism consists of stability between tissue formation and absorption. When this balance is lost, affected people may experience erosion or bone proliferation. Currently, for patients with bone absorption have several medications available while for patients with bone proliferation there are not many effective drug options.

OBJECTIVES: to analyze the gene expression of the Wnt pathway agonists and antagonists in patients with rheumatoid arthritis - RA and spondyloarthritis - SpAs (ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis).

METHODOLOGY: Synovial fibroblasts were grown from seven patients, four with rheumatoid arthritis and three with spondyloarthritis (one with ankylosing spondylitis and two with psoriatic arthritis) in DMEM culture medium with fetal bovine serum. Then, from the fibroblasts, the mRNA was extracted, converted into cDNA. RT-qPCR was performed using the cDNA using the TAQMAN method.

RESULTS: In all genes, there was a difference in expression between stimulated and unstimulated fibroblasts, but the statistically significant result occurred with the WNT-9A gene. With this gene, there was a reduction in expression in fibroblasts stimulated with IL-17, IL-22 and TNF-alpha in patients with rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. Most of the results of this study were not statistically significant, proving that the hypothesis that stimuli would alter the gene expression of fibroblasts has become null.

CONCLUSIONS: Some factors may have contributed to these results, such as low N sample, stimulus with cytokines, non-complete stimulus in in vitro conditions because interactions between genes and between antagonists and agonists were disregarded. Thus, further studies are necessary to confirm or not that the stimuli with cytokines do not really affect the expression of the antagonist and agonist genes that make up the WNT pathway.

KEY WORDS: Wnt proteins, rheumatic diseases, bone diseases, gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP - Artrite psoriásica

APC - polipose coli adenomatosa

AR - Artrite reumatoide

bDMARD's do inglês *Biological disease modifying antirheumatic drugs*, ou seja, anti-reumáticos modificadores de doenças biológicas

BMP - proteína óssea morfogenética

COEP - comitê de ética e pesquisa

CDH-11 - caderina 11

CPMs - células progenitoras mesenquimais

DCV - doenças cardiovasculares

DKK - proteínas dickkopf

DMARD's do inglês *Disease modifying antirheumatic drugs*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* nome do meio de cultura em inglês

EA - espondilite anquilosante

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EpA - Espondiloartrites

FLS - *Fibroblast like sinoviocytes*, termo do inglês: fibroblastos tipo sinoviócitos

FR - fator reumatoide

FRZB - proteína relacionada ao frizzled

IFN- β - interferon beta

IL-1 - Interleucina 1

IL-17 - Interleucina-17

IL-22 - Interleucina 22

IL-23 - Interleucina 23

JAK - janus cinase

LABLFM - Laboratório Lineu Freire Maia

LRP - receptor de lipo-proteínas

MHC - complexo principal de histocompatibilidade

Ng - Nanogramas

NK - natural killers

OPG - osteoprogenina

PBS - tampão fosfato salino

PCP - polaridade celular planar

PKC - proteína cinase C

RANK - receptor cognato do ativador do fator nuclear Kappa- β

RANKL - ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa- β

RNAm - ácido ribonucleico mensageiro

Rspo1-R-espondina-1

SFB - Soro fetal bovino

sFRPs - proteínas relacionadas a frizzled secretadas

STAT - transdutor e ativador de transcrição de janus quinase

TNFis - Inibidores do fator de necrose tumoral

TNF-RI -receptores tipo I do fator de necrose tumoral

TNF-RII -receptores tipo II do fator de necrose tumoral

TNFRSF- receptores da superfamília do TNF

TNFSF- superfamília do TNF

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

WIF - inibidor WNT

WNT - Wingless/Integrated

Lista de figuras

Figura 1: Ativação da sinalização da via Wnt	33
Figura 2: Resultados dos genes que apresentaram amplificação gênica.....	74

Lista de tabelas

Tabela 1: Atuação das citocinas em relação ao grupo de doenças	33
Tabela 2: Antagonistas e agonistas da via Wnt	34
Tabela 3: Modelo da placa TaqMan customizada usada no experimento	43
Tabela 4: Expressão de CDH-11 de acordo com cada tratamento.....	62
Tabela 5: Resultados.....	60

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	16
1.1 A via Wnt	16
1.1.2 A via Wnt no metabolismo ósseo	21
1.1.3 Antagonistas da via WNT	22
1.1.4 Agonistas da via WNT	23
1.2 Membrana sinovial	24
1.2.1 <i>Pannus</i>	25
1.3 Caderina nos fibroblastos sinoviócitos símile	26
1.4 Fibroblasts like sinovyocytes (fibroblastos do tipo sinoviócitos)	27
1.5 DOENÇAS	27
1.5.1 Artrite reumatoide	28
1.5.2 Espondiloartrites	29
1.5.2.1 Espondilite Anquilosante	30
1.5.2.2 Artrite Psoriásica	31
1.6 Citocinas	32
2.0 JUSTIFICATIVA	36
3.0 OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4.0 MÉTODOS	39
4.1 Cultura celular	39
4.2 Cultivo celular	40
4.3 Plaqueamento e estímulo celular	41
4.4 Extração de RNA	42
4.5 Transcrição reversa	42
4.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real – qPCR	43
5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
6.0 RESULTADOS	55
6.1 Artigo:	55
6.1.2 Perspectivas futuras	67
6.2.3 Referências do artigo	68

7.0 ANEXOS	71
7.1 ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	71
7.2 ANEXO 2- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 A via Wnt

O primeiro gene Wnt, então conhecido como int-1 (local 1 de integração do vírus do tumor mamário no camundongo), foi isolado dos tumores mamários de camundongo em 1982 [1]. O Int-1 mostrou-se altamente conservado em várias espécies e semelhante ao gene de *Drosophila*, do inglês *wingless* (Wg), um gene envolvido no desenvolvimento de suas asas [151]. O nome Wnt, vem de uma fusão de wg e int-1[2,3] e a maioria dos animais possui vários genes Wnt, como os humanos que codificam 19 genes e a *Drosophila* que codifica sete [2].

A via Wnt é composta por glicoproteínas secretadas que atuam na indução de uma cascata de sinalização [4], que regula diversos fenômenos durante o desenvolvimento embrionário e processos fisiológicos ao longo da vida humana [5]. Um aspecto distintivo da sinalização dessa via é a atuação na forma dos tecidos em crescimento enquanto induz as células a proliferarem[6].

Desde a sua descoberta seu papel crucial no desenvolvimento humano tem sido comprovado em uma grande variedade de sistemas e órgãos como: cérebro, olhos, medula espinhal, osso, cartilagem, pele, sistemas hematopoiético e reprodutivo, dentre outros. Além disso, sua sinalização possui papéis cruciais na idade adulta como, por exemplo, nos processos de homeostase e regeneração dos tecidos [7]. Um desses processos é o desenvolvimento ósseo [8,9]. O metabolismo ósseo, assim como de vários outros órgãos, consiste em um equilíbrio entre a formação e a absorção tecidual. Quando esse balanço é afetado pode resultar em um desequilíbrio anormal sendo que os indivíduos acometidos podem sofrer com a erosão ou a proliferação óssea [10,11].

Para desencadear uma resposta celular e ativar a transdução de sinal intracelular, as glicoproteínas da via se ligam à receptores da família Frizzled (FRZB) e à vários co-receptores, como o complexo LRP 5/6 (receptor relacionado a lipoproteínas de baixa densidade) [3]. Em humanos, 19 membros da família WNT e 10 receptores Frizzled são conhecidos [12].

A via Wnt, está subdividida em via canônica ou dependente de β -catenina e a não-canônica ou independente dessa proteína[4]. A ativação das vias de sinalização de uma dessas subdivisões é determinada pela combinação de ligante, receptor e co-receptores. Na ausência de estimulação

Wnt, a β -catenina citoplasmática é fosforilada por um complexo de glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β), polipose adenomatosa coli (APC) e Axina. A β -catenina fosforilada é posteriormente ubiquitinada e rapidamente degradada pelo sistema proteassomal para prevenir o acúmulo citoplasmático [5,8]. Por outro lado, a estimulação da via Wnt suprime a atividade de GSK-3 β e induz o acúmulo citoplasmático de β -catenina. A β -catenina acumulada se transloca para o núcleo onde induz a expressão de genes alvo juntamente com outros fatores de transcrição como o fator de células T (TCF) /fator 1 intensificador de linfócitos (LEF1) e CBP (proteína de ligação à CREB) [6,9].

A via de sinalização não canônica é um termo genérico usado para as vias não mediadas por β -catenina como as vias Wnt/Ca₂₊ e Wnt / polaridade celular planar (PCP). Na via Wnt/Ca₂₊, o aumento da concentração intracelular de Ca₂₊ ativa a proteína cinase II dependente de calmodulina (CaMK II) e a proteína cinase C (PKC). Na via Wnt/PCP, pequenas proteínas G, são ativadas para aumentar a motilidade celular, bem como determinar a direção e localização dos cílios [9].

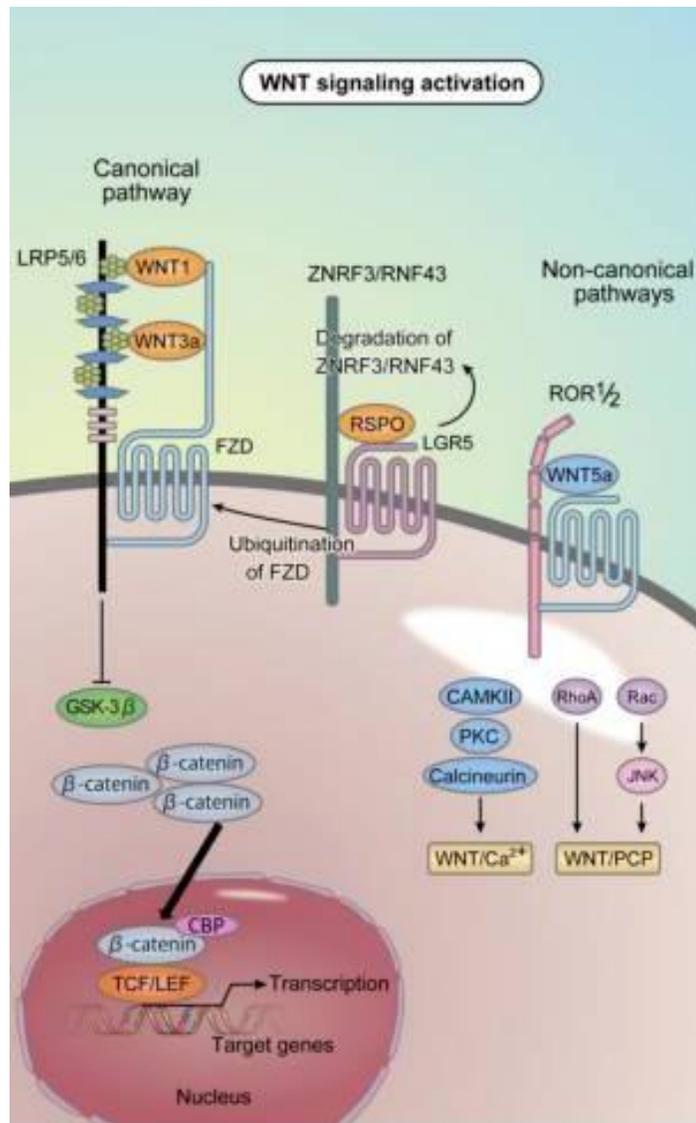


Figura 1: Ativação da sinalização da via Wnt

Fonte: figura adaptada de Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, et al. **The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling.** *Int J Mol Sci.* 2019; 20(22):5525 [9]

Vários estudos atualmente investigam se há benefícios ao se realizar a suplementação dos níveis de agonistas e antagonistas da via Wnt com proteínas recombinantes para produzir efeitos terapêuticos [13,14]. Por exemplo, em um estudo pré-clínico de linhagem osteogênica de células tronco embrionárias foi feita uma suplementação com Wnt-5A recombinante o que causou uma produção osteogênica significativamente elevada em relação às células que não foram suplementadas [15]. Por outro lado, em doenças nas quais o Wnt está presente excessivamente, modelos pré-clínicos mostram que sua inibição também pode levar a benefícios[16]. Por exemplo,

em um estudo com modelo pré-clínico, a secreção de Wnt pelos osteoblastos foi bloqueada então o grupo tratado com inibidores ficaram suscetíveis à diminuição da massa óssea [17]. Por outro lado, é fundamental ter conhecimento adequado do potencial das terapias de ativação das glicoproteínas Wnt para não predispor ao crescimento celular inadequado. Até o momento, esta questão não tem sido um problema, devido talvez à especificidade de algumas das terapias em modelos pré-clínicos. Por exemplo, a esclerostina é expressa principalmente em osteócitos maduros e acredita-se que atue no ambiente local apenas; portanto, prevê-se que os efeitos das terapias anti-esclerostina sejam limitados ao esqueleto [18].

A duplicação do eixo e a transformação celular são baseadas na ativação da via Wnt canônica que envolve a proteína multifuncional β -catenina. Na ausência de Wnt, a β -catenina é direcionada para um complexo proteico multimérico que a destrói por fosforilação [19].

Na presença de alguns ligantes Wnt, uma cascata de eventos iniciados na membrana plasmática pela ligação de WNT ao domínio rico em cisteína dos receptores FRZB resulta na desmontagem do complexo de destruição e na estabilização de β -catenina. Com seu acúmulo ela é eventualmente importada para o núcleo, onde serve como um co-ativador transcricional de fatores de transcrição da família TCF / LEF. Em camundongos, a exclusão do exon 3 a 6 resulta em perda de função da β -catenina, porque essa forma truncada da β -catenina não é capaz de funcionar na co-ativação transcricional [20,21]. Os genes alvo do TCF / LEF estão envolvidos na regulação da proliferação celular, manutenção de células-tronco ou diferenciação [22,23].

A β -catenina é uma proteína multifuncional que interage com proteínas adicionais, como as caderinas [24]. Essa interação é essencial para a função dessas glicoproteínas na adesão celular, estabelecendo um vínculo com o citoesqueleto de actina. Essa interação também é fortemente regulada pela fosforilação, indicando que o papel da β -catenina na transdução de sinal mediada por Wnt e na adesão celular é altamente dependente de seu status de fosforilação em múltiplos locais [25,26].

Este modelo de especificidade de Wnts e receptores de sinalização FRZB [27], canônicos ou não-canônicos foi questionado pela descoberta de que os chamados ligantes Wnt não-canônicos podem ativar a sinalização de β -catenina na presença de receptores Frizzled apropriados e vice-versa. O Wnt-3A canônico tem a capacidade de ativar a proteína cinase C- PKC durante a formação óssea [28] e o Wnt-5A não-canônico se acopla à sinalização Wnt canônica na presença de Frizzled-5

[29]. Recentemente, foi demonstrado que o Wnt-11 não-canônico ativou a sinalização de β -catenina durante a especificação do eixo no *Xenopus* [30]. Esses dados indicam que diferenças nas afinidades de diferentes Wnt e FRZB e suas concentrações locais (*in vivo*, mas também em modelos pré-clínicos) determinariam a qual ramo de sinalização um Wnt específico se une. Estendendo essas descobertas anteriores, foi recentemente demonstrado que as proteínas Wnt-5A e Wnt-11 podem interagir fisicamente e, assim, induzir a sinalização de β -catenina. A sulfatação O-dependente da proteína tirosil-sulfotransferase-1 de resíduos específicos de tirosina de Wnt-11 é necessária para essa interação com Wnt-5A [31]. Da mesma forma, o FRZB-4 ativa a sinalização de β -catenina [32] ou os ramos de sinalização não-canônicos [33] e também há evidência para dímeros e multímeros FRZB [34,35]. Esses achados indicam que a análise de um determinado ligante Wnt ou receptor Frizzled em um determinado contexto biológico sempre requer uma investigação de como o sinal Wnt é traduzido [36].

A ativação da sinalização canônica de Wnt/ β -catenina requer a interação de um ligante Wnt com FRZB e LRP-5/6. O principal resultado da ativação da via é a desintegração do complexo de destruição, a liberação de β -catenina e sua subsequente estabilização. Isto se dá através da ligação da proteína *dishvelled* e axina à FRZB e LRP-5/6 fosforilado, respectivamente. A fosforilação de LRP-5/6 induzida por Wnt é mediada pela ação de GSK3 β e CK1 [37]. Um estudo recente indicou que em *Drosophila* também acontecem esses eventos da LRP5/6 [38]. Além disso, a β -catenina é necessária para a separação dos centrossomas durante a mitose [39]. Aparentemente, há um feedback intrincado entre o mecanismo do ciclo celular e a sinalização Wnt para manter um estado de alta proliferação, como encontrado nas células-tronco ou células tumorais. Um estudo recente também mostra que o Wnt-3A estimula a formação de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatos através de FRZB, o último dos quais interage diretamente com e ativa o PIP5KI [40]. Ele pode posteriormente fosforilar o LRP5/6. Além disso, o receptor cinase 5/6 acoplado à proteína G é capaz de fosforilar LRP-5/6 [41]. Algumas evidências sugerem que o LRP6 também antagoniza a sinalização Wnt não-canônica *in vivo*, possivelmente através da competição por ligantes Wnt [42] ou por um mecanismo desconhecido [43].

Os FRZBs são proteínas transmembranas frequentemente associadas às proteínas G heterotriméricas que iniciam a transdução de sinal intracelular. Enquanto já se sabe há muito tempo que a sinalização WNT não-canônica está ligada às proteínas G [44-46], a falta de evidência

genética foi usada por alguns para argumentar contra o papel das proteínas G na transdução de sinal WNT canônica. As primeiras descobertas de que eles estão envolvidos em uma posição-chave foram obtidas em experimentos usando receptores FRZBs indutíveis que indicaram uma dependência das proteínas G em ramos de sinalização canônicos e não canônicos[47-50].

1.1.2 A via Wnt no metabolismo ósseo

Como visto, uma glicoproteína WNT se liga a dois receptores de membrana, LRP5 e FRZB, resultando na montagem de uma estrutura proteica intracelular que impede a fosforilação da β -catenina. Essa proteína então se acumula e é translocada para o núcleo, ligando-se a fatores que resultam na regulação positiva de genes importantes para a função dos osteoblastos. Inibidores da sinalização Wnt, como DKK1, SFRP e esclerostina são importantes reguladores negativos dessa sinalização. Em um estudo com modelos de artrite inflamatória, os inibidores da via de sinalização Wnt, DKK1 e SFRP, foram regulados positivamente no tecido sinovial inflamado sugerindo que a inibição da sinalização de Wnt poderia explicar a função reduzida de osteoblastos observada no estudo. Nesse mesmo estudo, o tratamento com anticorpos neutralizantes para DKK1 resultou em proteção contra a erosão óssea. Assim, a expressão de osteoprotegerina (OPG- uma citocina com afinidade ao RANKL e efeito inibitório sobre este) foi reduzida, resultando na supressão da maturação e função dos osteoclastos, indicando que a sinalização da via Wnt está envolvida na regulação da osteoclastogênese pela via RANKL [3,51]. Em humanos com AR, os níveis de DKK1 são geralmente mais altos, o que supostamente resultaria em inibição da formação óssea [52]. Com o bloqueio do TNF- α , os níveis de DKK1 são reduzidos [53]. Por isso vários agentes que regulam a sinalização Wnt canônica estão sendo desenvolvidos. Dentre estas, estão estratégias para bloquear a função da esclerostina ou do DKK1, atualmente em ensaios clínicos em humanos [54]. Além disso, estudos recentes que caracterizam a atividade de anticorpos projetados para modular a ativação da sinalização de β -catenina mediada por LRP6 apresentam um potencial terapêutico para estimular a sinalização na ausência de DKK1 [55]. Também, a aplicação direta de vesículas lipossômicas empacotadas com Wnt-3A purificado estimula a regeneração e o enxerto ósseo [56]. Finalmente, o tratamento com cloreto de lítio, que estabiliza a β -catenina por meio da inibição da atividade da GSK-3 também pode melhorar a cicatrização de fraturas [57].

Em doenças inflamatórias como a AR, o equilíbrio entre formação e reabsorção é alterado com o aumento da reabsorção óssea e diminuição da formação óssea gerando danos estruturais à integridade das articulações sinoviais[11].

1.1.3 Antagonistas da via WNT

Como comumente observado em vias de sinalização, a atividade da Wnt é regulada por proteínas extracelulares que antagonizam o ligante, como as proteínas das famílias DKK e esclerostina/SOST. Essas moléculas antagonizam a sinalização de Wnt ao se ligarem ao LRP5/6, possivelmente interrompendo a dimerização do FZD-LRP6 induzida por Wnt [55]. As moléculas que interferem com o Wnt também incluem proteínas relacionadas à FZD secretadas (sFRPs) e fatores inibidores da via (WIF), ambas capazes de se ligar diretamente às Wnts[55].

Dentre os inibidores mais bem caracterizados da via canônica de Wnt está o DKK1. Este próprio é um gene alvo da sinalização Wnt/ β -catenina, estabelecendo assim um loop de feedback negativo. A família Dickkopf de proteínas secretadas é conservada entre todos os vertebrados e está presente também em alguns invertebrados, como urocordatos e ascídias [58]. DKK1 consiste em 2 domínios ricos em cisteína no terminal N e C, respectivamente. O domínio rico em cisteína C-terminal mostra-se responsável pela função inibidora de Wnt. DKK1 inibe a formação de um complexo ternário constituído por LRP5/6, Frizzled e o ligante WNT. Outros estudos indicaram que DKK1, juntamente com proteínas transmembranas da família Kremen, medeiam a internalização de LRP5/6 [59]. Na ausência do DKK1, no entanto, Kremen ativa a sinalização Wnt através do LRP5/6 [60]. Este é um achado interessante, pois permitiria um gradiente acentuado de inibição da via Wnt na presença de um gradiente de proteína DKK1 [61].

A internalização do LRP-5/6 não é apenas um mecanismo para inibir a sinalização Wnt, reduzindo a acessibilidade do LRP-5/6 para ligantes Wnt, mas também é necessária para a sinalização Wnt. Essa diferença é baseada principalmente no mecanismo pelo qual o LRP-5/6 é internalizado pois, enquanto a internalização de LRP5/6 resulta em inibição da via Wnt, esta também impede a sinalização da via canônica de Wnt por meio da menor disponibilidade de receptores para a sinalização [62].

A sinalização de Wnt/ β -catenina também pode ser modulada por ligantes extracelulares diferentes de Wnts como as espondinas-R cujas funções são: interagir diretamente com Frizzled-8 e LRP5/6,

regulando positivamente tanto a sinalização de β -catenina quanto competindo com DKK1 pela ligação à Kremen e LRP5/6 [63,64].

Um nível adicional de regulação é dado por inibidores de Wnt secretados, como proteínas WIF e proteínas relacionadas a frizzled secretadas (Sfrps). WIFs e Sfrps podem se ligar diretamente às proteínas WNT no espaço extracelular, afetando assim a ocupação do receptor e, finalmente, a resposta celular [65-67].

1.1.4 Agonistas da via WNT

Como descrito anteriormente essa via tem sido profundamente investigada no contexto ósseo, concentrando-se nos moduladores extracelulares ligantes da via e na estabilização da β -catenina e ligação desta à fatores de transcrição [68]. Geralmente, observam-se aumentos na sinalização canônica através dos agonistas, levando ao aumento da osteoblastogênese e formação óssea [69]. A modulação da via por meio de anticorpos direcionados à um antagonista da sinalização canônica de Wnt, tem sido particularmente bem-sucedido. Esses anticorpos, juntamente com os análogos são atualmente a única terapêutica osteoanabólica aprovada pela agência sanitária norte-americana *Food and Drug Administration-FDA* [70].

As proteínas espondinas-R, uma família de quatro membros, potencializam a sinalização de WNT e podem representar um novo foco de direcionamento terapêutico para modular os osteoblastos. Elas ativam a sinalização canônica de WNT, ligando-se aos receptores acoplados a proteína G. Também é relatado as espondinas-R ativam a sinalização não-canônica de Wnt/Polaridade Celular Planar (PCP). Todos os membros dessa família têm uma estrutura de domínio modular semelhante: uma sequência de sinal N-terminal, duas furinas/domínios ricos em cisteína, uma trombospondina do tipo 1 e um terminal C rico em aminoácidos, que são codificados em éxons separados. Cada uma dessas proteínas também são expressas nos membros em desenvolvimento dos camundongos, assim como em outros tecidos, e cada um tem diferentes efeitos funcionais em relação ao esqueleto. A interrupção da espondina-R1 (RSPO1) não está associada a um fenótipo esquelético, mas sua expressão é induzida durante a osteoblastogênese e em resposta à vibração [71].

Neste trabalho estudamos a expressão nos fibroblastos tipo sinoviócitos (FLS) de vários destes genes, agonistas e antagonistas da via WNT, descritos acima. Suas funções individualizadas serão

apresentadas mais a diante, após a descrição do papel dos FLS na artrite reumatoide e espondiloartrites.

1.2 Membrana sinovial

A natureza segmentar do esqueleto, em combinação com as superfícies de cartilagem de baixo atrito, permite o movimento e a flexibilidade. A membrana sinovial ou sinóvia é o tecido que reveste as bordas do espaço articular [72] e fornece a infraestrutura que auxilia na mobilidade. A sinóvia encapsula as articulações e sua função é fornecer suporte estrutural (com uma cápsula fibrosa), lubrificar as superfícies e fornecer nutrientes para a cartilagem. O revestimento da articulação é normalmente uma membrana delicada, dividida em dois compartimentos anatômicos e funcionais: a camada de revestimento íntima e a sua subcamada. A primeira é a camada superficial que está em contato com a cavidade intra-articular e produz líquido sinovial lubrificante, tem duas a três camadas de células de profundidade e é composta por dois tipos de células em proporções relativamente iguais: células sinoviais do tipo A (macrófagos) e tipo B (fibroblastos do tipo sinoviócitos). A organização porosa do revestimento sinovial permite a difusão dos nutrientes no soro para a cartilagem avascular. As células sinoviais do tipo A, do tipo macrófago, no revestimento íntimo, expressam marcadores de origem hematopoiética mais consistentes com a linhagem monócito-macrófago e são derivados da medula óssea [73]. Elas migram para a sinóvia e se tornam células residentes, embora não se saiba ao certo se a diferenciação ocorre *in situ* ou antes da sua chegada. Seu fenótipo é semelhante a outras populações de macrófagos residentes em tecidos, incluindo CD11b, CD68, CD14, CD163, antígenos MHC classe II. Essa disposição, provavelmente contribui para o acúmulo de complexos imunes, paredes celulares bacterianas e outros materiais na articulação [74]. Os fibroblastos do tipo sinoviócitos serão descritos detalhadamente a seguir.

A sinóvia na AR transforma-se de uma estrutura relativamente acelular quiescente em um tecido invasivo, hiperplásico e repleto de células inflamatórias imunocompetentes. Como dito anteriormente, o tecido sinovial tem duas camadas: o revestimento íntimo e o subíntimo. Nesta última camada, os linfócitos T constituem 30-50% de todos os tipos de células e a maioria são células de memória CD4+. Um número menor de células T CD8+ está distribuído na sinóvia. Agregados linfoides organizados em torno das células dendríticas foliculares são observados em 15 a 20% dos pacientes [75,76]. Cerca de 5% das células sinoviais desta camada são linfócitos B e

sua osteoproliferação clonal na articulação sugere maturação dirigida por antígeno. A produção local de autoanticorpos ocorre em muitos pacientes, incluindo o fator reumatoide, anticorpos anti-peptídeos citrulinados e anticorpos anti-colágeno. Surpreendentemente, os neutrófilos são raros na sinóvia reumatoide, embora sejam abundantes em derrames sinoviais. A proliferação de vasos sanguíneos é comum devido à influência de fatores de angiogênese no ambiente inflamado e hipóxico. O revestimento íntimo da sinóvia também exibe mudanças notáveis na AR, com um aumento acentuado da celularidade. O revestimento se expande de 1 a 2 células para uma profundidade de até 10 a 20 células. A hiper celularidade é devida a um aumento nos dois tipos de células presentes nessa estrutura, a saber, células do tipo A e do tipo B [74]. Embora os estudos variem consideravelmente, muitos sugerem que as células do Tipo A predominam na AR devido a migração de novas células da medula óssea através da circulação. As células do tipo macrófago exibem um fenótipo altamente ativado e produzem citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento. Esse processo estabelece uma rede que pode perpetuar a sinovite, recrutar novas células para a articulação e contribuir para a destruição da matriz extracelular. O tecido sinovial expansivo chamado "pannus" na interface cartilagem-osso encobre a cartilagem e se erode no osso. O pannus se comporta como um tumor localmente invasivo; é composto por macrófagos, osteoclastos e FLS invasivos com relativamente poucos linfócitos [77].

1.2.1 Pannus

O termo *pannus*, do latim pano, embora seja primordialmente associado a AR, também aparece em outras doenças como as EpAs [78]. Como parte da reação do tecido sinovial, as células sinoviais em proliferação penetram na cartilagem na subcamada do *pannus* e a destruição da cartilagem ocorre na zona entre as células e a cartilagem [79-82]. Sua função é crescer sobre a superfície da cartilagem e invadir a matriz cartilaginosa [79,83-86], produzindo lesão na cartilagem. É comumente considerado como uma extensão de sinoviócitos da camada de revestimento da articulação, expandindo-se sob a influência de um processo mediado imunologicamente [87]. Quando envolve a articulação atlanto-axial pode levar à instabilidade e à lesão da medula espinhal devido à compressão da junção cérvico-medular [88].

O conceito de que a cartilagem e as estruturas de suporte da articulação são destruídas pelos FLS é sustentado por estudos em camundongos *knockout* para a caderina-11, que se desenvolvem normalmente, mas não têm revestimento interno [89,90]. Logo, é possível concluir que a caderina-

11 é um componente estrutural dos FLS, como será explicado a seguir. Esses camundongos deficientes em sinoviócitos são protegidos contra danos na cartilagem induzida por artrite, embora a inflamação e o dano ósseo progridam normalmente[91].

1.3 Caderina nos fibroblastos sinoviócitos símile

Caderinas são glicoproteínas de membrana que mediam a adesão entre as células. Durante o desenvolvimento, tem um papel importante na classificação das células como parte do processo de morfogênese tecidual. Depois, são necessárias para a manutenção da arquitetura sólida do tecido e sua integridade [92]. Há várias subfamílias dessa glicoproteína, mas o nosso interesse será na caderina-11 do tipo II, pois esse subtipo media a adesão hemofílica célula a célula, está envolvida na classificação celular durante o desenvolvimento e na integridade celular de conexões em tecidos sólidos[93,94]. *In vitro*, quando as células expressam seus diferentes tipos misturados, elas se agregam ou se ordenam separadamente em uma maneira caderina-específica. Esse processo permite que estas desempenhem um papel importante na morfogênese tecidual durante o desenvolvimento, onde são expressas por células de maneira espaço-temporal. Portanto, sua expressão e função apropriadas são necessárias para o desenvolvimento normal dos tecidos [95].

A caderina 11 do tipo II foi identificada primeiro em uma linhagem celular osteoblástica de camundongos. Nesse estudo, verificou-se que camundongos na ausência de caderina-11 (CDH-11) funcional tinham a densidade óssea reduzida em algumas partes do esqueleto[96]. O padrão de expressão dessa proteína é amplamente restrito a células de tecidos mesenquimais[97-101].

Um estudo mostrou maior expressão da CDH-11 em fibroblastos do revestimento sinovial em relação às células ocasionais da subcamada sinovial da sinóvia da AR [102]. Nenhuma célula reativa para essa glicoproteína foi detectada em diversos outros tipos de tecidos, sugerindo que a sua expressão é seletiva [103]. A expressão de CDH-11 em fibroblastos sinoviais nos cânceres de origem epitelial pode representar uma transição do tecido epitelial para o tecido mesenquimal em tais células cancerígenas [103-106]. Neste caso algumas células epiteliais do câncer que a expressam estão correlacionadas com um fenótipo mais invasivo e maior risco de metástase. Esse subtipo 11 é primordialmente expresso pelo revestimento fibroblástico sinovial e osteoclastos, mas também pode ser encontrado em outros tecidos em baixos níveis[107]. Devido a esta especificidade, a expressão de CDH-11 foi analisada nas células desse estudo como forma de

garantir que as células utilizadas nos ensaios fossem realmente fibroblastos sinoviais uma vez que essa é uma molécula de adesão específica destas células e desempenha um papel fundamental na agregação homotípica de FLS *in vitro* e *in vivo* [108].

1.4 Fibroblasts like sinovocytes (fibroblastos do tipo sinoviócitos)

Os mecanismos de acumulação dos *fibroblasts like sinovocytes* (FLS) no revestimento íntimo diferem das células do tipo macrófago. A origem da população de sinoviócitos em osteoproliferação é incerta, mas pode ser devido à migração de células-tronco mesenquimais da circulação ou osteoproliferação de um *pool* de células-tronco na sinóvia [108,109]. Os precursores de FLS também podem migrar para a sinóvia através dos poros do osso cortical, como foi demonstrado em camundongos com artrite induzida por colágeno [110,111]. No entanto, o crescimento dessa população é mais provável devido a um desequilíbrio entre proliferação celular, sobrevivência e morte. O ambiente sinovial na AR promove a sobrevivência dos FLS mesmo com a sinóvia reumatoide altamente genotóxica, com abundante nitrogênio reativo e oxigênio e estresse celular que normalmente leva a morte celular [112-114].

Os FLS iniciam a diferenciação dos osteoclastos e a reabsorção óssea através da interação entre o ativador do receptor do ligante NF- κ B (RANKL), que é expresso principalmente nas células FLS e T, e o receptor cognato RANK, expresso nos monócitos. A capacidade do FLS de promover a diferenciação de linfócitos B em células plasmáticas já foi demonstrada. Assim, os FLS participam da formação de um *pannus* invasivo que perpetua a destruição das articulações. Vários estudos sugerem que os FLS medeiam o dano da cartilagem e dos ossos [115-116].

A proliferação do *pannus* é multifatorial, mas dentre as diversas causas destaca-se o desequilíbrio entre a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias observada no desenvolvimento da artrite e, mais recentemente, o papel dos FLS na destruição da cartilagem articular e erosão óssea. Assim, decidimos investigar a expressão gênica das glicoproteínas (agonistas e antagonistas) da via WNT ao serem estimuladas por três das principais citocinas que sabidamente atuam sobre os FLS.

1.5 DOENÇAS

Foram analisados os fibroblastos sinoviais das amostras dos pacientes com artropatias. As artropatias neste estudo foram divididas em dois grupos: a artrite reumatoide e as espondiloartrites.

1.5.1 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica do tecido conjuntivo em que a inflamação das articulações, peri-articulações e tendões é a sua marca central [117,118]. Os sintomas articulares típicos encontrados são dor, rigidez e edema nas articulações [119]. Por se tratar de uma doença crônica sistêmica e as manifestações articulares lhe sejam típicas, muitos órgãos também podem ser afetados [120]. Na AR observa-se, desde a fase pré-articular, perda da auto tolerância e consequente autoimunidade caracterizadas por ativação linfocitária e produção de auto anticorpos. As manifestações articulares caracterizam-se pelo desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias e recrutamento articular de macrófagos, neutrófilos, células T, B e *natural killers*, além da ativação de fibroblastos, osteoclastos e condrócitos. Os resultados histopatológicos são a destruição da cartilagem articular e a erosão óssea, mediadas por fibroblastos, condrócitos e osteoclastos. As consequências clínicas, por sua vez, se traduzem pela ocorrência das deformidades e incapacidade funcional. Apesar de muito se saber acerca de sua epidemiologia e aspectos genéticos e imunológicos, a AR continua sendo uma doença de causa desconhecida, com a patogênese complexa e multifatorial (fatores genéticos, hormonais e ambientais) [121].

Sua incidência e prevalência apresentam as seguintes variações:

- Europa e Estado Unidos a incidência é de cerca de 0,5% a 1% da população caucasiana, com taxas menores entre os descendentes de asiáticos e africanos[122];
- Brasil, estudo multicêntrico em amostras populacionais das macrorregiões, encontrou a incidência de até 1% na população adulta[123].

Na América Latina, estudos mostram que a idade média de início da doença é de 40 anos, ocorre com mais frequentemente entre os 30 e 50 anos de idade[124]. Acomete ambos os sexos, mas há um predomínio do sexo feminino (3:1). Na Europa e nos EUA-Estados Unidos[125] e na América Latina tal proporção foi estimada em cerca de 8 mulheres para cada homem[126]. A prevalência da enfermidade é de 2 a 10 vezes maior entre os parentes de primeiro grau de pacientes com AR, embora a doença seja poligênica e não siga um padrão mendeliano[127]. A AR é considerada uma doença multifatorial, resultando da interação de fatores genéticos e ambientais, como o tabagismo, por exemplo[128].

A AR exerce um impacto significativo sobre os pacientes e a sociedade como um todo devido a sua morbidade, mortalidade, efeitos adversos na qualidade de vida e custos econômicos.

Esse aumento da mortalidade é observado quando se comparam pacientes portadores de AR com a população geral, havendo redução da expectativa de vida em 3 a 10 anos [127]. A AR por si só já constitui um fator de risco para a mortalidade precoce e muitas vezes está ainda associada a maior risco de morte devido a associação a doenças cardiovasculares (DCV) [129]. Essa associação observada com as DCV pode ser considerada a principal causa de mortalidade na população com AR, sendo responsável pela metade das mortes observadas em coortes internacionais [127,129].

1.5.2 Espondiloartrites

O termo espondondiloartrite (EpA) abrange um grupo inter-relacionado de doenças que apresentam peculiaridades epidemiológicas, clínicas, anatomopatológicas, radiográficas e imunogenéticas que permitiram historicamente sua caracterização como um grupo de enfermidades. Compõe esse grupo a espondilite anquilosante (EA), considerada o protótipo do grupo; a artrite psoriásica (AP); a artrite reativa; a artrite das doenças inflamatórias intestinais (Doença de Crohn e retocolite ulcerativa), dentre outras.

Estas doenças apresentam as seguintes características comuns:

- Acometimento preferencial das articulações sacroiliacas (sacroiliite) e da coluna vertebral (espondilite), especialmente, a coluna lombar.
- Ocorrência da artrite periférica, com frequência assimétrica, na qual há predomínio da oligoartrite de grandes articulações, em especial dos membros inferiores.
- Frequente participação do processo inflamatório ao nível das enteses, que são sítios constituídos de um tecido de transição composto por fibrocartilagem ou tecido conjuntivo fibroso. Essa inflamação costuma não se limitar ao tecido conjuntivo da entese, envolvendo também cartilagem e osso adjacentes e resultando em periostite e osteíte, por vezes erosiva e com neoformação óssea, chamada entesófito[130-131]. Nas entesites dos discos intervertebrais e ligamentos da coluna, pode haver erosões nas bordas vertebrais, e as formações ósseas nesta localização são chamadas sindesmófitos[132].

- Negatividade para a pesquisa do fator reumatoide (FR) e ausência de nódulos reumatoides subcutâneos.
- Associação a HLA-B27, uma molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I.

Os pacientes com EA podem, em algumas casuísticas, como em brancos do norte da Europa, apresentar 80% a 90% de positividade para HLA-B27 [133]. Em outros grupos étnicos, como os africanos, mais da metade dos pacientes com EA é HLA-B27 negativa. Um estudo realizado pelo serviço de reumatologia do hospital das clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), evidenciou uma positividade de 64% para o HLA-B27 em indivíduos [134]. Também em um estudo no Recife, foi encontrado 66% de positividade em indivíduos com EA [135] e, em São Paulo, na cidade de Campinas, estudo encontrou uma positividade de 78,2% entre os pacientes com EA [136].

A prevalência geral das EpA`s tem grande variação, podendo oscilar entre 0,2% no sudeste da Ásia a 1,6% nas comunidades do norte do Ártico e de 0,01% no Oriente Médio para 0,19% na Europa [137].

1.5.2.1 Espondilite Anquilosante

A espondilite anquilosante (EA) é uma artrite inflamatória crônica imuno-mediada, debilitante da coluna espinhal que se manifesta antes dos 40 anos de idade, tem a predominância masculina e uma prevalência de aproximadamente 0,5% nos EUA[138,139]. Essa doença envolve tanto a osteopenia erosiva inflamatória quanto o crescimento ósseo incomum[140]. Suas manifestações extra axiais incluem uveíte aguda, artrite periférica, entesite, psoríase, inflamação na raiz da aorta e no intestino[141]. Na coluna vertebral, a formação de pontes entre sindesmófitos nas vértebras resulta na icônica "espinha de bambu". Do ponto de vista do paciente, os anos de dor e a postura rígida, inclinada e projeção da cabeça para a frente incorrem em incapacidade e custos econômicos significativos [142]. Devido à natureza insidiosamente progressiva da EA, o atraso entre o início dos sintomas e o diagnóstico é de 8 a 10 anos [143]. Ironicamente, os medicamentos atuais mais eficazes, a classe de agentes biológicos que bloqueiam o TNF- α , são melhor administrados no início da doença quando a intensidade da resposta inflamatória é maior [140].

O alelo HLA-B27 é conhecido por ter uma forte associação com a doença; no entanto, outros genes participam do seu desenvolvimento [144]. A descoberta de várias vias de sinalização inflamatórias proporcionou a descoberta e desenvolvimento de terapias biológicas, o que acarretou uma revolução no tratamento e prognóstico da EA. Os inibidores do fator de necrose tumoral (TNFs) foram os primeiros a serem aprovados para uso clínico, mas nos últimos anos o eixo da interleucina-17/IL-23 ganhou também relevância, culminando na licença de novos fármacos bDMARDs bloqueadores da IL-17. Apesar de todos esses avanços nem todos os pacientes com EA respondem aos inibidores de TNF. Em grandes estudos multicêntricos de fase III, as taxas de resposta do ASAS20 ($\geq 20\%$ em três dos quatro domínios de avaliação) são da ordem apenas de 60% [137, 145]. Os mecanismos da doença não são totalmente compreendidos e novas informações sobre a patogênese da doença e seus gatilhos bem como propostas de novos tratamentos continuam sendo publicados [146].

1.5.2.2 Artrite Psoriásica

A artrite psoriásica (AP) é uma doença inflamatória das membranas sinoviais associada à psoríase cutânea que acomete o esqueleto axial e periférico [147,148]. É caracterizada pela vascularização local aumentada e infiltração de células imunes [149-152] e também pela ocorrência de destruição óssea e cartilaginosa com nova formação óssea patológica [153]. Afeta homens e mulheres quase igualmente entre as idades de 40 e 50 anos [154] e a prevalência varia consideravelmente dependendo da definição usada [155]:

- Estudo que examinou a incidência cumulativa de AP ao longo do tempo em pacientes com psoríase e relatou que 1,7%, 3,1% e 5,1%, respectivamente, desenvolveram AP em 5, 10 e 20 anos após o diagnóstico de psoríase em Rochester, Minnesota, EUA.
- Outro estudo na América do Norte relatou uma incidência de 1,87% em uma coorte prospectiva de 313 pacientes com psoríase em Toronto, Ontário, CANADÁ.

No esqueleto axial, suas alterações associadas incluem sacroiliíte unilateral e sindesmófitos paramarginais e verticais volumosos (em contraste, na EA, o envolvimento sacroilíaco é geralmente bilateral e os sindesmófitos paramarginais são incomuns) [156].

A AP em geral permanece mal definida devido às suas variadas características clínicas. Muitos estudos de AP têm focado na pele e nas articulações; no entanto, nos últimos 10 anos, importantes

avanços concentraram-se nas entesites embora em qual tecido a doença comece provavelmente varia entre indivíduos [157].

1.6 Citocinas

Citocinas são polipeptídeos hidrossolúveis ou glicoproteínas envolvidas em quase todos os processos biológicos como o crescimento, diferenciação, ativação celular e inflamação [115]. Possuem, portanto, um papel relevante nas doenças autoimunes como a AR, EA e AP nas quais estão associadas à inflamação crônica [158]. Produzidas no local da lesão, por vários tipos de células do sistema imunológico ou residentes do tecido, atuam nas células vizinhas e nas células produtoras [115,158]. São redundantes em suas atividades, ou seja, ações semelhantes podem ser desencadeadas por diferentes moléculas e diferentes tipos de células secretam a mesma molécula.

Frequentemente formadas em cascata (uma molécula estimula suas células-alvo a produzir mais [159]) ligam-se a receptores específicos, ativando mensageiros intracelulares que regulam a transcrição de genes. Portanto, influenciam a atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência das células imunológicas, além de regular a produção e a atividade de outras moléculas que podem aumentar (pró-inflamatória Th1) ou diminuir (anti-inflamatória Th2) a resposta inflamatória de acordo com o microambiente em que estão localizadas [160].

Modulam criticamente as interações celulares que caracterizam a inflamação crônica e contribuem em todas as fases do desenvolvimento da lesão inflamatória em equilíbrio dinâmico. Inflamação crônica na doença reumática geralmente contém atividades de citocinas remanescente de respostas imunes inatas e adquiridas[161].

Neste estudo os fibroblastos foram estimulados por citocinas com o objetivo de verificar se este estímulo induziria o aumento ou diminuição da expressão gênica de agonistas e antagonistas da via WNT. Atualmente existem como opção terapêutica os inibidores de TNF-alfa e os anticorpos inibidores de IL-17A que agem bloqueando seus efeitos no organismo humano e consequentemente a ativação das vias de sinalização [162]. Para tentar contribuir com a investigação do efeito das citocinas na patogênese das doenças estudadas, nesse trabalho foram usadas as seguintes citocinas: interleucina 17 (IL-17), interleucina 22 (IL-22) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α).

Na tabela abaixo podemos verificar como cada citocina atua com foco nas artropatias. Para melhor entendimento, as artropatias foram divididas em artrite reumatoide (AR) e espondiloartrites (EPA-espondilite anquilosante e artrite psoriásica):

Tabela 1: Atuação das citocinas em relação ao grupo de doenças estudadas (AR e EPAs)

Citocina	Função	Relação com as doenças
IL-17	IL-17 atua na função de barreira e propaga a resposta inflamatória; inibe a sinalização da via Wnt, inibindo a atividade dos osteoblastos indiretamente os estimulando a produzir RANKL o que resulta em osteoclastogênese [163-166]	<p><u>Grupo AR:</u> função pró-inflamatória, pois estudos pré-clínicos indicaram que a IL-17 promove a reabsorção óssea na artrite experimental [167-170]</p> <p><u>Grupo EpAs:</u> Estudos pré-clínicos mostraram que na psoríase houve supressão de atividade da doença com o uso de supressores de IL-17. Em outras situações de inflamação a mesma inibição não se mostrou benéfica.</p> <p>[171-175].</p>
IL-22	Citocina pró-inflamatória presente no local da erosão óssea, também promove a função osteoblástica ao regular a expressão dos fatores pró-osteogênicos e proteína óssea morfogênica [176-178].	<p><u>Grupo AR:</u> contribui com a erosão óssea [179].</p> <p><u>Grupo EpAs:</u> promove a função osteoblástica [178].</p>

TNF- α	Atua como principal citocina inflamatória, possuindo papéis críticos na apoptose, proliferação celular e resposta imune. Pode ser pró ou anti-inflamatória dependendo de qual receptor está ligada (pró inflamatória TNF-RI ou anti-inflamatória TNF-RII) [180-182].	<u>Grupo AR:</u> Induz a inflamação local e formação do <i>pannus</i> [183,184] <u>Grupo EpAs:</u> promove a proliferação celular [180-182]
---------------	--	--

As citocinas foram usadas para estimular os FLS *in vitro* e, a seguir, realizamos a quantificação da expressão de genes agonistas e antagonistas da via WNT listados na Tabela 2. Abaixo apresentamos a tabela dos principais genes antagonistas e agonistas da via WNT com seus respectivos efeitos:

Tabela 2: Antagonistas e agonistas da via WNT

Antagonista Wnt	Efeito
DKK1	Papel fundamental na ativação e inibição de osteoblastos e erosão óssea[175]; gene alvo de WNT- β -catenina e atua por um mecanismo que não envolve interação com WNT, mas é mediado por sua interação direta com LRP5/6 [175].
FRZB [sFRP3]	Desempenha importante função na morfogênese óssea[175]
sFRP1(atua sobre a via canônica)	Regula a diferenciação de osteoblastos/osteócitos, proliferação, função e apoptose através da inibição de WNT /sinalização de β -catenina, bem como osteoclastogênese induzida por osteoblastos, ligando-se ao RANK [176].
sFRP2 (atua sobre a via canônica)	Sua expressão foi encontrada em células-tronco mesenquimais e nos últimos estágios da diferenciação dos osteoblastos [176].
sFRP4	Sua expressão aumentada tem uma influência negativa no pico da densidade mineral óssea[177, 178].

WIF1	Ligado a todas as etapas do desenvolvimento da cartilagem [179].
Agonista Wnt	Efeito
RSPO1	Promove a osteogênese ao ativar a via de sinalização da WNT/ β -catenina e resgatar a perda óssea [180-182]
WNT-1(canônico)	Sua expressão foi encontrada em células da linhagem B, em células progenitoras hematopoiéticas e também em um subconjunto de osteócitos. Pesquisadores especulam que as células hematopoiéticas têm um papel na regulação da formação óssea e que esse gene desempenha um papel associado à via de sinalização[183].
WNT-3A (não- canônico)	Em estudo pré-clínico de 2016 esse gene inibiu a formação de osteoclastos através da expressão de OPG regulada positivamente em osteoblastos [184,185].
WNT-5A (não- canônico)	Estudos sugerem que WNT-5A exerce seu efeito no metabolismo ósseo principalmente através da sinalização não-canônica de WNT, mas ainda é necessário determinar se <i>in vivo</i> o WNT5A é capaz de ativar a sinalização WNT / b-catenina em condições fisiológicas[186,187].
WNT-9A	Está envolvida na manutenção das articulações[188] e sua expressão foi regulada negativamente durante a diferenciação de células-tronco mesenquimais em adipócitos[189,190].
WNT-10B	Função importante na regulação e diferenciação de células precursoras mesenquimais em osteoblastos ou adipócitos [191].

WNT-11 (efeito canônico e não canônico)	Expresso em células-tronco mesenquimais humanas e sua expressão aumentou durante a diferenciação osteogênica o que indica que ele tenha um papel potencial na diferenciação de osteoblastos[192,193].
--	---

2.0 JUSTIFICATIVA

Essa dissertação é a segunda parte do estudo que teve início com a dissertação de mestrado intitulada “**Expressão de moduladores da via Wnt por sinoviócitos fibroblasto símile de pessoas com doenças articulares inflamatórias**”, de Gustavo Gomes Resende, em 2016 [194]. Neste estudo piloto, cultivou-se fibroblastos sinoviais que foram estimulados com as seguintes citocinas: TNF- α , IL-17 e IL-22. O objetivo foi construir uma curva dose-resposta para identificar qual o binômio dose e tempo de coleta do sobrenadante dessas culturas que melhor reconhecesse possíveis diferenças existentes no efeito de cada estímulo pró-inflamatório na expressão das proteínas de interesse. Essa curva dose-resposta serviu de referência para esse presente estudo, uma vez que as concentrações, bem como o tempo dos estímulos usados, foram definidas anteriormente.

A ausência de dados na literatura sobre a via Wnt que contemple a expressão gênica de mais de um gene ao mesmo tempo, assim como genes agonistas e antagonistas, foi a principal motivação desse estudo. Há também uma insuficiência de dados quantificando a expressão gênica desse grupo de genes após estímulo por citocinas e, também, uma carência de estudos comparando grupos de doenças ósseas de fisiopatologias antagônicas onde componentes da via Wnt podem exercer um papel relevante na patogenia. Dessa forma, esse estudo possui um componente inédito ao tentar responder a todas essas questões em um mesmo trabalho.

Além disso, devido a necessidade de se conhecer mais profundamente os mecanismos que levam ao dano e à consequente remodelação estrutural articular buscamos contribuir para encontrar preditores adequados para determinar os subgrupos de risco elevado para a progressão mais acelerada da doença. Assim almejamos contribuir também na identificação de novos alvos terapêuticos nestas doenças, que tem como mecanismo de lesão a proliferação óssea e ainda não possuem fármacos eficazes disponíveis. Por isso estudamos a ativação de genes da via WNT em

FLS, mensurando a expressão de agonistas e antagonistas, pois estudos têm mostrado que esta via possui um papel na patogenia dessas doenças articulares.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar a expressão gênica de inibidores e ativadores da via Wnt em células *ex-vivo* de sinoviócitos de pacientes afetados por diferentes doenças articulares.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a expressão gênica das células *ex-vivo* nas diferentes doenças ao estimular os sinoviócitos com as citocinas IL-17, IL-22 e TNF-alfa.
- Analisar e comparar as expressões gênicas nos dois grupos de doenças: artrite reumatoide e espondiloartites (espondilite anquilosante e artrite psoriásica).

4.0 MÉTODOS

4.1 Cultura celular

Não foi feito um cálculo amostral devido à dificuldade de obtenção da amostra *ex-vivo* bem como as dificuldades inerentes da cultura *ex-vivo* como, por exemplo, complicações com a contaminação celular. Dessa forma, e contando com esses obstáculos foram cultivadas amostras de sete pacientes sendo dois acometidos por artrite psoriásica, quatro por artrite reumatoide e um por espondilite anquilosante em condições definidas:

- para a AR são segundo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1987;
- para as EPAs são segundo o Grupo Europeu de Estudos das Espondiloartrites (GEEE) de 1991. Mais recentemente foram definidos os critérios pela Assessment of Spondyloarthritis International Society (ASAS) em 2009 para a espondilite axial e em 2011, para a espondilite periférica.

Estes pacientes estavam em acompanhamento no Ambulatório de Artrite reumatoide e de espondiloartrites do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG, no Ambulatório Bias Fortes, 2º andar, e que tiveram indicação de serem submetidos à artrocentese (de tornozelos, joelhos, punhos ou cotovelos) segundo avaliação clínica, independentemente de seu tratamento sistêmico. Por se tratar de um estudo inédito, todas as amostras viáveis, ou seja, as que o cultivo atingiu o número necessário de células, foram consideradas. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG- COEP em 02 de outubro de 2013, número CAAP16196813.3.0000.5149, em anexo ao final do trabalho. A coleta de líquido sinovial foi realizada no Ambulatório de Espondiloartrites do Hospital das Clínicas da UFMG. A artrocentese foi realizada, após a anestesia local com lidocaína 1% sem vasoconstritor, obedecendo-se às técnicas de antisepsia com agulha (18-22G), em seringa heparinizada (solução 5000 UI/ml) até o máximo esvaziamento articular possível (para maior alívio do paciente). O líquido foi transportado imediatamente em tubos de ensaio (tubo Falcon 50 ml heparinizado) para o Laboratório Lineu Freire-Maia (LabLFM) na Faculdade de Medicina da UFMG. No LabLFM as amostras foram diluídas em meio de cultura estéril DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Gibco, n° cat.12800-017) e centrifugadas a 1200 rotações por minuto (rpm) durante 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi armazenado para o cultivo de fibroblastos sendo congelado com meio de cultura composto por

70% de soro fetal bovino-SFB (Fetal Bovine Serum, Sigma n° cat. F-0643), 22% de DMEM e 8% de DMSO (dimetilsulfóxido) em criotubos (Nalgene general long-term storage cryogenic tubes-Thermo Fisher Scientific, n° cat.500-1020) de 1,5 ml. As células foram acondicionadas em criotubos, onde permaneceram por cerca de 24 horas à -20°C e posteriormente foram transferidas para o nitrogênio líquido (-196°C).

4.2 Cultivo celular

Para serem utilizadas as amostras foram descongeladas de forma gradual em gelo, onde foram transferidas para tubos de 15 ml com meio DMEM enriquecido com 10% de SFB, 1% de solução antibiótica de estreptomicina/penicilina/anfotericina B (Gibco, n° cat. 15245-012) e 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco, n° cat. 11140-050). Toda a manipulação foi feita em capela de fluxo laminar (VECO) empregando-se técnica asséptica.

As células de fibroblasto então descongeladas foram alocadas em garrafas grandes de cultivo celular (cerca de 8 a 10 ml de meio em 25 cm² de área de crescimento celular) contendo meio DMEM enriquecido a 10% de SFB, 1% de solução antibiótica e 1% de aminoácidos não essenciais e transferidas para a estufa de cultura de células mantida a 37°C e com 5% de CO₂. As trocas de meio de cultura foram realizadas em capela de fluxo laminar previamente limpa a cada três dias e sempre que se detectou alteração no pH (avaliado pela mudança da cor do meio). Quando as culturas atingiram a confluência, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino PBS e foram submetidas à remoção enzimática com solução de tripsina a 0,05 % em EDTA 0,02 % (Trypsin-EDTA, Gibco n° cat. 25300-062). As culturas foram constantemente avaliadas por microscopia invertida para avaliação de seu crescimento e de sua morfologia celular bem como a averiguação de seu possível estado de contaminação. Para todos os experimentos, foram utilizadas culturas até a 9ª passagem.

Após atingirem a confluência máxima e/ou o tempo máximo de cultivo, as células foram lavadas com solução de PBS por duas vezes e removidas enzimaticamente com 6 ml de solução de tripsina a 0,05 % em EDTA 0,02 %. Após a adição da solução de tripsina, que agiu por no máximo 8 min, o conteúdo das garrafas de cultivo foi neutralizado ao se adicionar três vezes o volume de solução de PBS estéril a cada garrafa. Esse conteúdo foi transferido utilizando-se pipeta estéril de 25 ml (Nunc, n° cat. 170357) para um tubo Falcon de 50 ml (Nunc, n° cat. 339650) e foi centrifugado a

2000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e os fibroblastos semeados em quantidades iguais, após contagem manual em câmara de Neubauer feita da seguinte forma:

- Foi feita uma diluição em que 10 ul do precipitado da amostra foi adicionado a 90 ul de solução de azul de tripan foi homogeneizada em seguida. Depois de homogeneizada, essa solução teve 10 ul de seu volume transferido para a câmara de Neubauer, onde as células foram contadas com o auxílio do microscópio óptico em aumento de 40x.
- Calculou-se um média do número de células nos 4 quadrantes contados e em seguida este número foi multiplicado pelo fator de diluição, nesse caso 10. Finalmente, o número era multiplicado por 10.000, que é o fator de correção da câmara por ml. O número encontrado era o valor estimado da quantidade de células/ml.

4.3 Plaqueamento e estímulo celular

O precipitado foi dividido de forma igualitária entre cada um dos 4 poços usados da placa de 6 poços (Kasvi, n° cat. K12-006) em que foi acondicionado juntamente com 2 ml de meio de cultura DMEM a 10% de SFB, 1% de solução antibiótica e 1% de aminoácidos não essenciais e mantida por 24h, nas mesmas condições de cultivo. Após as 24h, o meio foi cuidadosamente retirado e descartado, em capela de fluxo laminar e cada poço de cultivo foi lavado por duas vezes com o meio DMEM enriquecido a 1% de SFB. O primeiro poço recebeu 2 ml de meio DMEM a 1% de SFB, o segundo recebeu 2 ml do meio DMEM a 1% de SFB e 10 ng/ml de citocina IL-17, o terceiro recebeu 2 ml do meio DMEM a 1% de SFB e 1 ng/ml de citocina IL-22 e o quarto recebeu 2 ml do meio DMEM a 1% de SFB e 10 ng/ml de TNF- α . As culturas foram mantidas com os estímulos por 24h. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e congelado a -80° C. As células foram extraídas enzimaticamente com 500 ul de solução de tripsina a 0,05 % em EDTA 0,02 %. Após a adição da solução de tripsina, que agiu por no máximo 5 min, o conteúdo das garrafas de cultivo foi neutralizado ao se adicionar três vezes o volume de solução de PBS estéril a cada poço. Esse conteúdo foi transferido utilizando-se pipeta estéril para um falcon de 15 ml (Sarstedt n° cat. 62.554.502), centrifugado a 2000 RPM por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi congelado a -80° C por algumas semanas.

4.4 Extração de RNA

As extrações de RNA das amostras congeladas foram realizadas empregando-se o kit de extrações de RNA RNeasy® mini-kit (Qiagen, n° cat.74104). Para a execução de todas as etapas foram seguidas as recomendações do fabricante e foram utilizadas todas as soluções disponíveis no *kit*. De acordo com as contagens prévias sabia-se que a quantidade de células por poço era em torno de 2 milhões por isso, seguindo recomendações do fabricante, adicionou-se 350 ul da solução de lise (com volume de 1% de solução de β -mercaptoetanol) a cada *pellet* de amostra previamente descongelada no Falcon de 15 ml. A seguir cada amostra foi centrifugada por 3 min na velocidade de 8000 G e recebeu 350 ul de etanol a 70%. Os sobrenadantes (cerca de 700 ul) foram coletados e adicionado às colunas (que são suportes disponíveis no *kit*), centrifugados novamente por 1 min à velocidade de 9000 G. O filtrado foi descartado e a cada amostra foi adicionada 500 ul da solução de lavagem, onde foi centrifugada novamente por 1 min a 9000 G. Essa etapa de lavagem se repetiu por mais 2 vezes, com a adição de 500 ul da solução 2 de lavagem, sendo que a última centrifugação foi por 2 min a 9000 G. O tubo coletor foi então trocado e cada cartucho foi centrifugado para promover a secagem da membrana. Em seguida, a cada amostra foi adicionado 25 ul de água RNase-free que foi centrifugada a 9000 G por 1 min para a eluição do RNA. Ao final, o RNA total eluído de cada amostra foi alíquotado e posteriormente quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 2000c (Thermo-Fisher, Wilmington, DE, USA), utilizando a relação 260/280 (índice de absorvância variando de 1,6 a 2,1) e 260/230 (índice de absorvância variando de 1,9 a 2,4). Todos os RNAs extraídos foram armazenados em freezer -80°C até a realização dos procedimentos de transcrição reversa.

4.5 Transcrição reversa

Utilizou-se o *kit* Superscript® III (Invitrogen, n° cat.18080-051) para realizar a síntese de DNA complementar cDNA). As etapas foram seguidas de acordo com a recomendação do fabricante. Em padronizações anteriores ficou estabelecido que em todas as amostras seria usada a concentração padrão de 20 ng por poço da placa de qPCR, por isso, de acordo com as quantificações no NanoDrop, convencionou-se a utilização de 8 ul de cada amostra (variando em quantidade de amostra mais água RNase-free ou apenas amostra de acordo com a quantificação prévia realizada). A cada tubo cônico contendo 8 ul amostral foi adicionado 1 ul de random- primer e 1 ul de mM dNTP mix e cada tudo foi incubado por 5 min a 65° C depois colocado em gelo por 3 min. Após

G	SFRP4	WIF1	SFRP4	WIF1	SFRP4	WIF1	SFRP4	WIF1	SFRP4	WIF1	SFRP4	WIF1
H	GAPDH	CDH11	GAPDH	CDH11	GAPDH	CDH11	GAPDH	CDH11	GAPDH	CDH11	GAPDH	CDH11

Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata com dois controles para todos os genes (18S e GAPDH) e as condições de reação foram previamente determinadas em padronizações anteriores nas mesmas condições do experimento: 50°C por 2 min, 95°C por 2 min., 40 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 1 min.

Para a reação, foi adicionada a cada poço 2 ul de amostra de cDNA, 8 ul de água RNase-free e 10 ul de TaqMa®n Universal Master Mix II (Applied Biosystems, n° cat.4440040) e as placas foram colocadas no aparelho 7500™ Real Time PCR Systems, nas mesmas condições e cada reação durou em torno de 2h.

A expressão relativa ótima de cada gene foi estabelecida por mim através da normalização do qPCR em relação ao gene endógeno GAPDH, pois foi o gene para os quais se obtiveram os menores índices de variações para as amostras testadas. O GAPDH é frequentemente usado como controle endógeno para qPCR porque, em alguns sistemas experimentais, sua expressão é constante em tempos diferentes e após a manipulação experimental. O modelo escolhido utilizado foi o da avaliação da expressão relativa (r) entre o gene alvo e o gene endógeno através da diferença entre os valores de Ct do gene endógeno e dos valores de Ct do gene alvo ($\Delta Ct = Ct$ do gene alvo – média dos Cts dos genes endógenos) desconsiderando a correção da eficiência[195].

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Nusse R., et al. *A new nomenclature for int-1 and related genes: The Wnt gene family*. Cell, 1991. **64**: p. 231.
- 2- Niehrs e Acebron. *Mitotic and mitogenic Wnt signalling*. EMBO J, 2012. **31**: p. 2705-2713.
- 3- Nusse R, Clevers H. *Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities*. Cell, 2017. **169**(6): p. 985-999.
- 4- Logan Cy, Nusse R. *The Wnt signaling pathway in development and disease*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p.781-810.
- 5- Maeda K, et al. *The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling*. Int J Mol Sci. 20(22):p.5525, 2019.
- 6- Komiya Y., Habas R. *Wnt signal transduction pathways*. Organogenesis, 2008. **4**: p.68–75.
- 7- Kahn M. *Can we safely target the WNT pathway?* Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(7):513-32.
- 8- Duan P, Bonewald LF. *The role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth*. Int J Biochem Cell Biol, 2016. **77**(Pt A):p.23-29.
- 9- Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, et al. *The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling*. Int J Mol Sci. 2019. **20**(22):p.5525.
- 10- Coates LC, Helliwell PS. *Psoriatic arthritis: state of the art review*. Clin Med, 2017. **17**(1):p. 65-70.
- 11- Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB, *Rheumatoid Arthritis*. The Lancet, **388**(10055): p. 2023-2038.
- 12- Kestler HA, Kuhl M. *From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2008. **363**: p. 1333–1347.
- 13- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, et al. *Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism*. Cell, 2002. **108**: p. 837–847.
- 14- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, et al. *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**:p.140–D144.
- 15- Keller, KC et al. *Wnt5a Supports Osteogenic Lineage Decisions in Embryonic Stem Cells*. Stem cells and development, 2016. **25**(13): p.1020-32.
- 16- Olson LE, Tollkuhn J, Scafoglio C, et al. *Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination*. Cell, 2006. **125**: p. 593–605.
- 17- Karner, CM, Fanxin L. *Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts*. Cellular and molecular life sciences CMLS 2017. **74**(9): p. 1649-1657.
- 18- Takao Y, Yokota T, Koide H. *Beta-catenin up-regulates Nanog expression through interaction with Oct-3/4 in embryonic stem cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **353**: p. 699–705.
- 19- Kioussi C, et al. *Identification of a Wnt/Dvl/beta-Catenin \rightarrow Pitx2 pathway mediating cell-type-specific proliferation during development*. Cell, 2002. **111**: p. 673–685.
- 20- Bullions LC, Levine AJ. *The role of beta-catenin in cell adhesion, signal transduction, and cancer*. Curr Opin Oncol, 1998. **10**: p. 81–87.
- 21- Heuberger J, Birchmeier W. *Interplay of cadherin-mediated cell adhesion and canonical Wnt signaling*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**: p. 2915.
- 22- Daugherty RL, Gottardi CJ. *Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions*. Physiology (Bethesda), 2007. **22**: p. 303–309.

- 23- Kuhl M, et al. *The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape*. Trends Genet, 2000. **16**: p. 279–283.
- 24- Tu X, et al. *Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation*. Dev Cell, 2007. **12**: p. 113–127.
- 25- He X, et al. *A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A*. Science, 1997. **275**: p. 1652–1654.
- 26- Tao Q, et al. *Maternal Wnt11 activates the canonical Wnt signaling pathway required for axis formation in Xenopus embryos*. Cell, 2005. **120**: p. 857–871.
- 27- Cha SW, et al. *Wnt5a and Wnt11 interact in a maternal Dkk1-regulated fashion to activate both canonical and non-canonical signaling in Xenopus axis formation*. Development, 2008. **135**: p. 3719–3729.
- 28- Cha SW, et al. *Wnt11/5a complex formation caused by tyrosine sulfation increases canonical signaling activity*. Curr Biol, 2009. **19**: p. 1573–1580.
- 29- Ye X, Wang Y, et al. *Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization*. Cell, 2009. **139**: p. 285–298.
- 30- Robitaille J, et al. *Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy*. Nat Genet, 2002. **32**: p. 326–330.
- 31- Junge HJ, et al. *TSPAN12 regulates retinal vascular development by promoting Norrin- but not Wnt-induced FZD4/beta-catenin signaling*. Cell, 2009. **139**: p. 299–311.
- 32- Carron C, et al. *Frizzled receptor dimerization is sufficient to activate the Wnt/beta-catenin pathway*. J Cell Sci, 2003. **116**: p. 2541–2550.
- 33- Kaykas A, et al. *Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization*. Nat Cell Biol, 2004. **6**: 52–58.
- 34- Rao TP, Kuhl M. *An update review on WNT signaling pathway*. Circulation research, 2010. **106**(12): p. 1798-1806.
- 35- Davidson G, Wu W, Shen J, et al. *Casein kinase 1 gamma couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction*. Nature, 2005. **438**(7069):p. 867-872.
- 36- Davidson G, et al. *Cell cycle control of Wnt receptor activation*. Dev Cell, 2009. **17**: p. 788–799.
- 37- Bahmanyar S, et al. *Beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation*. Genes Dev, 2008. **22**: p. 91–105.
- 38- Pan W, et al. *Wnt3a-mediated formation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates LRP6 phosphorylation*. Science, 2008. **321**:p.1350–1353.
- 39- Chen M, et al. *Protein-coupled receptor kinases phosphorylate LRP6 in the Wnt pathway*. J Biol Chem, 2009. **284**: p.35040–35048.
- 40- Bryja V, et al. *The extracellular domain of Lrp5/6 inhibits noncanonical Wnt signaling in vivo*. Mol Biol Cell, 2009. **20**: p. 924–936.
-
- 41- Tahinci E, et al. *Lrp6 is required for convergent extension during Xenopus gastrulation*. Development, 2007. **134**: p. 4095–4106.
- 42- Slusarski DC, Corces VG, Moon RT. *Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling*. Nature, 1997. **390**:p.410–413.
- 43- Kuhl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT. *Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in Xenopus*. J Biol Chem, 2000. **275**: p.12701–12711.
- 44- Penzo-Mendez A, et al. *Activation of Gbetagamma signaling downstream of Wnt-11/Xfz7 regulates Cdc42 activity during Xenopus gastrulation*. Dev Biol, 2003. **257**: p. 302–314

- 45- Liu X, et al. *Activation of a frizzled-2/beta-adrenergic receptor chimera promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via Galphao and Galphat.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1999. **96**: p. 14383–14388.
- 46- Liu T, et al. *Activation of rat frizzled-1 promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via pathways that require Galpha(q) and Galpha(o) function.* **J Biol Chem**, 1999. **274**:p.33539–33544.
-
- 47- Liu X, Rubin JS, Kimmel AR. *Rapid, Wnt-induced changes in GSK3beta associations that regulate beta-catenin stabilization are mediated by Galpha proteins.* **Curr Biol**, 2005. **15**: p.1989–1997.
- 48- Angers S, et al. *The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation.* **Nat Cell Biol**, 2006. **8**: p. 348–357.
- 49- Katanaev VL, et al. *Trimeric G protein-dependent frizzled signaling in Drosophila.* **Cell**, 2005. **120**: p. 111–122.
- 50- Cruciat CM, Niehrs C. *Secreted and transmembrane Wnt inhibitors and activators.* *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013. **5**(3):a015081.
- 51- Reya T, Clevers H. *Wnt signalling in stem cells and cancer.* *Nature*, 2005. **434**(7035): p. 843-50.
- 52- Niehrs C. *Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators.* **Oncogene**. 2006; **25**: 7469–7481.
- 53- Semenov MV, et al. *Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6.* **Curr Biol**, 2001. **11**: p. 951–961.
- 54- Mao B, et al. *Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling.* **Nature**, 2002. **417**: p. 664–667.
- 55- Hassler C, et al. *Kremen is required for neural crest induction in Xenopus and promotes LRP6-mediated Wnt signaling.* **Development**, 2007. **134**: p. 4255–4263.
- 56- Cselenyi CS, Lee E. *Context-dependent activation or inhibition of Wnt-beta-catenin signaling by Kremen.* **Sci Signal**, 2008. **1**: p 10.
- 57- Pandur P, et al. *Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis.* **Nature**, 2002. **418**: p. 636–641.
- 58- Lee AY, et al. *Dickkopf-1 antagonizes Wnt signaling independent of beta-catenin in human mesothelioma.* **Biochem Biophys Res Commun**, 2004. **323**: p.1246–1250.
- 59- Yamamoto H, et al. *Wnt3a and Dkk1 regulate distinct internalization pathways of LRP6 to tune the activation of beta-catenin signaling.* **Dev Cell**, 2008. **15**: p. 37–48.
- 60- Huang Y, Liu L, Liu A. *Dickkopf-1: Current knowledge and related diseases.* *Life Sci*, 2018. **209**:p.249-254.
- 61- Johansson M, et al. *Dkk1 Controls Cell-Cell Interaction through Regulation of Non-nuclear β -Catenin Pools.* *Dev Cell*, 2019. **51**(6): p. 775-786.
- 62- Bovolenta P, et al. *Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease.* **J Cell Sci**, 2008. **121**: p. 737–746.
- 63- Knight MN, Karuppaiah K, Lowe M, et al. *R-spondin-2 is a Wnt agonist that regulates osteoblast activity and bone mass.* *Bone Res*, 2018. **6**: p. 24.
- 64- Rey JP, Ellies DL. *Wnt modulators in the biotech pipeline.* *Dev Dyn*, 2010. **239**: p. 102–14.
- 65- Lu B., et al. *Wnt Drug Discovery: Weaving Through the Screens, Patents and Clinical Trials.* *Cancers*, 2016. **8**: p. 82.

- 66- Dey N, et al. *Wnt signaling in triple negative breast cancer is associated with metastasis*. BMC Cancer, 2013. **13**:p. 537.
- 67- Krausova M., Korinek V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. Cell. Signal. 2014. **26**:p. 570–579.
- 68- Zhong Z, et al. *Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**: E2197–204.
- 69- Yan KS, Janda CY, Chang J, et al. Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5⁺ intestinal stem-cell self-renewal. *Nature*. 2017;545(7653):238-242. doi:10.1038/nature22313
- 70- Janda CY, Dang LT, You C, et al. *Surrogate Wnt agonists that phenocopy canonical Wnt and β -catenin signalling*. *Nature*, 2017. **545**(7653): p. 234-237.
- 71- Huels DJ, Sansom OJ. *R-Spondin is more than just WNT's sidekick*. Developmental Cell, 2017. **41**(5): p. 456-58.
- 72- Edwards JC, Willoughby DA. *Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers*. Ann Rheum Di, 1982. **41**: p. 177–182.
- 73- Bresnihan B, et al, editors. Kelly's Textbook of Rheumatology. 8. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2009. p. 23–37.
- 74- Firestein GS. *Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis*. In: Firestein GS, Budd RC, Harris T, McInnes IB, Ruddy S, Sargent JS, editors. Kelly's Textbook of Rheumatology. 8. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2009. p. 1035–1086.
- 75- Pap T, Gay S. Fibroblasts and fibroblast-like synoviocytes. In: Firestein GS, Budd RC, Harris T, McInnes IB, Ruddy S, Sargent JS, editors. Kelly's Textbook of Rheumatology. 8. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2009. p. 201–214.
- 76- Bartok B, Firestein GS. *Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis*. Immunol Ver, 2010. **233**(1): p. 233–255.
- 77- Quarta L, et al. *Cervical myelopathy caused by periodontoid synovial pannus in a patient with psoriatic arthritis: A case report*. Clin Rheumatol, 2007. **26**: p. 1380-1382.
- 78- Kobayashi I, Ziff M. *Electron microscopic studies of the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1975. **16**: p. 475-483.
- 79- Shiozawa S, Shiozawa K, Fujita T. *Morphologic observations in the early phase of the cartilage-pannus junction*. Arthritis Rheum, 1983. **26**: 472-478.
- 80- Ciobanu A, Ciobanu IR, Halalau F et al. *Histological and histoenzymological investigations of the rheumatoid articular cartilage*. Roto J Morphol Embryol, 1994. **40**: p. 23-27.
- 81- Xue C, Takahashi M, Hasunuma T et al. *Characterization of fibroblast-like cells in pannus lesions of patients with rheumatoid arthritis sharing properties of fibroblasts and chondrocytes*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**: p. 262-267.
- 82- Zvaifler NJ. *The immunopathology of joint inflammation in rheumatoid arthritis*. Adv Immunol, 1977. **16**: p. 265-336.
- 83- Zvaifler NJ, Firestein GS. *Pannus and pannocytes; alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 1994. **37**: p. 783-789.
- 84- Del Grande M, et al. *Cervical spine involvement early in the course of rheumatoid arthritis*. Semin Arthritis Rheum, 2014. **43**: p. 738-744.
- 85- Joaquim AF, Appenzeller S. *Cervical spine involvement in rheumatoid arthritis--a systematic review*. Autoimmun Rev, 2014. **13**: p. 1195-202.
- 86- Zhang T, Pope J. *Cervical spine involvement in rheumatoid arthritis over time: Results from a meta-analysis*. Arthritis Res Ther, 2015. **17**: p. 148.

- 87- Lee DM, et al. *Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis*. Science, 2007. **315**: p. 1006–1010.
- 88- Takeichi M. *Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator*. Science, 1991. **251**: p. 1451–1455.
- 89- Kimura Y, et al. *Cadherin-11 expressed in association with mesenchymal morphogenesis in the head, somite, and limb bud of early mouse embryos*. Dev Biol, 1995. **169**: p. 347–358.
- 90- Hoffmann I, Balling R. *Cloning and expression analysis of a novel mesodermally expressed cadherin*. Dev Biol, 1995. **169**: p. 337–346.
- 91- Price SR, et al. *Regulation of motor neuron pool sorting by differential expression of type II cadherins*. Cell, 2002. **109**: p. 205–216.
- 92- Kawaguchi J, et al. *Targeted disruption of cadherin-11 leads to a reduction in bone density in calvaria and long bone metaphyses*. J Bone Miner Res, 2001. **16**: p. 1265–1271.
- 93- Kyung Chang, S., Gu, Z., & Brenner, M. B. *Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11*. Immunological Reviews, 2010. **233**(1): p. 256–266.
- 94- Valencia X, et al. *Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast like synoviocytes*. J Exp Med, 2004. **200**: p. 1673–1679.
- 95- Tomita K, et al. *Cadherin switching in human prostate cancer progression*. Cancer Res, 2000. **60**: p. 3650–3654.
- 96- Markus MA, et al. *Cadherin-11 is highly expressed in rhabdomyosarcomas and during differentiation of myoblasts in vitro*. J Pathol, 1999. **187**: p. 164–172.
- 97- Pishvaian MJ et al. *Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines*. Cancer Res, 1999. **59**: p. 947–952.
- 98- Marinova-Mutafchieva L, et al. *Inflammation is preceded by tumor necrosis factor-dependent infiltration of mesenchymal cells in experimental arthritis*. Arthritis Rheum, 2002. **46**: p. 507–513.
- 99- Nakajima T, et al. *Apoptosis and functional Fas antigen in rheumatoid arthritis synoviocytes*. Arthritis Rheum, 1995. **38**: p. 485–491.
- 100- Firestein GS, Yeo M, Zvaifler NJ. *Apoptosis in rheumatoid arthritis synovium*. J Clin Invest, 1995. **96**: p. 1631–1638.
- 101- Geusens P. *The role of RANK ligand/osteoprotegerin in rheumatoid arthritis*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2012. **4**(4): p. 225-233.
- 102- Geng Y, Zhang ZL. *Comparative study on the level of B lymphocyte stimulator (BlyS) and frequency of lymphocytes between sero-negative and sero-positive rheumatoid arthritis patients*. Int J Rheum Dis, 2012. **15**(5):p. 478-485.
- 103- Chang SK, Gu Z, Brenner MB. *Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11*. Immunol Rev, 2010. **233**(1): p. 256-266.
- 104- Falconer J, et al. *Review: Synovial Cell Metabolism and Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Rheumatol, 2018. **70**(7):p. 984-999.
- 105- Ohata J, et al. *Fibroblast-like synoviocytes of mesenchymal origin express functional B cell-activating factor of the TNF family in response to proinflammatory cytokines*. J Immunol, 2005. **174**(2):p. 864-870.
- 106- Bustamante MF, et al. *Fibroblast-like synoviocyte metabolism in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2017. **19**(1):p. 110.

- 107- Ma JD, et al. *A novel function of artesunate on inhibiting migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients*. *Arthritis Res Ther*, 2019. **21**(1):p. 153.
- 108- Calabresi E, et al. *One year in review 2018: pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2018. **36**(2): p.175-184.
- 109- Veale DJ, Orr C, Fearon U. *Cellular and molecular perspectives in rheumatoid arthritis*. *Semin Immunopathol.*, 2017. **39**(4):p. 343-354.
- 110- Ospelt C. Synovial fibroblasts in 2017. *RMD Open*. 2017. **3**(2):e000471.
- 111- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H; POBER, Jordan S. *Imunologia celular e molecular*. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, c2000. 486p.
- 112- Weyand CM, Goronzy JJ. *Immunometabolism in early and late stages of rheumatoid arthritis*. *Nat Rev Rheumatol*, 2017. **13**(5):p. 291-301.
- 113- Mota LMH, et al. *Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da Artrite Reumatoide*. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2011; **51**(3): p. 199-219.
- 114- *Reumatologia: diagnóstico e tratamento/organizadores Marco Antônio P Carvalho (et al) 4a ed. São Paulo: Ac Farmacêutica, 2014.*
- 115- van der Woude D, van der Helm-van Mil AHM. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis, *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*.
- 116- *Reumatologia: diagnóstico e tratamento/organizadores Marco Antônio P Carvalho (et al) 4a ed. São Paulo: Ac Farmacêutica, 2014.*
- 117- Mota LMH, et al. *Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da Artrite Reumatoide*. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2011. **51**(3): p. 199-219.
- 118- Marques-Neto JF, Gonçalves ET, Langen LFOB, Cunha MFL, Radominski S, Oliveira SM et al. *Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples*. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 1993. **33**: p. 169-73.
- 119- Silman AJ, Pearson JE. *Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res*, 2002. **4**(Suppl): p. 265-72.
- 120- Burmester GR, Pratt AG, Scherer HU, Laar Jm. Rheumatoid arthritis: Pathogenesis and clinical features. In: Bijlsma JWJ, Silva JAP, Hachulla E, Doherty M, Cope A, Lioté F. *EULAR textbook on rheumatic diseases*. Londres: BMJ Group; 2012.
- 121- Cardiel MH et al. First Latin American position paper on the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2006. **45**(suppl)ii7-22.
- 122- Delgado-Vega AM, Martín J, Anaya JM. Genetic epidemiology of rheumatoid arthritis: What to expect from Latin America? *Biomedica*.2006; **26**(4):562-84.
- 123- Alamanos Y, Drosos AA. *Epidemiology of adult rheumatoid arthritis*. *Autoimmun Rev*, 2005. **4**(3): p. 130-6.
- 124- Salmon JE, Roman MJ. *Subclinical atherosclerosis in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. *Am J Med*.2008, **121**(10): p. S3-8.
- 125- Walberg-Jonsson S, Ohman ML, Dahlqvist SR. *Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden*. *J Rheumatol*, 1997. **24**(3): p. 445-51.
- 126- Salonen D, Brower A. *Seronegative spondyloarthropathies: Imaging*. In: Hochberg M, Silman A, Smolen J, Weinblatt M, Weisman M (Eds). *Rheumatology*. 5 ed. Philadelphia: Elsevier; 2013.

- 127- Dougados M, Baeten D. *Spondyloarthritis*. Lancet, 2011. **377**(9783): p. 2127-37.
- 128- Kaeley GS, Eder L, Aydin SZ, Gutierrez M, Bakewell C. Enthesitis: A hallmark of psoriatic arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 2018. **48**(1):p. 35-43.
- 129- Wang R, Ward MM. *Epidemiology of axial spondyloarthritis: an update*. *Curr Opin Rheumatol*. 2018. **30**(2):p. 137-143.
- 130- Sampaio-Barros PD. Epidemiology of spondyloarthritis in Brazil. *Am J Med Sci*. 2011. **341**(4):p. 287-8.
- 131- Bomtempo CAS, et al. *Avaliação clínica, laboratorial e radiográfica de brasileiros com espondiloartropatias*. *Rev Bras Reumatol*, 2006. **46**(4): p. 238-45.
- 132- Ramalho ES, Freitas GG, Kosminsky S et al. *Espondilite anquilosante: Estudo epidemiológico em trinta casos*. *Rev Bras Reumatol*, 1989. **28**: p. 1-2.
- 133- Stolwijk C, et al. *Global Prevalence of Spondyloarthritis: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2016. **68**(9): p. 1320-31.
- 134- Reveille JD, Weisman MH. *The epidemiology of back pain, axial spondyloarthritis and HLA-B27 in the United States*. *Am J Med Sci*, 2013. **345**: p 431–436.
- 135- Garcia-Montoya L, Gul H, Emery P. *Recent advances in ankylosing spondylitis: understanding the disease and management*. *Faculty Rev*, 2018. F1000-1512.
- 136- Smith JA. *Update on ankylosing spondylitis: current concepts in pathogenesis*. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015. **15**(1): p. 489.
- 137- Stolwijk C, et al. *The epidemiology of extra-articular manifestations in ankylosing spondylitis: a population-based matched cohort study*. *Ann Rheum Dis*, 2014.
- 138- Boonen A, Severens JL. *Ankylosing spondylitis: what is the cost to society, and can it be reduced?* *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2002. **16**: p. 691–705.
- 139- Feldtkeller E, et al. *Age at disease onset and diagnosis delay in HLA-B27 negative vs. positive patients with ankylosing spondylitis*. *Rheumatol Int*, 2003. **23**: p 61–66.
- 140- Chen B, Li J, He C, et al. *Role of HLA-B27 in the pathogenesis of ankylosing spondylitis (Review)*. *Mol Med Rep*, 2017. **15**(4): p. 1943–1951.
- 141- Anandarajah A, Ritchlin CT. *Treatment update on spondyloarthropathy*. *Curr Opin Rheumatol*, 2005. **17**: p. 247–256.
- 142- Rudwaleit M, et al. *Prediction of a major clinical response (BASDAI 50) to tumour necrosis factor alpha blockers in ankylosing spondylitis*. *Ann Rheum Dis*, 2004. **63**: p. 665–670.
- 143- Ocampo V, Dafna G. *Psoriatic arthritis*. *Faculty Rev*, 2019. **8** F1000 -1665.
- 144- Veale DJ, Fearon U. *The pathogenesis of psoriatic arthritis*. *Lancet*, 2018. **391**: p. 2273–2284.
- 145- Veale D, et al. *Reduced synovial membrane macrophage numbers, ELAM-1 expression, and lining layer hyperplasia in psoriatic arthritis as compared with rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 1993. **36**: p. 893–900.
- 146- Poggenborg RP, Østergaard M, Terslev L. *Imaging in psoriatic arthritis*. *Rheum Dis Clin North Am* 2015, **41**:p. 593-613.
- 147- Husni E, Michael M: *Oxford textbook of Psoriatic arthritis: Epidemiology of PsA*. Oxford university, 2018.
- 148- Ogdie A, Weiss P. *The Epidemiology of Psoriatic Arthritis*. *Rheum Dis Clin North Am*, 2015. **41**(4): p. 545–568.
- 149- Ritchlin CT, Colbert RA, Gladman DD. *Psoriatic arthritis*. *The New England Journal of Medicine*, 2019. **376**: p. 10
- 150- Helliwell PS; Wright V. *Psoriatic arthritis: clinical features* . In: Klippel JH , Dieppe

- PA (eds). *Rheumatology*. London, 1998. **6**(21): p. 1 – 6.
- 151- Chang SK, Gu Z, Brenner MB. *Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11*. *Immunol Rev*. 2010. **233**(1):p. 256-266. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00854.x
- 152- Sommer C, White F - Cytokines, Chemokines, and Pain, em: Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al. - *Pharmacology of Pain*. 1st Ed, Seattle, IASP Press, 2010. p. 279-302.
- 153- Zhang JM, An J - Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* 2007. **45**: p. 27-37.
- 154- Feldmann, M., Brennan, F. M., & Maini, R. N. (1996). *Role Of Cytokines In Rheumatoid Arthritis*. *Annual Review of Immunology*, **14**(1), p. 397–440.
- 155- Amatya, N., Garg, A. V., & Gaffen, S. L. *IL-17 Signaling: The Yin and the Yang*. *Trends in immunology*, 2017. **38**(5): p. 310–322.
- 156- Ishigame, H et al. *Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses*. *Immunity*, 2009. **30**(1) p. 108-19.
- 157- Cho, John S et al. *IL-17 is essential for host defense against cutaneous Staphylococcus aureus infection in mice*. *The Journal of clinical investigation*, 2010. **120**(5) p.: 1762-73.
- 158- Aujla, Shean J et al. *Th17 cells and mucosal host defense*. *Seminars in immunology*, 2007. **19**(6): p.377-82.
- 159- Adamopoulos, Iannis E et al. *Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors*. *Arthritis research & therapy*, 2010. **12**(1): R29.
- 160- Sato, Kojiro et al. *Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction*. *The Journal of experimental medicine*, 2006. **203**(12): p. 2673-82.
- 161- Iwakura, Yoichiro et al. *The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens*. *Immunological reviews*, 2010. **226**:p. 57-79.
- 162- Lories, Rik J, Nigil H. *Evolving concepts of new bone formation in axial spondyloarthritis: Insights from animal models and human studies*. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, 2017. **31**(6): p. 877-886.
- 163- Langley, Richard G et al. *Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials*. *The New England journal of medicine*, 2010. **371**(4):p. 326-38.
- 164- Mease, P et al. *Secukinumab improves active psoriatic arthritis symptoms and inhibits radiographic progression: primary results from the randomised, double-blind, phase III FUTURE 5 study*. *Annals of the rheumatic diseases*, 2018. **77**(6): p. 890-897.
- 165- Chabaud M, Lubberts E, Joosten L, et al. *IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Res*, 2001. **3**: p. 168–77.
- 166- Lubberts E, van den Bersselaar L, Oppers-Walgreen B, et al. *IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance*. *J Immunol*, 2003. **170**: p. 2655–2662.
- 167- Protosaltis, N J et al. *Interleukin-22 promotes tumor angiogenesis*. *Angiogenesis*, 2019. **22**(2):p. 311-323.
- 168- Sato, K et al. *Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction*. *The Journal of experimental medicine*, 2006. **203**(12):p. 2673-82.

- 169- Shaw, AT, Gravallesse EM. *Mediators of inflammation and bone remodeling in rheumatic disease*. Seminars in cell & developmental biology, 2016. **49**:p. 2-10.
- 170- Nusse R. et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther.* 2008. **117**(2):p. 244–79.
- 171- Nusse R. *Wnt signaling in disease and in development*. *Cell Res.* 2005. **15**(1):p. 28-32.
- 172- Clevers H. *Wnt/beta-catenin signaling in development and disease*. *Cell*, 2006. **127**(3):p. 469-80.
- 173- Tracey D, et al. *Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review*. *Pharmacol Ther.* 2008. **117**(2):p. 244–79.
- 174- Radner, H., & Aletaha, D. *Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview*. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*. **165**(1-2), p. 3–9.
- 175- Diarra D, Stolina M, Polzer K, et al. *Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling*. *Nat Med.* 2007. **13**(2): p.156-163.
- 176- Mason JJ, Williams BO. *SOST and DKK: Antagonists of LRP Family Signaling as Targets for Treating Bone Disease*. *J Osteoporos*, 2010. **210**.
- 177- Imai K, et al. *Differential expression of WNTs and FRPs in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **345**(4):p. 1615-1620.
- 178- Nakanishi R, et al. *Secreted frizzled-related protein 4 is a negative regulator of peak BMD in SAMP6 mice*. *J Bone Miner Res*, 2006. **21**(11): p. 1713-21.
- 179- Poggi L, Casarosa S, Carl M. *An Eye on the Wnt Inhibitory Factor Wif1*. *Front Cell Dev Biol*, 2018. 6: p. 167.
- 180- Gore AV, Swift MR, Cha YR, et al. *Rspo1/Wnt signaling promotes angiogenesis via Vegfc/Vegfr3*. *Development*, 2011. **138**(22):p. 4875-4886.
- 181- Shi GX, Zheng XF, Zhu C, et al. *Evidence of the Role of R-Spondin 1 and Its Receptor Lgr4 in the Transmission of Mechanical Stimuli to Biological Signals for Bone Formation*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(3): p. 564.
- 182- Wang H, Brennan TA, Russell E, et al. *R-Spondin 1 promotes vibration-induced bone formation in mouse models of osteoporosis*. *J Mol Med*, 2013. **91**(12): p. 1421-1429.
- 183- Rudnicki JA, Brown AM. *Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro*. *Dev Biol*, 1997. **185**(1):p. 104-18
- 184- Weivoda MM, et al. *Wnt Signaling Inhibits Osteoclast Differentiation by Activating Canonical and Noncanonical cAMP/PKA Pathways* [published correction appears in *J Bone Miner Res.* 2019 Aug;34(8):1546-1548]. *J Bone Miner Res*, 2016. **31**(1):p. 65-75.
- 185- Boland GM, et al. *Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells*. *J Cell Biochem*, 2004. **93**(6):p. 1210-30.
- 186- Mikels, A. J., Nusse, R. *Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context*. *PLoS biology*, 2006. **4**(4), e115.
- 187- van Amerongen R, et al. *Wnt5a can both activate and repress Wnt/beta-catenin signaling during mouse embryonic development*. *Dev Biol*, 2012. **369**(1): p. 101–14.
- 188- Später D, et al. *Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis*. *Development*, 2006. **133**(15): p. 3039-3049.
- 189- Xiang Y, et al. *Knocking down Wnt9a mRNA levels increases cellular proliferation*. *Mol Biol Rep*, 2008. **35**(2):p. 73-9.

- 190- Bennett CN, Ouyang H, Ma YL, et al. *Wnt10b increases postnatal bone formation by enhancing osteoblast differentiation*. J Bone Miner Res, 2007. **22**(12):p. 1924-1932.
- 191- Wend P, Wend K, Krum SA, Miranda-Carboni GA. The role of WNT10B in physiology and disease. Acta Physiol (Oxf), 2012. **204**(1):p. 34-51.
- 192- Wang H, et al. Wnt11 plays an important role in the osteogenesis of human mesenchymal stem cells in a PHA/FN/ALG composite scaffold: possible treatment for infected bone defect. Stem Cell Res Ther, 2016. **7**:p. 18.
- 193- Diederichs S, et al. *Regulation of WNT5A and WNT11 during MSC in vitro chondrogenesis: WNT inhibition lowers BMP and hedgehog activity, and reduces hypertrophy*. Cell Mol Life Sci, 2019. **76**(19):p. 3875-3889.
- 194- Resende, GG. *Expressão de moduladores da via Wnt por sinoviócitos fibroblasto símile de pessoas com doenças articulares inflamatórias*. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; 2016. 79s. Mestrado no programa Saúde do Adulto.
- 195- Barber RD, et al. *GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues*. Physiol Genomics, 2005; **21**(3):p. 389-395.

6.0 RESULTADOS

6.1 Artigo:

Avaliação da expressão genética de agonistas e antagonistas da via Wnt em células do tipo fibroblastos sinoviócitos símile humanos

Tamiris de Paula Silva¹, Gustavo Resende Gomes², Maíra Casalechi³, Marcus Vinícius Andrade⁴

1 Mestranda, Programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

2 Médico, Serviço de Reumatologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

3 Embriologista Clínica, Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

4 Professor Titular, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Introdução

Doenças crônicas são enfermidades de progressão lenta e longa duração, podendo ter poucos sintomas ou terem sintomas variados e inespecíficos (considerados somáticos), acompanhando o paciente durante toda a sua vida. Dentre as doenças crônicas articulares existem as artropatias inflamatórias, que acometem as articulações, tecidos periarticulares, além de órgãos e sistemas¹⁻³. Nessas enfermidades os pacientes podem apresentar erosão ou proliferação óssea^{4,5}, dependendo das características próprias de cada uma. A via Wnt, que participa da regulação do metabolismo ósseo bem como também atua na regulação de diversos processos biológicos dentre os quais podemos citar envelhecimento, cânceres, doenças metabólicas, neurais, hepáticas, renais, pulmonares, dermatológicas dentre outras⁶. Tratamentos medicamentosos eficazes existem, mas em geral, apenas para os pacientes com erosão óssea. Esses medicamentos são: anti-inflamatórios não-esteroides, corticoides, DMARD's do inglês *Disease modifying antirheumatic drugs* (droga antirreumática que modifica a evolução da doença) e bDMARD's do inglês *Biological disease modifying antirheumatic drugs* (droga antirreumática biológica que modifica a evolução da doença), porém muitos pacientes se tornam refratários à essas medicações⁷. Para os pacientes acometidos por artropatias que causam a proliferação óssea, não existem muitas opções de fármacos eficazes para tratamento que inibam a osteoproliferação tecidual⁸. Assim, o estudo das vias de sinalização envolvidas na fisiopatologia das artropatias que cursem com osteoproliferação pode identificar novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento de fármacos que possam diminuir a erosão e a proliferação óssea.

Associadas a essas dificuldades de tratamento e devido aos massivos avanços tecnológicos do século 21, principalmente após a conclusão do Projeto Genoma Humano em 2001⁹, a abordagem do estudo das doenças passou a ser também genética. Na área das doenças reumáticas podemos destacar alguns exemplos. Há estudos em desenvolvimento na literatura utilizando genes antagonistas e agonistas sendo usados como medicamentos, como por exemplo:

- Suplementação com DKK1: nesse estudo de 2017 os autores suplementaram células de AR com soluções exógenas de DKK1 e encontraram que essa suplementação reduziu significativamente os níveis da proteína β -catenina, causando um efeito antagonista no ciclo. Eles também encontraram que sob condições básicas, que apenas FLS de AR expressou WNT5A e que DKK1 aumentou o

nível de WNT5A em FLS de AR, evidenciando a relação próxima entre DKK1 (antagonista) e WNT5A (agonista)¹⁰.

- Suplementação com RSPO1: estudo de 2010, usando esse gene como um potencial terapêutico quando administrado em um modelo murino de artrite inflamatória que resultou em melhora da diferenciação osteogênica, mineralização, formação de nódulos e, entretanto, inibiu a osteoclastogênese. Isso provavelmente contribuiu para a proteção dos ossos e cartilagem de sofrerem dano erosivo¹¹.

- Suplementação com SFRP4: estudo de 2014, usou esse gene e entendeu que esse antagonista é capaz de inibir o crescimento de células tronco de câncer (CTC) e também transformou essas células em mais responsivas à quimioterapia. Portanto, esse trabalho sugere que SFRP4 pode ser usado como um inibidor viável de CTCs em vários tumores¹².

Portanto, nesse trabalho, a expressão dos agonistas e antagonistas da via WNT foi analisada *in vitro* em cultura de FLS. Mas, é importante ter em mente que ensaios *in vitro* podem não revelar o espectro inteiro da atividade de sinalização, pois não refletem a complexidade das interações celulares e alguns componentes da via como co-receptores podem não estar presentes.

Esta pesquisa foi feita usando fibroblastos sinoviais de pessoas acometidas pelas seguintes artropatias: artrite reumatoide (AR), artrite psoriásica (AP) e espondilite anquilosante (EA) para investigar a expressão genética de agonistas e antagonistas da via Wnt. Devido a patogênese destas doenças serem fortemente influenciadas pela produção local de citocinas, nós mensuramos a expressão gênica utilizando a técnica de qRT-PCR após estímulo das FLS com as citocinas IL-17, IL-22 e a TNF- α .

Material e Métodos

Pacientes

Sete pacientes participaram desse estudo: 2 com artrite psoriásica, 4 com artrite reumatoide e 1 com espondilite anquilosante. Estes diagnósticos foram definidos de acordo com os seguintes critérios:

- para a AR são segundo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) de 1987;
- para as EPAs são segundo o Grupo Europeu de Estudos das Espondiloartrites (GEEE) de 1991. Mais recentemente foram definidos os critérios pela Assessment of Spondyloarthritis International Society (ASAS) em 2009 para a espondilite axial e em 2011, para a espondilite periférica.

Os pacientes estavam em acompanhamento no ambulatório de espondiloartrites do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), conforme tabela 1 dos dados dos pacientes.

Cultura de FLS

Os pacientes do estudo tinham a indicação de passarem por uma artrocentese de acordo com a avaliação do médico assistente. A artrocentese (colecção de fluido sinovial) foi realizada após anestesia local com 1% de lidocaína sem vasoconstritor, em uma seringa heparinizada (5000 IU / ml solução) até o máximo esvaziamento para melhor alívio do paciente. O líquido foi então transportado imediatamente em tubos cônicos estéreis, foi diluído em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) meio estéril de cultura e centrifugado a 1200 rotações por minuto (rpm) por 15 min. Após a centrifugação, o supernadante foi descartado e o pellet de células foi armazenado para o cultivo dos fibroblastos e congelado com uma cultura composta de 70% de Soro fetal bovino (SFB), 22% de DMEM e 8% de Dimetil sulfóxido (DMSO) em criotubos. Essas células permaneceram assim por cerca de 24 horas a -20°C e depois foram transferidas para o nitrogênio líquido (-196°C).

As amostras foram gradualmente descongeladas em gelo, transferidas para tubos cônicos de 15 ml com meio DMEM stéril enriquecido com 10% de SFB, 1% de solução de antibiótico (estreptomicina/penicilina/solução de anfotericina B) e 1% de aminoácidos não essenciais. Toda a manipulação foi feita em capela de fluxo laminar usando técnicas assépticas.

As células descongeladas de fibroblasto foram colocadas em garrafas de cultura, contendo meio DMEM enriquecido com 10% de SFB, solução de 1% de antibióticos e solução de 1% de aminoácidos não essenciais. Elas foram transferidas para a estufa de cultura onde foram mantidas a 37°C e com 5% CO₂. As trocas de cultura foram feitas em uma capela de fluxo laminar previamente limpa a cada três dias ou quando se detectava mudança de pH (avaliada pela mudança de cor do meio).

Após atingirem a confluência máxima ou o tempo máximo de cultivo até a nona passagem, as células foram lavadas duas vezes com solução estéril de PBS e removidas enzimaticamente com 6 ml de solução 0,05% de tripsina em 0,02% de EDTA. Após adicionar a solução de tripsina, o conteúdo das garrafas de cultura foi neutralizado ao adicionar três vezes o volume de PBS estéril a cada garrafa. Esse conteúdo foi transferido com uma pipeta plástica estéril para tubos de 50 ml e foi centrifugado a 2000 rpm por 5 min. O supernadante foi descartado e os fibroblastos foram semeados em quantidades iguais, após contagem manual na câmara de Neubauer: uma diluição foi feita na qual 10 ul do precipitado da amostra foi adicionado a 90 ul da solução de azul de tripano em uma placa de 96 poços. Após a homogeneização, essa solução teve 10 ul de seu volume transferido para a câmara de Neubauer, onde as células foram contadas com a auxílio de um microscópio óptico e um aumento de 40x. O número total de células foi obtido ao multiplicar o número de células encontradas pelo fator de diluição, nesse caso, 10. O número encontrado foi então dividido pelo número de quadrantes contados, nesse caso, 4. Finalmente, o número foi multiplicado por 10.000, que é a correção de fator por ml. Então, o valor estimado para a quantidade de células para cada garrafa de cultivo foi encontrado.

O precipitado foi igualmente dividido entre cada um dos 4 poços com 2 ml de meio DMEM contendo 10% de SFB, 1% de solução de antibiótico e 1% de aminoácidos não essenciais e mantida por 24h, dentro das mesmas condições anteriores. Após, em uma capela de fluxo laminar, o meio foi cuidadosamente removido e descartado. Cada poço da amostra cultivada foi lavado 2x com o meio DMEM 1% de SFB. Todos os 4 poços receberam 2 ml de meio DMEM com 1% de SFB. O segundo poço também recebeu 10ng/ml de solução de citocina IL-17. O terceiro poço recebeu a adição de 1 ng/ml de citocina IL-22 e o quarto poço recebeu 10 ng/ml de TNF- α . Essas quantidades específicas de citocinas foram anteriormente definidas em um estudo prévio realizado no mesmo laboratório⁸.

Culturas foram mantidas com os estímulos por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e as células foram extraídas enzimaticamente com 500 µl de solução de tripsina 0,05% em 0,02% de EDTA e neutralizada ao se adicionar 3x o volume de solução de PBS estéril a cada poço. Esse conteúdo foi transferido usando uma pipeta estéril para um tubo cônico de 15 ml, centrifugado a 2000 rpm por 5 min então o supernadante foi descartado. O precipitado foi congelado a -80° C até o uso.

Extração de RNA, transcrição reversa e qPCR

As extrações de RNA foram feitas usando o kit de extração RNeasy® (Qiagen, EUA, cat 79254) seguindo as recomendações do fabricante. Ao final, o total de RNA eluído de cada amostra foi aliquotado e quantificado usando o espectrofotômetro NanoDrop® 2000c usando 260/280. O RNA extraído foi armazenado no freezer -80° C até o seu uso.

A transcrição reversa foi feita usando o kit Superscript® III (ThermoFisher Scientific, EUA, cat 18080051) de acordo com as recomendações do fabricante.

A quantificação da expressão de WNT-1, WNT3A, WNT5A, WNT9A, WNT10B, WNT11, WIF1, RSPO1, SFRP1, SFRP2, SFRP4, DKK1, FRZB e CDH11 foi feita utilizando o método TaqMan no aparelho 7500™ Real Time PCR Systems usando o método comparativo de ciclos threshold (Ct). Todos os experimentos foram feitos em placas de 96 poços customizada com os genes e primers liofilizados na placa TaqMan 0.2 mL (ThermoFisher Scientific, EUA, cat 4413264).

As PCRs para avaliação de cada gene foram feitas em duplicata com o controle GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) e as reações foram determinadas em testes padrões feitos nas mesmas condições experimentais.

A expressão relativa ótima de cada gene foi estabelecida ao se normalizar o qPCR em relação ao GAPDH endógeno. Esse gene foi o utilizado pois, para ele, foram encontradas as menores taxas de variação para as amostras testadas. GAPDH é geralmente utilizado como controle endógeno para o qPCR pois, em alguns sistemas experimentais, sua expressão é constante em tempos diferentes e após a manipulação experimental^{13,14}.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram feitas usando o software Prisma^R. Os testes de normalidade foram feitos pelo W-teste de Shapiro-Wilk. Variáveis contínuas que seguiram uma distribuição normal foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA e pós teste de TUKEY. Já as variáveis contínuas que não seguiram uma distribuição normal foram analisadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney teste-U com Dunn-Bonferroni's. Todas as análises estatísticas foram feitas usando o nível de significância de $\alpha = 0.05$.

Resultados e Discussão

O perfil de expressão gênica de 16 genes, sendo eles agonistas e antagonistas da via WNT, foi traçado utilizando a metodologia qRT-PCR. Os FLS foram estimulados, *in vitro*, por 24 horas, sem (control) e após tratamento com IL-17 (10ng/ml), IL-22 (1ng/ml) e TNF-alfa (10ng/ml). As células foram provenientes de 7 pacientes, sendo 4 com diagnóstico de AR, 2 com AP e 1 EA. A expressão gênica dos FLS dos pacientes com diagnóstico de AP e EA foram considerados em conjunto como EpA. As características clínicas e demográficas dos pacientes são mostradas na tabela 1.

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes

	AR	EA	AP	TOTAL
Tamanho amostra	4	1	2	7
Gênero (% mulheres)	75	0	50	62,5
Idade (anos)	54,75	40	51,5	48,75
Duração sintomas (anos)	34,5	15	17,15	22,33
Fator reumatoide positivo	50	N/C	50	33,33
VHS (mm/1 st hora)	N/C	N/C	N/C	N/C
PCR (mg/L)	22,3	N/C	40,25	31,27
Uso corticoides	3,145	Não	0,375	1,76
Uso diário de prednisona	N/C	Não	N/C	N/C
Uso de AINE's (%)	N/C	Não	N/C	N/C
Uso de DMARD sintético (%)	N/C	Não	Não	N/C
Uso de DMARD biológico (%)	N/C	Não	Não	N/C

AR= artrite reumatoide, EA= espondilite anquilosante, AP= artrite psoriásica, N/C: não consta, VHS= velocidade de hemossedimentação.

Neste estudo avaliamos também a expressão do gene da caderina-11 (CDH-11), apesar de ele não integrar a via de sinalização WNT. A CDH-11 é considerada uma molécula de adesão específica dos fibroblastos sinoviais¹⁵. Como apresentado na tabela 2, nossos resultados mostram que a expressão de CDH-11 não se alterou significativamente após estímulo quando comparada aos FLS

não estimulados. Este resultado era esperado, uma vez que a CDH-11 é um marcador de FLS¹⁶⁻¹⁸ a avaliação de sua expressão foi incluída nesse estudo para confirmar a natureza fibroblástica das células utilizadas.

Tabela 2: Expressão de caderina-11 em FLS sem e após estímulo com IL-17, IL-22 e TNF-alfa.

Gene	Mean Fold-change	Tratamento	P	Média	Desvio padrão
CDH-11	1,08	Controle	0,0931	0,4000	0,1631
	0,96	IL-17		0,3550	0,1489
	1,66	IL-22		0,6125	0,08539
	1,67	TNF- α		0,6180	0,2408

* Para a análise estatística da variação da expressão de CDH-11 foram considerados os dados paramétricos. FLS: fibroblastos do tipo sinoviócitos; CDH-11: caderina-11

A Figura 1 e Tabela 2 mostram a expressão dos genes antagonistas e agonistas da via WNT sem estímulo (control) e após estímulo com IL-17, IL-22 e TNF-alfa em FLS de pacientes com AR e EpA. Observou-se uma redução estatisticamente significativa da expressão do gene WNT9A nos FLS de pacientes com EpA após estímulo com IL-22 e TNF-alfa, e uma subexpressão após o estímulo com a IL-17. Os resultados de sua reduzida expressão no grupo das ARs podem indicar que esse gene tem um papel na proliferação óssea porque, na erosão, como ocorre na AR, sua expressão está reduzida. Um estudo de 2006 indicou que esse gene está envolvido na conservação das articulações. Em camundongos, a menor expressão desse gene resultou em um aumento na maturação de condrócitos e formação endocondral óssea. Estudos *in vitro* mostraram que a sua expressão está reduzida durante a diferenciação de células tronco mesenquimais em adipócitos¹⁹. Neste caso, pode ser entendido da superexpressão que há uma tendência à erosão óssea, pois ela ocorre no grupo das ARs. A sub expressão que ocorre no grupo das EpAs com o uso do estímulo IL-17 pode ser devido ao uso dessa citocina, pois ela promove a reabsorção óssea²⁰⁻²², que é o efeito exatamente oposto ao que ocorre no curso dessas doenças: proliferação óssea. Com o uso do estímulo IL-22, houve uma super expressão no grupo das EpAs.

Tabela 3. Expressão dos genes antagonistas e agonistas sem estímulo (control) e após estímulo com IL-17, IL-22 e TNF-alfa em FLS de pacientes com AR e EpA.

	Tratamento					
	CONTROL	IL-17	IL-22	TNF-ALFA	P VALUE	
Antagonistas	DKK1 AR ^a	0,6250 (0,2750-2,373)	0,2100 (0,1600-3,870)	0,8250 (0,4800-1,170)	0,8400 (0,4100-3,530)	*0,8881 ^b
	DKK1 EPA ^a		4,920 (0,2500-9,590)	1,850 (0,3800-3,940)	1,990 (0,3400-2,210)	*0,7425 ^b
	FRZB AR ^a	0,1600 (0,0650-1,645)	2,980 (0,5200-18,69)	8,370 (1,960-9,430)	2,740 (0,8200-10,57)	*0,1316 ^b
	FRZB EPA ^a		9,135 (0,1900-18,08)	0,4300 (0,09000-15,48)	0,7400 (0,4100-7,530)	*0,6260 ^b
	SFRP1 AR ^c	0,8617 (+0,8582)	11,39 (+9,476)	0,6150 (+0,7425)	8,875 (+9,952)	*0,1167 ^d
	SFRP1 EPA ^c		ND	ND	ND	ND
	SFRP2 AR ^c	0,3867 (+0,0057)	2,817 (+0,1401)	4,017 (+2,611)	8,430(+6,365)	*0,1032 ^d
	SFRP2 EPA ^c		ND	2,115 (+2,454)	33,03 (+32,98)	*0,3163 ^d
	SFRP4 AR ^c	0,2700 (+0,1458)	2,947 (+2,262)	1,905 (+0,3041)	2,640 (+1,971)	*0,0935 ^d
	SFRP4 EPA ^c		ND	9,123 (+9,846)	8,363 (+1,218)	*0,0720 ^d
	WNT11 AR ^c	2,280 (+2,311)	0,9000 (+0,6223)	1,115 (+0,7425)	2,137 (+1,268)	*0,7418 ^d
	WNT11 EPA ^c		ND	0,5250 (+0,2616)	1,980 (+1,853)	*0,6924 ^d
	WNT5A AR ^c	0,4780 (+0,2664)	1,110 (+0,3122)	2,950 (+4,211)	7,258 (+5,471)	*0,0592 ^d
	WNT5A EPA ^c		ND	9,123 (+9,846)	8,363 (+12,18)	*0,3962 ^d
Agonistas	WNT9A AR ^a	0,9800 (0,200-1,180)	0,4700 (0,1200-0,8200)	0,4200 (0,1400-0,4500)	0,9350 (0,4600-0,410)	*0,5662 ^b
	WNT9A EpA ^a		ND	0,2900 (0,2000-0,3800)	2,540 (0,4100-4,670)	0,0398^b
	WNT10B AR ^a	0,7850 (0,2750-1,258)	2,660 (1,000-25,06)	5,510 (3,960-7,140)	6,470 (1,690-11,25)	*0,0920 ^b
	WNT10B EpA ^a		12,30 (0,2800-24,31)	1,425 (1,120-1,730)	1,850 (1,440-29,81)	*0,1953 ^b
	RSPO1 AR ^c	0,8700 (+0,6052)	3,367 (+8,363)	1,425 (+0,4596)	5,577 (+4,311)	*0,0853 ^d
	RSPO1 EPA ^c		ND	2,100 (+1,428)	9,127 (+12,35)	*0,4259 ^d

^a Dados apresentados como mediana (percentil 25th-75th); ^bKruskal-Wallis/Mann-Whitney teste com correção Dunn-Bonferroni ; ^c dados apresentados como média +- desvio padrão; ^d teste ANOVA + pós-teste de TUKEY

ND: não detectado (abaixo do limite de detecção).

Os testes de normalidade foram feitos pelo W-teste de Shapiro-Wilk. Variáveis contínuas que seguiram uma distribuição normal foram analisadas pelo teste paramétrico ANOVA e pós teste de TUKEY. Já as variáveis contínuas que não seguiram uma distribuição normal foram analisadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney teste-U com Dunn-Bonferroni's. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

A Figura 1 e tabela 3 mostram que houve variação na expressão gênica com os seguintes genes antagonistas DKK1, FRZB, SFRP1, SFRP2, SFRP4, WNT-11 e agonistas WNT5A, WNT-10B e

RSPO1, mas estas não foram estatisticamente significativas. Dessa forma a hipótese de que os estímulos alterariam a expressão desses genes foi rejeitada. Sendo assim faremos uma discussão dos achados para esses genes com base na literatura publicada até o momento. Como alguns genes são recém descobertos e ainda não foram estudados separadamente, não há dados disponíveis para todos os genes com todos os estímulos.

ANTAGONISTAS

DKK1 é secretado pelos FLS em resposta a vários estímulos e tem um papel fundamental na ativação e inibição dos osteoclastos e na erosão óssea²³. Esse gene tem sua expressão mediada pela β -catenina e sua interação direta com LRP5 / 6²⁴. Estudo de 2007 mostrou que a expressão desse gene aumenta nos FLS de pacientes com AR e que quando o anticorpo anti TNF- α foi usado como estímulo, reduziu os níveis de DKK1 no soro desses pacientes. A concentração de DKK1 no soro de pacientes com AP era menor quando comparada com controles saudáveis²⁵.

Nesse estudo hipotetizamos que quando há estímulo com TNF- α no grupo AR, um aumento de expressão ocorreria. Isso poderia ser explicado porque um dos efeitos dessa citocina é aumentar a reabsorção óssea²⁶, que de fato ocorre nessa doença. A redução da expressão que ocorria no grupo das EpAs o que também corrobora com os dados encontrados na literatura.

O gene FRZB (SRFP3) tem um papel importante na morfogênese óssea. Em um estudo de 2017, pesquisadores analisaram o seu papel no tecido sinovial de pacientes com sintomas precoces de osteoartrite no joelho e encontraram que a sua expressão reduzida é associada com a progressão da doença²⁷. A super expressão que ocorreria no grupo das EpAs devido ao uso do IL-22 é consistente com os dados encontrados na literatura pois, sendo um grupo de osteoproliferação óssea; é possível perceber que seus efeitos serão os contrários aos efeitos das doenças em que ocorrem erosões ósseas.

Com o gene SFRP1 um estudo de 2005 mostrou que esse gene media a perda óssea²⁸. Estudo *in vivo* corroborou com esse estudo ao mostrar que ratos transgênicos com super expressão de SFRP1 apresentaram uma redução na densidade óssea mineral devido a reduzida formação óssea²⁹.

A expressão de SFRP2 foi encontrada nas células tronco mesenquimais e também nos últimos estágios da diferenciação osteoblástica. Estudo de 2008, demonstrou que há uma super expressão

de SFRP2 em células de mieloma múltiplo e que um aumento resulta em reduzida formação óssea através da inibição da via canônica de sinalização²⁷.

Estudo em camundongos mostrou que com o gene SFRP4 ocorreria um aumento na expressão desse gene por ele ter uma influência negativa no pico da densidade óssea mineral³⁰. Esse efeito foi confirmado em camundongos nos quais SFRP4 foi super expresso³¹. Camundongos *knockout* mostraram um aumento na massa do osso trabecular e reduziram a espessura do osso cortical, portanto, estudos relacionam esse gene a densidade óssea mineral^{32,33}. O efeito da IL-17 poderia causar uma sub expressão desse gene devido a essa citocina ser inibitória da sinalização WNT^{34,35}. Estar sub expresso pode significar que esse gene não foi capaz de inibir a sinalização constantemente porque, como mencionado anteriormente, as amostras foram colhidas em momento de plena osteoproliferação das doenças. Naquele momento, os fatores pró-inflamatórios poderiam estar mais ativos causando a AR³⁶.

O gene WNT-11 ainda precisa de mais investigações sobre seu papel, pois até o momento há dados de que atua como antagonista ou como agonista. Esse gene é expresso em células-tronco mesenquimais humanas e sua expressão aumentou durante a diferenciação osteogênica o que indica que ele tenha um papel potencial na diferenciação de osteoblastos^{37,38}.

Com o gene WIF1 não houve amplificação de expressão o suficiente para uma análise estatística o que pode ser devido a uma expressão tardia do gene, não expressão do gene monolítico ou sua expressão pode depender mais fortemente das interações entre os genes para que se expresse³⁹.

AGONISTAS

Em um estudo de 2017 os autores relataram que o gene RSPO1 promove a osteogênese ao ativar a sinalização canônica e resgatar a perda óssea⁴⁰. Em células progenitoras mesenquimais, o nível de secreção desse gene foi significativamente regulado por estimulação vibratória e administração sistêmica de seu recombinante. Houve também um aumento na taxa de aposição mineral óssea recombinante e volume ósseo em três modelos de osteoporose relacionada à idade⁴¹.

Estudos *in vitro* mostraram que o Wnt-5A na presença de Fz4 e LRP5 pode ativar a via Wnt canônica em várias linhas celulares e que a sua super expressão resulta em uma maior degradação de β -catenina⁴². A mesma sinalização foi demonstrada *in vivo* no desenvolvimento do crânio de camundongos com super expressão desse gene. Esses resultados sugerem que esse gene exerce seu

efeito no metabolismo ósseo principalmente através da sinalização não canônica, mas ainda faltam estudos sob condições fisiológicas adequadas²⁷. Estudos experimentais pré-clínicos com IL-17 indicam que essa citocina promove a reabsorção óssea imediata em AR³⁶. Portanto, a hipótese é de que a super expressão de WNT5A com esse estímulo corrobora com os achados na literatura, pois ocorre erosão óssea nesses pacientes. Isso também explicaria se houvesse uma sub expressão com o mesmo estímulo no grupo das EpAs, grupo com proliferação óssea. Por outro lado, super expressão com TNF- α poderia ser devido a uma das funções dessa citocina que é promover a osteoclastogênese⁴³, isto é, a erosão óssea que ocorre na AR. Com o uso dos estímulos IL-22 e TNF- α , haveria também uma sub expressão no grupo das ARs e com o uso de IL-17 e também sub expressão no grupo das EpAs⁴⁴.

Estudos indicam que a WNT10B tem um papel fundamental na regulação e diferenciação do precursor de células mesenquimais em osteoblastos ou adipócitos. Estudos com camundongos mostraram que uma massa óssea reduzida foi observada devido à diminuição da função e número de osteoblastos²⁷. Superexpressão com o uso do estímulo IL-22 poderia ocorrer, pois essa citocina age no complexo de justaposição entre a erosão e a osteoproliferação óssea⁴⁴ indicando que pode ter um papel tanto na proliferação quanto na erosão óssea. Essa função dupla da citocina também poderia explicar porque no grupo das EpAs houve uma sub expressão desse gene.

Nos genes WNT1 e WNT3A, apesar de terem sido feitos os experimentos não houve variação de expressão gênica o suficiente para gerar uma análise estatística. Isso pode ter ocorrido devido a uma expressão tardia do gene, não expressão do gene monolítico ou sua expressão pode depender mais fortemente das interações entre os genes para que se expresse⁴⁶.

Conclusões você não escreveu sua conclusão. Seu leitor tem que saber aqui na conclusão seus resultados mais importantes, de forma resumida.

A maioria dos resultados desse estudo foram não alcançaram significância estatística com exceção do resultado de WNT9A no grupo das EpAs. Alguns fatores podem ter contribuído para esses resultados como: baixo número amostral, estímulo não completo em condições *in vitro*, pois foram desconsideradas as interações entre os genes e entre os antagonistas e agonistas. Dessa forma mais estudos tornam-se necessários para que se possa confirmar ou não que os estímulos com as citocinas não afetam a expressão dos genes antagonistas e agonistas.

6.1.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Esse é um trabalho descritivo, que traz um viés original ao agregar, no mesmo estudo, amostras que tiveram suas expressões medidas para ambos antagonistas e agonistas com o uso de três estímulos com as seguintes citocinas IL-17, IL-22 e TNF-alfa citocinas na via WNT.

Como foram utilizadas apenas 7 amostras, é necessário, em trabalhos futuros, incluir mais amostras para expandir o conhecimento sobre esses genes. Alguns são muito bem caracterizados pela literatura como o DKK1 e o RSPO1 e outros possuem um conhecimento mais limitado como o WIF1, WNT3A e WNT11. Essas diferenças no conhecimento desses genes sugerem que estudos adicionais ainda são necessários para que sejam desvendadas as funções de cada gene e que se possa compreender dinamicamente as interações de cada grupo regulador na fisiopatogênese das doenças estudadas.

6.2.3 Referências do artigo

1. Clinical imaging 3rd ed. With skeletal, chest and abdomen pattern differentials. 2014, p 931.
2. Clinical imaging 3rd ed. With skeletal, chest and abdomen pattern differentials. 2014, p 942.
3. Shim JH, Stavre Z, Gravallesse EM. Bone Loss in Rheumatoid Arthritis: Basic Mechanisms and Clinical Implications. *Calcif Tissue Int*, 2018. **102**(5): p. 533-546.
4. Tanaka Y, Ohira T. Mechanisms and therapeutic targets for bone damage in rheumatoid arthritis, in particular the RANK-RANKL system. *Curr Opin Pharmacol*. 2018. **40**: p. 110-119.
5. Buch MH. *Defining refractory rheumatoid arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2018. **77**(7): p. 966-969.
6. Ng LF et al. *WNT Signaling in Disease*. *Cells*, 2019. **8**(8): p. 826.
7. Ghanima W. *Thrombopoietin receptor agonists: ten years later*. *Haematologica*, 2019. **104**(6): p. 1112-1123.
8. Mota LMH, et al. *Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da Artrite Reumatoide*. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 2011. **51**(3): p. 199-219.
9. Venter, JC et al. *The sequence of the human genome*. *Science*, 2001. **291**(5507): p. 1304-51.
10. Naot D, Bava U, Matthews B, et al. *Differential gene expression in cultured osteoblasts and bone marrow stromal cells from patients with Paget's disease of bone*. *J Bone Miner Res*, 2007. **22**(2): p.298-309.
11. Krönke G, Uderhardt S, Kim KA, et al. *R-spondin 1 protects against inflammatory bone damage during murine arthritis by modulating the Wnt pathway*. *Arthritis Rheum*, 2010. p. **62**(8): p. 2303-2312.
12. Warriar S, et al. *Cancer stem-like cells from head and neck cancers are chemosensitized by the Wnt antagonist, sFRP4, by inducing apoptosis, decreasing stemness, drug resistance and epithelial to mesenchymal transition*. *Cancer Gene Therapy*, 2014. **21**(9): p. 381-388.
13. Dolcino M, et al. *Gene Expression Profiling in Peripheral Blood Cells and Synovial Membranes of Patients with Psoriatic Arthritis*. *PLoS One*, 2015. **10**(6).
14. Batliwalla FM, et al. *Peripheral blood gene expression profiling in rheumatoid arthritis*. *Genes Immunology*, 2005. **6**(5): p. 388–397.
15. Valencia X, Higgins JM, Kiener HP, et al. *Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes*. *J Exp Med*, 2004. **200**(12): p. 1673-1679.
16. Yoshioka R, Kita Y, Nagahira A, et al. *Quantitative analysis of cadherin-11 and β -catenin signalling during proliferation of rheumatoid arthritis-derived synovial fibroblast cells*. *J Pharm Pharmacol*, 2015. **67**(8): p. 1075-1082.
17. Bustin SA. *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. *J Mol Endocrinol*, 2002. **29**: p.23 39.
18. Kiener HP, Brenner MB. *Building the synovium: cadherin-11 mediates fibroblast-like synoviocyte cell-to-cell adhesion*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(2):p. 49-54.
19. Nusse R, Clevers H. *Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities*. *Cell*, 2017. **169**(6): p.985-999.
20. Resende, GG. *Expressão de moduladores da via Wnt por sinoviócitos fibroblasto símile de pessoas com doenças articulares inflamatórias*. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais; 2016. 79s. Mestrado no programa Saúde do Adulto.

21. Edwards Dr, Denhardt Dt. *A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts.* Experimental Cell Research, 1985. **157**: p.127–143.
22. Winer J, Jung Ck, Shackel I, Williams PM. *Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro.* Analytical Biochemistry, 1999. **270**: p.41–49.
23. Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. *Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow.* Nat Cell Biol, 2001. **3**(7): p. 683-6.
24. Diarra D, et al. *Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling.* Nat Med, 2007. **13**(2): p.156-163.
25. Pinzone, J et al. *The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease.* Blood, 2009. **113**(3): p.517-25.
26. Chabaud M, Miossec P. *The combination of tumor necrosis factor? blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model.* Arthritis & Rheumatism, 2001. **44**: p. 1293–303.
27. Fernández-Torres J, et al. *Gene-gene interactions of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in knee osteoarthritis.* Mol Biol Rep, 2018. **45**(5): p. 1089-1098.
28. Wang FS, Lin CL, Chen YJ, Wang CJ, Yang KD, Huang YT, et al. *Secreted frizzled-related protein 1 modulates glucocorticoid attenuation of osteogenic activities and bone mass.* Endocrinology, 2005. **146**(5): p. 2415–23.
29. Satoh W, Gotoh T, Tsunematsu Y, Aizawa S, Shimono A. *Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis.* Development, 2006. **133**(6): p. 989-99.
30. Nakanishi R, et al. *Secreted frizzled-related protein 4 is a negative regulator of peak BMD in SAMP6 mice.* J Bone Miner Res, 2006. **21**(11): p. 1713-21.
31. Cho HY, et al. *Transgenic mice overexpressing secreted frizzled-related proteins (sFRP)4 under the control of serum amyloid P promoter exhibit low bone mass but did not result in disturbed phosphate homeostasis.* Bone, 2010. **47**(2): p. 263-71.
32. Nakanishi R, et al. *Osteoblast-targeted expression of Sfrp4 in mice results in low bone mass.* J Bone Miner Res, 2008. **23**(2): p. 271-7.
33. Boudin E, et al. *Single nucleotide polymorphisms in sFRP4 are associated with bone and body composition related parameters in Danish but not in Belgian men.* Mol Genet Metab, 2012. **106**(3): p. 366-74.
34. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, et al. *Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction.* J Exp Med, 2006. **203**: p. 2673–82.
35. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, et al. *IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis.* J. Clin. Invest, 1999. **103**: p. 1345–52.
36. Yang L, et al. *Augmented Th17 differentiation leads to cutaneous and Synovio-Enthesal inflammation in a novel model of psoriatic arthritis.* Arthritis Rheumatol, 2018. **70**: p. 855–67.
37. Wang H, He XQ, Jin T, et al. *Wnt11 plays an important role in the osteogenesis of human mesenchymal stem cells in a PHA/FN/ALG composite scaffold: possible treatment for infected bone defect.* Stem Cell Res Ther. 2016. **7**:18.

38. Diederichs S, Tonnier V, März M, Dreher SI, Geisbüsch A, Richter W. *Regulation of WNT5A and WNT11 during MSC in vitro chondrogenesis: WNT inhibition lowers BMP and hedgehog activity, and reduces hypertrophy.* Cell Mol Life Sci. 2019. **76**(19):p.3875-3889.
39. Poggi L, Casarosa S, Carl M. *An Eye on the Wnt Inhibitory Factor Wif1.* Front Cell Dev Biol, 2018. **6**: p 167.
40. Shi GX, Zheng XF, Zhu C, et al. *Evidence of the Role of R-Spondin 1 and Its Receptor Lgr4 in the Transmission of Mechanical Stimuli to Biological Signals for Bone Formation.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(3): p. 564.
41. Wang H, Brennan TA, Russell E, et al. *R-Spondin 1 promotes vibration-induced bone formation in mouse models of osteoporosis.* J Mol Med, 2013. **91**(12): p. 1421-1429.
42. Mikels, A. J., Nusse, R. *Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context.* PLoS biology, 2006. **4**(4), e115.
43. Kalliolias Gd, Ivashkiv Lb. *TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies.* Nat Rev Rheumatol, 2016.**12**(1): p. 49–62.
44. Shaw At, Gravallesse Em. *Mediators of inflammation and bone remodeling in rheumatic disease.* Semin Cell Dev Biol, 2016. **49**: p. 2–10.
45. Boshtam, M., Asgary, S., Kouhpayeh, S., et al. *Aptamers Against Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines: A Review.* Inflammation, 2016. **40**(1): p. 340–349.
46. Naot D, Bava U, Matthews B, et al. *Differential gene expression in cultured osteoblasts and bone marrow stromal cells from patients with Paget's disease of bone.* J Bone Miner Res, 2007. **22**(2): p.298-309.

7.0 ANEXOS

7.1 ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento livre e esclarecido

Pesquisa: Expressão in vitro dos moduladores extracelulares da via WNT em sinoviócitos fibroblasto símile.

Coordenador: Profa. Adriana Maria Kakehasi

Pesquisadores: Dra. Gustavo Gomes Resende, Dr. Marcus Vinícius M. Andrade e Dra. Rafaela Bicalho V. Macedo.

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP): 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

Prezada (o) Sra./Sr., Você foi convidada (o) a participar deste estudo porque o seu médico lhe indicou a realização de uma punção articular com ou sem uso de medicação intra-articular. Este procedimento é realizado com a introdução de uma agulha dentro da articulação (junta) que está inflamada, com a finalidade de retirar o líquido sinovial (líquido produzido normalmente pela articulação, mas que em determinados reumatismos pode estar aumentado, causando dor e dificuldade de movimentação) e para administração de medicamento (CORTICOIDE), quando isso estiver indicado. Nosso estudo tem por objetivo estudar as características da Artrite Psoriásica em um grupo de pacientes tratados no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG, incluindo as características do líquido sinovial. Mesmo que o (a) senhor (a) não tenha Artrite Psoriásica, poderá também participar como controle. O controle é a pessoa que não tem a doença que está sendo estudada, e as informações obtidas com a análise do seu líquido sinovial serão comparadas com aquelas das pessoas com Artrite Psoriásica. Neste estudo pessoas com Artrite Reumatoide e com Espondilite Anquilosante poderão participar como grupo controle, quando elas tiverem indicação de punção articular. Caso aceite participar desse estudo será pedido apenas que o (a) senhor (a) doe uma amostra do líquido obtido durante a punção articular. Serão realizadas dosagens de substâncias no líquido sinovial e as células deste líquido serão cultivadas para estudo. Não se espera que você tenha nenhum risco adicional por participar deste estudo, a não ser o relacionado ao (s) procedimento (s) aos quais o (a) senhor (a) tenha indicação de se submeter, de maneira idêntica ao procedimento habitual. Poderá haver leve sensação de dor no momento da introdução da agulha na articulação e será solicitado que o (a) senhor (a) não faça atividade física nos dois dias seguintes. Não será cobrado nem oferecido nenhum valor em troca de sua participação. As informações obtidas podem não ter relação direta com você, mas poderão servir para compreender melhor como a Artrite Psoriásica afeta nossa população. Seus dados não serão divulgados para outros fins e são confidenciais. A sua participação neste estudo é voluntária e você pode retirar seu consentimento a qualquer momento. Em caso de dúvidas entrar em contato com Dr. Gustavo ou Profa. Adriana: Ambulatório Bias Fortes no endereço: Al. Álvaro Celso, 175 / 2º andar, Santa Efigênia, BH, MG; fones: (31) 3409-9532 ou celular: (31) 8673-0331 ou e-mail: gustavogomesresende@yahoo.com.br. Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto me foram explicados e que manterei uma cópia deste consentimento comigo.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____ Data: _____

Nome da testemunha: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____ Data: _____

7.2 ANEXO 2- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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

Projeto: CAAE – 16196813.3.0000.5149

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 02 de outubro de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "**Expressão *in vitro* em sinoviócitos fibroblasto-símile de indivíduos com artrite psoriásica de moduladores extracelulares da via de sinalização Wnt**" 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