

Rafaela Bicalho Viana Macedo

**ESTUDO MORFOFUNCIONAL COMPARATIVO DE FIBROBLASTOS SINOVIAIS
DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E DE MODELO
EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO**

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

Orientador: Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade
Co-orientadora: Profa. Adriana Maria Kakehasi

Belo Horizonte
2013

M478e Macedo, Rafaela Bicalho Viana.
Estudo morfofuncional comparativo entre fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatóide e de modelo experimental de artrite [manuscrito]. / Rafaela Bicalho Viana Macedo. - - Belo Horizonte: 2013. 80f.: il.
Orientador: Marcos Vinicius Melo de Andrade.
Co-Orientador: Adriana Maria Kakehasi.
Área de concentração: Ciências Clínicas.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Artrite Reumatóide. 2. Artrite Experimental. 3. Membrana Sinovial. 4. Técnicas de Cultura de Células. 5. Microscopia Eletrônica. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Andrade, Marcos Vinicius Melo de. II. Kakehasi, Adriana Maria. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM : WE 300

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**Reitor**

Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora

Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa

Renato de Lima Santos

FACULDADE DE MEDICINA**Diretor**

Prof. Francisco José Penna

Vice-Diretor

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação

Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO**Coordenadora, Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto**

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Sub-Coordenadora, Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Profa. Valéria Maria Azeredo Passos

Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto**Representantes Docentes**

Prof. Francisco Eduardo Costa Cardoso

Prof. Paulo Caramelli

Prof. Luiz Gonzaga Vaz Coelho

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Profa. Valéria Maria Azeredo Passos

Representante Discente

Andréa de Lima Bastos

Ao Alencar, eterno companheiro.
À minha família, pelo permanente incentivo.

Se acreditares em estrela, vá buscá-la.
Fernando Sabino

AGRADECIMENTOS

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

À minha co-orientadora, Profa. Adriana Maria Kakehasi, pelo exemplo de ética, dedicação e competência. Por me guiar pelos caminhos da reumatologia e me mostrar que tudo valeu a pena.

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

Ao Prof. Alfredo José Afonso Barbosa por me auxiliar na elaboração das amostras. Pela postura serena e sempre com palavras acolhedoras.

À equipe de Reumatologia do Hospital Santa Casa de Belo Horizonte pelo companheirismo e pelo orgulho de fazer parte deste grupo.

À Dra. Mariana Peixoto pela amizade. Por me apoiar quando nem sempre pude estar presente.

Ao Dr. Gustavo Lamego e ao Dr. Gustavo Resende, por me apoiarem e contribuírem para a conclusão deste projeto.

Ao Dr. Paulo Madureira pelo aprendizado e pelo exemplo de dedicação à medicina.

Aos residentes, pelo aprendizado diário.

À equipe de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG, pela calorosa acolhida.

Ao Dr. Rodolfo Lisboa por me ensinar o caminho das pedras e por abraçar este projeto.

À toda equipe do Laboratório Lineu Freire Maia pelo incentivo.

À equipe do Laboratório de Doenças Autoimunes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por

cederem materiais para esta pesquisa e contribuir para a conclusão deste projeto. Em especial ao Dr. Ricardo Machado Xavier e a Dra. Patrícia Gneislaw de Oliveira.

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

Aos pacientes, por aceitarem fazer parte desta pesquisa.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A fisiopatologia da artrite reumatoide (AR) envolve a participação de diversas células e citocinas. A interleucina 33 (IL-33) é um membro recentemente descrito da família da interleucina 1 (IL-1) e seu papel no desenvolvimento e perpetuação da resposta inflamatória vem sendo demonstrado em diversos estudos em pacientes com AR e em modelos experimentais. Na membrana sinovial, fibroblastos sinoviais (FS) assumem comportamento crucial no processo inflamatório da AR estando implicadas na patogênese da sinovite e do dano estrutural, através da produção de citocinas inflamatórias e metaloproteinases (MMPs).

OBJETIVOS: Comparar a morfologia de FS do líquido articular e do tecido sinovial de pacientes com AR com FS obtidos de modelo experimental de artrite induzida pelo colágeno (CIA) por microscopia óptica e eletrônica. Estudar o efeito do estímulo com IL-33 sobre essas células quanto à produção de interleucina-6 (IL-6) e MMPs 1 e 3. Adicionalmente avaliar a produção de MMPs 1 e 3 após estímulo com fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina 1 beta (IL-1 beta).

MÉTODOS: Estabeleceu-se protocolo de cultivo de fibroblastos de sinóvia e líquido sinovial de pacientes com AR e de camundongos com CIA. Foram utilizadas células humanas entre a quarta e oitava passagens e células de modelo de CIA entre 27^a e 38^a passagens. As células foram comparadas morfológicamente por microscopia óptica e eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV). As concentrações basais de IL-6 foram avaliadas nos FS humanos e murinos. Os FS de modelo de CIA foram estimulados por 18 horas com IL-33 nas doses de 1, 3, 10, 30 e 100ng/mL e a produção de TNF-alfa e IL-6 foi identificada pela técnica de ELISA. FS humanos receberam estímulo com IL-33 10ng/mL e as concentrações de IL-6 foram dosadas após 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas. FS humanos também foram estimulados com TNF-alfa e IL-1b nas doses 0,5; 1, 5 e 10 ng/mL cada um isoladamente por 18 horas e a produção de MMP 1 e 3 foi analisada por ELISA.

RESULTADOS: FS humanos e murinos exibiram morfologia ultraestrutural semelhante, com citoplasma abundante e presença de corpúsculos lamelares.

No modelo de CIA a produção basal média de IL-6 foi de 73,94 (\pm 4,0) ng/mL e após estímulo com IL-33 houve aumento na produção de IL-6 com doses crescentes de IL-33. Não foi detectado nível de TNF-alfa basal ou após estímulo com IL-33. Nas células humanas, as concentrações de MMP-1 se correlacionaram positivamente com as doses crescentes de TNF-

alfa e IL-1 beta. As concentrações de MMP-3 ultrapassaram os limites de detecção do método

CONCLUSÃO: FS humanos de pacientes com AR e do modelo de CIA exibem características morfológicas semelhantes, dando suporte ao uso do modelo animal para o estudo da doença. A análise por MET e MEV permitiram a caracterização dos FS, uma vez que os corpúsculos lamelares constituem organelas armazenadoras de surfactante presentes exclusivamente em FS da camada sinovial interna. O comportamento dos FS murinos em resposta ao estímulo com IL-33 confirmam a participação dessa citocina no ambiente inflamatório da CIA e podem ter implicações no estudo e desenvolvimento de alvos terapêuticos.

PALAVRAS-CHAVE: artrite reumatoide, artrite induzida por colágeno, fibroblasto sinovial, interleucina 33, cultura de células, morfologia, microscopia eletrônica.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The pathophysiology of rheumatoid arthritis (RA) involves the participation of various cells and cytokines. Interleukin 33 (IL-33) is a recently described member of the family of interleukin 1 (IL-1) and its role in the development and perpetuation of the inflammatory response has been demonstrated in several studies in RA patients and in experimental models. In the synovial tissue, synovial fibroblasts (SF) assume behavior in critical inflammatory environment being involved in RA synovitis and structural damage cycle through production of inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases (MMPs).

OBJECTIVES: Comparative ultrastructural morphology of SF derived from synovial fluid and synovial tissue of patients with RA and experimental model of collagen-induced arthritis (CIA). To study the effect of IL -33 stimulation on these cells for the production of interleukin-6 (IL-6) and MMPs 1 and 3. Evaluate the production of MMPs 1 and 3 after stimulation with tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and interleukin-1 beta (IL-1 beta).

METHODS: A protocol of cultured fibroblasts from synovium and synovial fluid of RA patients and mice with CIA were established. Human cells were used between the fourth and eighth passages and cells CIA model between 27th and 38th passages. Cells were compared morphologically by transmission (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) and scanning. Basal levels of IL-6 were evaluated in murine and human SF. The CIA model SF were stimulated for 18 hours with IL-33 at doses 1, 3, 10, 30 and 100ng/ml TNF-alpha and IL-6 was identified by ELISA. Human SF received stimulation with 10ng/mL IL-33 and IL-6 concentrations were measured after 1, 3, 6, 9, 12 and 24 hours. Also SF were stimulated with human TNF-alpha and IL-1b at doses of 0.5, 1, 5 and 10 ng/ml each alone for 18 hours, and production of MMP 1 and 3 was analyzed by ELISA.

RESULTS: Human and murine SF exhibited similar ultrastructural morphology with abundant cytoplasm and presence of lamellated corpuscles. In the CIA model mean basal production of IL-6 was 73,94 (\pm 4,0) ng/mL and after stimulation with IL -33 increased the production of IL-6 with increasing doses of IL -33. There was no detectable level of basal TNF-alpha or after stimulation with IL -33. In human cells, the concentrations of MMP-1 positively correlated with increased TNF- alpha and IL- 1 beta. The MMP- 1 concentration exceeded the limit of detection method.

CONCLUSION: Human SF from patients with RA and SF from CIA model exhibit similar morphological characteristics, supporting the use of an animal model for the study of disease.

The SEM and TEM analysis allowed characterization of SF, since the corpuscles lamellar surfactant-storage organelles are unique synovial fibroblasts inner layer. The behavior of murine SF in response to stimulation with IL -33 confirms the involvement of this cytokine in the inflammatory environment of CIA and has implications for the study and development of therapeutic targets.

KEYWORD: rheumatoid arthritis, collagen-induced arthritis, synovial fibroblasts, interleukin 33, cell culture, morphology, electron microscopy.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 13 |
| 3 ARTIGO 1 | 18 |
| 3.1 RESUMO | 19 |
| 3.2 ABSTRACT | 19 |
| 3.3 INTRODUÇÃO | 21 |
| 3.4 INTERLEUCINA 33 | 21 |
| 3.5 INTERLEUCINA-33 E ARTRITE REUMATOIDE | 30 |
| 3.6 DISCUSSÃO | 34 |
| 3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 36 |
| 4. ARTIGO 2 | 43 |
| 4.1 RESUMO | 44 |
| 4.2 ABSTRACT | 45 |
| 4.3 INTRODUÇÃO | 47 |
| 4.4 MÉTODO | 49 |
| 4.5 RESULTADOS | 55 |
| 4.6 DISCUSSÃO | 66 |
| 4.7 CONCLUSÕES | 69 |
| 4.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 71 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 74 |
| 6. ANEXOS | 75 |

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica crônica de origem autoimune que acomete preferencialmente as articulações sinoviais. Acomete 0,5 a 2% da população, tem distribuição mundial e ocorre em ambos os sexos com predominância feminina com uma relação de duas a quatro mulheres para cada homem. Acarreta aumento na morbidade e mortalidade em relação à população geral, sendo que um terço dos pacientes se tornarão inaptos ao trabalho após dez anos de doença.¹

A etiologia da AR é desconhecida e sua fisiopatologia, multifatorial e complexa. A membrana sinovial (MS) é o alvo das alterações e lesões que ocorrem nas articulações no curso da AR.² A MS é composta por uma camada celular superficial de revestimento constituída por fibroblastos sinoviais (FS) e por macrófagos sinoviais embebidos numa matriz conectiva que repousa sobre uma matriz altamente vascularizada subjacente à camada de revestimento.³

FS são células mesenquimais com características distintas de outras linhagens de fibroblastos.³ Nas articulações sinoviais essas células asseguram a integridade estrutural e funcional, controlando a composição do fluido sinovial e da matriz extracelular. Entretanto, na AR, há hiperplasia de FS que adquirem papel importante na patogênese desta doença tornando-se componente do *pannus* reumatoide, mediando a inflamação e a destruição articular.⁴ Essas células são as principais produtoras locais de interleucina 6 (IL-6) e potenciais produtores de interleucina 33 (IL-33).^{3,5}

A IL-33 é um novo membro da família da interleucina 1 (IL-1), considerada importante citocina mediadora do processo inflamatório em AR.⁶ A ação da IL-6 no ambiente inflamatório da AR já foi amplamente demonstrada, porém só recentemente a IL-33 tem despertado atenção como citocina de provável atuação essencial na fisiopatologia da AR. Observações em humanos e estudos experimentais têm corroborado o potencial papel da IL-33 e de seu receptor ST2 como mediadores da patogênese da AR.^{7,8}

Já foi demonstrado que IL-33, agindo através da ligação ao receptor ST2, participa da ativação de macrófagos, atua sobre a migração de neutrófilos e promove a degranulação de mastócitos mediada por autoanticorpos *in vitro* e na sinóvia reumatoide *in vivo*.^{6,9-11} Sabendo-se que a IL-33 pode ser produzida por FS, esses dados indicariam uma via pela qual a citocina pode regular a resposta imune adaptativa por meio do reforço da resposta celular inata na artrite inflamatória.¹²

Os FS exercem papel crucial na lesão articular na AR ao produzirem grandes quantidades de

metaloproteinases (MMPs), enzimas proteolíticas ativadas nos processos de remodelamento tecidual de natureza tanto fisiológica quanto patológica. As MMPs de ação mais importante no dano articular observadas na AR são as collagenases (MMP-1, MMP-13) e a estromelina (MMP-3).¹³ Os fatores indutores da produção de MMPs incluem citocinas, fatores de crescimento, ligantes dos receptores Toll-símile (Toll-like receptors – TLR), e espécies reativas de oxigênio. Os estímulos para a produção das MMPs são transmitidos ao núcleo através da via das MAP quinases (MAPKs), para as quais pelo menos três grupos foram identificados em mamíferos: proteína kinase de regulação de sinal extracelular (ERK) 1 e 2, c-Jun N-terminal kinase/proteína kinase ativada por estresse (JNK/SAPK) 1 e 2, e proteínas p38 α , β , γ e δ .¹⁴

Foi demonstrado que a presença do receptor ST2 em FS e que a ligação a este receptor deflagra a ativação das vias intracelulares de sinalização, via MAPKs – p38, ERK e JNK. A partir dessa demonstração, hipotetiza-se que a produção de MMPs e citocinas por FS ativados por IL-33 possam ter importante papel no mecanismo fisiopatológico na AR e que isso se faça através da ativação dessas vias de sinalização.^{15,16}

JUSTIFICATIVA

Todo o avanço do conhecimento fisiopatológico que permitiu o desenvolvimento do arsenal terapêutico disponível para o tratamento da AR contou com a existência e utilização de modelos experimentais de artrite. Embora não exista um modelo experimental que mimetize todas as características da doença humana, a artrite induzida por colágeno (CIA) em camundongos DBA/IJ constitui o principal modelo de estudo dessa enfermidade. Em 1977, o primeiro modelo de CIA foi estabelecido em ratos imunizados com colágeno tipo II.¹⁷ Embora o modelo de CIA em murinos venha sendo amplamente utilizado, diferenças entre os humanos e esses animais limitam o significado e a validade dos modelos experimentais. Assim, no sentido de contribuir para a validação do modelo experimental, o presente estudo visa à avaliação das características morfológicas e funcionais de FS provenientes de líquido e de tecido sinovial de pacientes com AR, bem como FS da membrana sinovial de camundongos com artrite induzida pelo colágeno. Objetiva-se, portanto, identificar os efeitos da estimulação dessas células com IL-33 em relação à produção de IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), IL-1 beta (IL-1b) e MMPs 1 e 3.

Esse estudo faz parte da linha de pesquisa “Estudo de Mediadores e Reguladores da Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica”, desenvolvido no Laboratório Lineu Freire Maia na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a Coordenação do professor Marcus Vinícius Melo de Andrade. O grupo de pesquisa envolvido nessa linha passou a contar com a participação de médicos reumatologistas com interesse em ciência básica, promovendo a integração dos conhecimentos obtidos na área básica e sua aplicação na prática clínica. Para que este processo fosse iniciado, procedeu-se à padronização do cultivo de FS, metodologia inédita no laboratório. O domínio da técnica foi alcançado após repetidas tentativas até que o estabelecimento de um protocolo de isolamento de células de líquido sinovial e de membrana sinovial fosse concluído. No momento, a técnica de cultura de FS encontra-se sob domínio. Isso permitirá a continuidade dos estudos em AR bem como o desenvolvimento de novos projetos envolvendo outras doenças, como artrite psoriásica.

Essa iniciativa também permitiu o estabelecimento de parceria com o Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, chefiado pelo professor Associado de Reumatologia, Ricardo Machado Xavier. Em colaboração, foi possível a troca de conhecimento sobre o desenvolvimento do modelo experimental de artrite induzida por colágeno, técnicas de cultivo de fibroblastos e, finalmente, a permuta de material de pesquisa. Esse fato teve grande relevância para o Laboratório Lineu Freire Maia, uma vez que, além de permitir a colaboração com um dos mais importantes grupos de pesquisa em Reumatologia, permitiu a realização do estudo comparativo morfofuncional dos FS murinos e humanos por microscopia óptica e eletrônica, bem como a avaliação funcional.

Deste modo, pretende-se contribuir para o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da doença reumatoide e de outras doenças articulares inflamatórias, permitindo a identificação de biomarcadores e alvos terapêuticos.

De acordo com as diretrizes do Programa de Pós-graduação em Ciências Clínicas Aplicadas à Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da UFMG, a dissertação será apresentada sob a forma de artigos científicos. A formatação da dissertação segue as orientações contidas no “Guia para redação e apresentação de monografias, dissertações e teses”.¹⁸ O primeiro artigo, com o título “INTERLEUCINA 33 E ARTRITE REUMATOIDE”, encontra-se pronto para submissão. O segundo artigo, “ESTUDO MORFOFUNCIONAL COMPARATIVO ENTRE FIBROBLASTOS SINOVIAIS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E DE

MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE” reúne os achados originais do trabalho e será submetido para publicação em breve.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pincus T, Callahan LF, Sale WG, Brooks AL, Payne LE, Vaughn WK. Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years. *Arthritis Rheum* 1984 Aug;27(8):864-72.
2. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011 Dec;365(23):2205-19.
3. Bartok B, Firestein G. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010 Jan;233(1):233-55.
4. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 2013 Jan;9(1):24-33.
5. Kunisch E, Chakilam S, Gandesiri M, Kinne RW. IL-33 regulates TNF- α dependent effects in synovial fibroblasts. *Int J Mol Med* 2012 Apr; 29(4): 530–540.
6. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005 Nov;23(5):479-90.
7. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007 Jun;7(6):429-42.
8. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, *et al.* Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci* 2011 Sep;26(9):1132-9.
9. Chackerian AA, Oldham ER, Murphy EE, Schmitz J, Pflanz S, Kastelein RA. IL-1 receptor accessory protein and ST2 comprise the IL-33 receptor complex. *J Immunol* 2007 Aug;179(4):2551-5.

10. Matsuyama Y, Okazaki H, Tamemoto H, Kimura H, Kamata Y, Nagatani K. Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2010 Jan;37(1):18-25.
11. Xu D, Jiang HR, Li Y, Pushparaj PN, Kurowska-Stolarska M, Leung BP, *et al.* IL-33 exacerbates autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 2010 Mar;184(5):2620-6.
12. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, *et al.* IL-33 exacerbates autoantibody-induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Aug;105(31):10913-8.
13. Hammaker DR, Boyle DL, Chabaud-Riou M, Firestein GS. Regulation of c-Jun N-Terminal Kinase by MEKK-2 and Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases in Rheumatoid Arthritis. *J Immunol* 2004 Feb;172(3):1612-8.
14. Thalhamer T, McGrath MA, Harnett MM. MAPKs and their relevance to arthritis and inflammation. *Rheumatology* 2008 Apr;47(4):409-14.
15. Manetti M, Ibba-Manneschi L, Liakouli V, Guiducci S, Milia AF, Benelli G, *et al.* The IL1-like cytokine IL33 and its receptor ST2 are abnormally expressed in the affected skin and visceral organs of patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2010 Mar;69(3):598-605.
16. Verri WA Jr, Souto FO, Vieira SM, Almeida SC, Fukada SY, Xu D, *et al.* IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 2010 Sep;69(9):1697-703.
17. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Auto-imunidade ao colágeno tipo II, um modelo experimental de artrite. *J Exp Med* 1977;146:857-868.
18. Souza MSL. Guia para redação e apresentação de monografias, dissertações e teses. 3ª ed. Souza MSL, editor. Belo Horizonte: COOPMED Editora Médica; 2005.

ARTIGO 1: INTERLEUCINA 33 E ARTRITE REUMATOIDE

Rafaela Bicalho Viana Macedo¹, Adriana Maria Kakehasi², Marcus Vinicius Melo de Andrade³

1. Médica, especialista em Reumatologia. Mestranda pelo Programa de Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.
2. Professora Adjunta, Departamento do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.
3. Professor Associado, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

Autor responsável:

Marcus Vinicius Melo de Andrade

Avenida Alfredo Balena, 190 – sala 290 - Santa Efigênia

Belo Horizonte – MG

CEP 30130-100

andradem@medicina.ufmg.br

INTERLEUCINA 33 E ARTRITE REUMATOIDE

RESUMO

A melhor compreensão dos mecanismos inflamatórios da artrite reumatoide e o desenvolvimento da terapia biológica revolucionaram o tratamento da doença, permitindo interferência no ciclo sinovite - dano estrutural - incapacidade funcional. A interleucina 33 foi recentemente descrita como um novo membro da família da interleucina 1, cuja característica comum é a atividade pró-inflamatória. Por estar envolvida na patogênese de uma grande variedade de doenças, incluindo doenças autoimunes, a interleucina 33 começa a ser estudada na doença reumatoide. Sua ação tem sido avaliada em modelos experimentais de artrite, assim como no soro, no líquido e na membrana sinovial de pacientes com artrite reumatoide. Demonstrou-se que a administração da interleucina 33 exacerba artrite induzida por colágeno em modelos experimentais e concentrações dessa citocina no soro e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide correlacionaram-se positivamente com a atividade da doença. A presente revisão discute as evidências do papel da interleucina 33 com enfoque na artrite reumatoide.

Palavras-chave: interleucina 33, artrite reumatoide, fisiopatologia.

ABSTRACT

A better understanding of the inflammatory mechanisms of rheumatoid arthritis and the development of biological therapy revolutionized its treatment, enabling interference in the synovitis - structural damage - functional disability cycle. Interleukin 33 was recently described as a new member of the family of interleukin-1, whose common feature is the pro-inflammatory activity. Its involvement in the pathogenesis of a variety of diseases, including autoimmune diseases, raises the interest in the possible relationship with rheumatoid disease. Its action has been evaluated in experimental models of arthritis as well as in serum, synovial fluid and membrane of patients with rheumatoid arthritis. It has been shown that administration of interleukin-33 exacerbates collagen-induced arthritis in experimental

models and cytokine concentrations in serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis were positively correlated with disease activity. This review discusses the evidence for the role of interleukin-33 with a focus on rheumatoid arthritis..

Keywords: interleukin 33, rheumatoid arthritis, physiopathology.

INTRODUÇÃO

Artrite reumatoide (AR) compreende uma poliartrite simétrica que afeta as articulações diartrodiais e estruturas periarticulares, além de apresentar diversas manifestações sistêmicas. Acomete cerca de 1% da população mundial e está comumente associada à incapacidade funcional e à redução na qualidade de vida.^{1,2}

O sítio inflamatório primário da AR é a membrana sinovial (MS) que mostra hiperplasia celular e processo inflamatório configurando sinovite. Quando evolui sem tratamento, ou mesmo nos casos mais refratários, há destruição articular progressiva, com perda cartilaginosa e óssea.³

A face interna da MS está em contato com a cavidade intra-articular e, normalmente, é uma membrana delicada de duas a três camadas de células. Na AR, um grande número de células do sistema imune invadem essa estrutura, levando à proliferação celular, neovascularização e à formação de folículos linfoides germinativos. Os mecanismos envolvidos no recrutamento das células inflamatórias para o interior da membrana sinovial têm sido extensivamente estudados.⁴ Alterações na função de linfócitos T e B e produção anormal de citocinas e anticorpos têm sido reconhecidos como processos presentes na AR.⁵⁻⁸ Muitas citocinas, responsáveis por regular a comunicação celular, são expressas na membrana sinovial e estão diretamente envolvidas nos processos imunes na AR.

O estudo do papel das citocinas tem permitido o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da AR, entre eles, os bloqueadores do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e do receptor da interleucina (IL) 6. Observações recentes em humanos e em estudos experimentais têm demonstrado o potencial papel da IL-33 e de seu receptor ST2 como mediadores da patogênese da AR.^{9,10} A IL-33 foi identificada como um novo membro da família da IL-1, que também inclui a IL-1alfa, IL-1beta, IL-18 e antagonista do receptor da IL-1 (IL-1Ra).¹¹ Este artigo apresenta as ações da IL-33 e discute seu papel na AR.

INTERLEUCINA 33

A IL-33 foi recentemente descrita como um novo membro da família da IL-1, cuja característica comum é a atividade pró-inflamatória.¹¹⁻¹³ Desempenha importante papel imunológico associado à resposta Th2, estimulando de modo significativo a secreção de IL-5 e IL-13 por células Th2 polarizadas.

O gene da IL-33 está localizado no cromossomo 9 (9p24.1). O RNA mensageiro (RNAm) da IL-33 é expresso por múltiplos tipos celulares em diferentes órgãos em seres humanos e em camundongos. A proteína da IL-33 é expressa principalmente em células epiteliais e endoteliais, particularmente nas vênulas endoteliais altas.¹⁴

Semelhante à IL-1beta e à IL-18, a IL-33 é produzida intracelularmente como pró-IL-33 e, após sofrer clivagem, é secretada no meio extracelular como IL-33 madura.¹⁴ Sua forma bioativa é liberada como resultado de necrose celular e funciona como um gatilho inflamatório através de ação autócrina e parácrina. A caspase-1, também conhecida como enzima conversora da IL-1beta, é responsável pela clivagem das pró-formas de algumas citocinas da família IL-1, tais como a próIL-1beta e o interferon gama (IFN-gama) indutor de IL-18. A IL-33 também demonstrou ser clivada pela caspase-1 *in vitro*, embora a relevância *in vivo* desta enzima seja discutido.¹⁵ Embora a IL33 esteja estruturalmente relacionada à IL-1beta e à IL-18, responsáveis por ativar linfócitos Th1/Th17, suas funções biológicas resultam principalmente na produção de IL-5 e IL-13.¹¹

O receptor da IL-33 é o conjunto formado pela proteína ST2 e pela proteína acessória do receptor de IL-1 (IL-1RAcP), expressos na maioria das células, principalmente em mastócitos e em células Th2 ativadas. Três isoformas de ST2 em seres humanos são produzidos pelo processamento diferencial de uma cópia simples: forma ancorada à membrana (ST2), forma solúvel (sST2), e a forma expressa principalmente em órgãos gastrointestinais (ST2V). A forma sST2 funciona como receptor chamariz da IL-33 ao impedir sua ligação ao receptor transmembrana.¹¹

A integração entre o sinal extracelular, como no caso das citocinas, e o núcleo celular se faz através dos sistemas de sinalização intracelular e resulta em informações para modulação da transcrição genética. No caso da IL-33, após se ligar ao complexo IL-1RAP, há indução da sinalização através do domínio TIR da IL-1RAcP. O domínio TIR compreende o complexo formado pelo receptor Toll-símile (TLR) e pelo receptor da IL-1 (IL-1R). A proteína adaptadora Myeloid Differentiation Primary Response Protein 88 (MYD88), quinase 1 associada ao IL-1R (IRAK) 1 e 4 são recrutados para o receptor desse complexo e induzem sequencialmente a ativação das vias de sinalização do fator nuclear kB (NF-kB), inibidor de NF-kB-alfa (IkB α) e quinase I reguladora do sinal extracelular (ERK1, também conhecida como MAPK3), Erk2 (ou MAPK1), p38 (ou MAPK13) e Jun N-terminal quinase-1 (JNK1, também conhecida como MAPK8). No núcleo os fatores de transcrição NF-kB, ATF

(Activating Transcription Factor) e AP1 (Activator Protein 1) se ligam ao DNA e regulam a transcrição genética.¹⁶ (Figura 1)

Variações celulares específicas nas vias de sinalização induzidas por IL-33 têm sido descritas. Por exemplo, em fibroblastos, o TNF associado ao receptor 6 (TRAF6) é necessário para o recrutamento de IRAK e subsequente ativação de p38, JNK1 e NF- κ B, mas não de proteínas ERK.^{14,16,17,18}

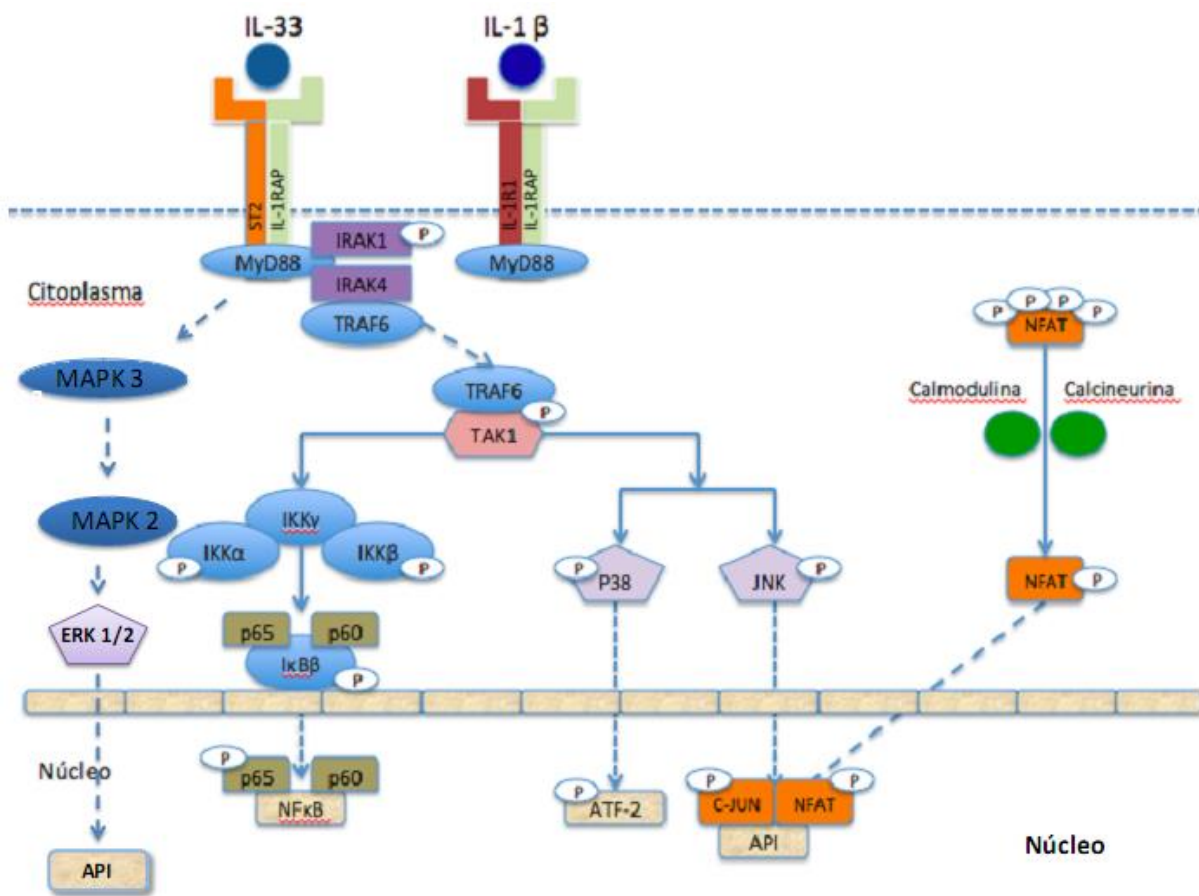


Figura 1. Receptor e vias de sinalização intracelular estimuladas pela IL-33. Após ligação da IL-33 ao receptor IL-1RAP/ST2, a transdução de sinal se inicia com ativação do complexo MyD88/IRAK1/IRAK4. TRAF6 forma um complexo com TAK1 necessário para o recrutamento e subsequente ativação do conjunto de enzimas Ikk (alfa, gama e beta) da via ERK. Após fosforilação do Ikb beta esta via levará à transdução do NF- κ B. TAK1 também participa da ativação das vias p38 e JNK. O fator de transcrição NFAT é modulado pela sinalização de cálcio e está envolvido na via JNK. ATF é o fator de transcrição relacionado à p38.

IL-33: interleucina 33. MYD88: Myeloid differentiation primary response protein 88; IRAK 1: IL-1R-associated kinase 1; IRAK 4: IL-1R-associated kinase 4; TRAF6: receptor-associated actor 6; IL-1RAcP: IL-1R accessory protein; NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; MAPK: mitogen-activated protein kinase; ERK: extracellular signal-regulated kinase; JNK: JUN N-terminal kinase; MAPKKs: MAPK kinases; IKK α : Ikb α Kinase; NFAT: nuclear factor of activated T cells; ATF: activating transcription factor; AP1: activator protein 1.

As funções ou efeitos da IL-33 se fazem presentes em diversos tipos celulares e motivaram estudos da participação dessa interleucina e de seu receptor em diferentes condições clínicas, como asma, sepse, aterosclerose e artrite reumatoide.

IL-33 em estudos in vitro ou experimentais

Diversos estudos experimentais descrevem as ações celulares da IL-33. A secreção de IL-33 tem sido descrita em linhagem de monócitos (células THP-1), em resposta a diferentes estímulos: infecção (*Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*), lipopolissacarídeo (LPS) com adjuvante de alumínio e LPS isolado.^{18,19}

Basófilos ativados por imunoglobulina E (IgE) produzem IL-33 e liberam histamina e, adicionalmente, a migração de basófilos também parece ser regulada por IL33. Esses achados auxiliam na compreensão das respostas imunes independentes de antígenos presentes nos tecidos que expressam o RNAm da IL-33, como as células musculares lisas do tecido brônquico e as células epiteliais das vias aéreas.^{17,20}

Em eosinófilos, a IL-33 regula a ativação, degranulação, aumento da aderência e da sobrevivência.^{18,21} Em camundongos, após a administração sistêmica, a IL-33 é potente indutora da resposta inata tipo 2, ao se demonstrar que os animais desenvolvem esplenomegalia, eosinofilia e alterações graves no intestino e nos pulmões, acompanhados por aumento das imunoglobulinas E e A e de citocinas da resposta Th2.¹¹ Estudo experimental mostrou que a administração de IL-33 a camundongos foi capaz de provocar anafilaxia.²²

Em camundongos sensibilizados com IL-33, houve aumento de IFN-gama fornecendo suporte para a conclusão de que a IL-33 pode agir como fator co-estimulatório nas respostas celulares imunes inatas.²³

Mastócitos são células muito responsivas à IL-33, acarretando aumento da produção de IL-6, IL-13, IL-1beta, TNF, prostaglandina D2 e MCP-1.²⁴⁻²⁷ Em adição, IL-33 promove a sobrevivência, adesão e produção de citocinas nos mastócitos humanos e em mastócitos progenitores.^{28,29}

Os cardiomiócitos também podem ser ativados por IL-33.^{15,18,30} A IL-33 produzida por fibroblastos cardíacos antagoniza a ação hipertrófica induzida pela angiotensina II e fenilefrina sobre os cardiomiócitos. Assim, acredita-se que IL-33 pode exercer um potencial terapêutico benéfico na regulação da resposta do miocárdio à sobrecarga.³⁰ Objetivando avaliar a origem dos mecanismos que tornam o miocárdio de indivíduos com diabetes

mellitus (DM) mais propenso à injúria decorrente do processo isquemia/reperfusão, Rui T e cols. avaliaram camundongos com e sem DM tipo 1 nos quais foram induzidos isquemia e reperfusão miocárdica. A finalidade foi avaliar se o DM afetaria os níveis de IL-33 e se a redução na produção dessa citocina seria a responsável pela exagerada lesão ocasionada pelo processo de isquemia/reperfusão no miocárdio diabético. Os resultados evidenciaram redução nos níveis de IL-33 no miocárdio dos animais diabéticos, associada à ativação da proteína quinase C beta II, proteína capaz de acarretar disfunção miocárdica. A administração exógena de IL-33 impediu a ativação dessa proteína e atenuou a lesão induzida pela isquemia/reperfusão nos animais diabéticos. A análise *in vitro* mostrou aumento da apoptose em cardiomiócitos não tratados com IL-33. Esses resultados indicam que a diminuição dos níveis de IL-33 pode ser responsável pelo aumento da sensibilidade miocárdica à isquemia no DM.³¹

O papel da sinalização IL-33/ST2 no desenvolvimento da aterosclerose também se encontra sob investigação. Miller e col. demonstraram que o tratamento de culturas de adipócitos murinos com IL-33 induziu a produção de citocinas do grupo Th2 (IL-5 e 13), promoveu redução do armazenamento de lípidos e diminuição da expressão de genes relacionados com o metabolismo lipídico e adipogênese. A administração de IL-33 recombinante para camundongos diabéticos geneticamente obesos acarretou redução da glicemia em jejum e melhora da tolerância à glicose e à insulina.³² Em outro estudo, os mesmos autores verificaram que a administração de IL-33 para camundongos deficientes em apolipoproteína E (ApoE), glicoproteína essencial para o catabolismo de componentes ricos em triglicérides, induziu a produção de citocinas Th2 e de anticorpos contra lipoproteínas de baixa densidade (LDL) oxidada que desempenhariam papel protetor contra aterosclerose. Isso reduziu significativamente o desenvolvimento de placas ateroscleróticas no seio aórtico desses animais. De modo contrário, os animais tratados com sST2 desenvolveram placas ateroscleróticas significativamente maiores. Estes resultados demonstram um novo papel para a relação IL-33/ST2 no controle do balanço Th1/Th2 e na geração de autoanticorpos protetores na aterosclerose.³³

Por outro lado, estudo recente conduzido por Demyanets e cols. em culturas de células endoteliais de artéria coronária e veia umbilical humanas, demonstrou que o tratamento dessas culturas celulares com IL-33 promoveu aumento da adesão leucocitária e da produção das moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1, e-selectina e MCP-1, além de promover a ativação inflamatória dessas células. Esses autores demonstraram que a IL-33 e o seu receptor ST2 são

expressos em placas ateroscleróticas e a adição da IL-33 induziu a expressão das mesmas moléculas pró-adesivas além da expressão de IL-6.³⁴

Demyanets e cols. debatem os resultados divergentes em relação aos estudos anteriores de Miller e cols. Os primeiros discutem que a utilização de camundongos com aterosclerose de início recente acrescido da ausência de estudo da vasculatura carotídea nos experimentos de Miller e cols poderiam explicar os resultados conflitantes. Além disso, o aumento de citocinas do grupo Th2 evidenciado por Miller e cols., considerando as fortes evidências do papel aterogênico de citocinas do grupo Th1 e que a ação da via Th2 no desenvolvimento aterosclerótico depende do estágio e local da lesão, além do modelo experimental adotado, poderiam explicar os diferentes resultados observados.^{33,34}

Em relação à asma, modelos experimentais sugerem que o receptor ST2 está envolvido na inflamação das vias aéreas mediada por antígeno.^{18,35} Na asma experimental induzida por ovalbumina, a injeção de IL-33 por via intraperitoneal conduziu à eosinofilia e ao acúmulo de macrófagos nos pulmões dos animais. Em contraste, camundongos deficientes em receptor ST2 desenvolveram inflamação atenuada das vias aéreas, níveis reduzidos de IL-5 e da concentração sérica de eosinófilos.^{13,36}

Outra proeminente ação da IL-33 parece ocorrer em relação à defesa contra infecção. Os receptores TLR participam do mecanismo de iniciação inflamatória em processos infecciosos ao reconhecerem componentes padrões de patógenos (PAMPs) e ligantes endógenos liberados por tecidos lesados (DAMPs). A ligação da IL-33 ao receptor ST2 pode regular negativamente a ativação dos TLR, ao competir pela utilização do componente de sinalização MyD88.³⁷ Recentemente, Alves-Filho e cols. constataram que IL-33 tem ação protetora na sepse experimental em camundongos ao demonstrar que o processo inflamatório foi atenuado pelo tratamento com IL-33 recombinante. Uma vez que a ativação dos TLR em neutrófilos leva à regulação suprimida da expressão do receptor beta da interleucina 8 (CXCR2), crucial para o recrutamento das células para o local da infecção, a ação concorrente da IL-33 pela proteína MyD88 diminui a ativação dos TLR e, conseqüentemente, permite maior expressão de CXCR2 e deixando de inibir o influxo dos neutrófilos para o sítio infectado, proporcionando aceleração da depuração bacteriana.³⁸

IL-33 em estudos humanos

Assim como nos modelos experimentais, a participação da IL-33 e seu receptor ST2 tem sido investigada em diversas condições clínicas.

Níveis séricos de sST2 estão aumentados em pacientes com exacerbação aguda de asma e pacientes com asma crônica têm concentrações pulmonares elevadas de IL-33.¹⁹ Considerando que ST2 é preferencialmente expresso em células Th2 e em mastócitos, isso fornece o racional explicativo para associação entre altos níveis de IL-33 e asma.³⁶

Nos processos infecciosos, a IL-33 promove maior expressão dos receptores de superfície ligantes de citocinas do tipo de CXCR2, os quais se associam à migração de neutrófilos para o sítio infeccioso e à eliminação bacteriana. Demonstrou-se que pacientes que não se recuperaram de um evento séptico expressaram significativamente menos CXCR2 do que aqueles pacientes que se curaram. Além disso, indivíduos sépticos não sobreviventes apresentaram concentrações séricas mais elevadas de sST2 em comparação com os sobreviventes. Sabendo-se que sST2 é um receptor charmeira da IL-33, esses achados sugerem que a IL-33 se associe a um resultado favorável na sepse clínica.^{13,38}

Estudos recentes indicam um papel protetor para o complexo IL-33/ST2 na aterosclerose, obesidade e na remodelação cardíaca em humanos. A IL-33 e o seu receptor ST2 parecem desempenhar um papel favorável na evolução da aterogênese, além de proteger o coração contra a ação de forças deletérias responsáveis pela distensão, hipertrofia e fibrose muscular.³⁹ Em humanos, essa citocina reduz a apoptose dos cardiomiócitos, melhorando a função ventricular através de supressão da atividade da caspase-3 e do aumento da expressão de proteínas inibidoras da apoptose.³²

Níveis séricos elevados de sST2 mensurados imediatamente após o infarto agudo do miocárdio se correlacionaram diretamente com os níveis séricos de creatina quinase e inversamente com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Nesses pacientes, os níveis de sST2 foram superiores naqueles que evoluíram para óbito ou que desenvolveram insuficiência cardíaca congestiva.³²

De forma complementar, ensaio clínico que avaliou pacientes nas primeiras 12 horas após síndrome coronariana aguda com elevação do segmento ST, demonstrou que nível aumentado de sST2 na avaliação inicial foi preditor de insuficiência cardíaca. Adicionalmente, a avaliação combinada do ST2 e do peptídeo natriurético tipo B (NT-proBNP) melhorou a predição de morte cardiovascular nesses pacientes.³²

O binômio IL-33/ST2 tem sido investigado em diversas doenças reumáticas. Em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES), o nível sérico de sST2 foi maior em relação a controles saudáveis e apresentou correlação positiva com a atividade da doença pelo índice SLEDAI e com os níveis séricos do anticorpo anti-DNA. Pacientes lúpicos apresentaram correlação inversa entre sST2 e níveis séricos de complemento C3, sugerindo que sST2 constitua um marcador de atividade da doença. O nível sérico de IL-33 foi comparável ao de controles sadios e não mostrou correlação com níveis de sST2, atividade lúpica ou acometimento de um órgão específico.⁴⁰ Nas espondiloartrites, níveis séricos de IL-33 foram significativamente maiores nos pacientes em comparação a controles. Os níveis séricos de ST2 diferiram entre pacientes com espondilite anquilosante e controles, mas não houve relação com atividade da doença. Ao contrário do que ocorre em pacientes com LES, em espondiloartrite, o receptor ST2 parece não atuar como marcador de atividade de doença.⁴¹

Terras e cols. encontraram níveis séricos elevados de IL-33 em pacientes com esclerose sistêmica em relação a controles sadios. Nesses pacientes, IL-33 se associou a doença precoce e ao acometimento microvascular. Esses autores acreditam que futuramente IL-33 auxiliará na predição do surgimento de úlceras digitais recorrentes.⁴²

Em jovens com artrite idiopática juvenil (AIJ) foi avaliada a ação da IL-33 e do seu receptor. Em 24 pacientes com a forma sistêmica, cinco com AIJ poliarticular associado ao fator reumatoide, quatro portadores de síndrome de ativação macrofágica e em 20 controles saudáveis foram medidos os níveis séricos de IL-33 e de sST2. Nos pacientes com AIJ sistêmica, os níveis séricos de IL-33 foram detectados em apenas quatro dos 24 pacientes analisados e essa citocina não se relacionou à atividade da doença ou aos níveis de sST2. Por outro lado, os níveis séricos da IL-33 estavam significativamente aumentados nos pacientes com AIJ poliarticular com fator reumatoide positivo em comparação com controles saudáveis. Os níveis séricos de sST2 em pacientes com síndrome de ativação macrofágica e nos pacientes com AIJ sistêmica em atividade eram significativamente maiores do que os de pacientes com AIJ poliarticular associada ao fator reumatoide e com os controles saudáveis. Níveis de sST2 normalizaram-se na fase de remissão nos casos de AIJ sistêmica. Na síndrome de ativação macrofágica os níveis séricos sST2 elevaram-se rapidamente e reduziram gradualmente após resolução clínica. Os mecanismos propostos para explicar a discrepância entre os níveis de IL-33 e sST2 na AIJ sistêmica consistem na formação de imunocomplexos da IL-33 com sST2 ou devido à função de receptor chamariz atribuído ao sST2, conforme já discutido. Os autores concluem que apesar do reduzido número de pacientes estudados, o

receptor ST2 pode ser um importante mediador na AIJ sistêmica, constituindo um promissor marcador da atividade da doença ou mesmo um novo alvo terapêutico.⁴³

Ainda no grupo das doenças reumáticas, IL-33 e o seu receptor têm sido relacionados às vasculites sistêmicas. Em pacientes com doença de Behçet, os níveis séricos de IL-33 foram superiores nos pacientes com doença ativa em comparação com controles saudáveis ou com aqueles com doença inativa.⁴⁴ Ciccia e cols. identificaram níveis significativamente maiores de IL-33 e ST2 nas artérias inflamadas de pacientes com arterite de células gigantes e os neovasos foram os principais locais de expressão da IL-33. Além disso, as artérias dos pacientes tratados com glicocorticoides apresentaram uma menor expressão de dessa citocina. Foi interessante notar que a expressão aumentada de IL-33 não esteve relacionada a um aumento concomitante das citocinas do grupo Th2, sugerindo que a IL-33 poderia agir precocemente na doença promovendo inflamação arterial e angiogênese, além de modular a resposta imune inata via regulação da ação de macrófagos.⁴⁵ Avaliando pacientes com púrpura de Henoch-Schönlein, Chen e cols. demonstraram que os níveis séricos de IL-33, mas não de sST2, estavam elevados em nesses pacientes na fase aguda da doença voltando aos níveis normais na fase de convalescença. Nessa análise, os níveis séricos dessa citocina estavam correlacionados com a gravidade da doença e com as concentrações séricas do anticorpo anti endotélio do tipo IgA e do anticorpo anticardiolipina IgA.⁴⁶

Além do mais, a participação da IL-33 já foi descrita em diversas outras doenças, de etiopatogênias distintas conforme mostrado na tabela 1.^{13,47-54}

Tabela 1. Participação da IL-33 e seu receptor ST2 em outras enfermidades.

| Enfermidade | Papel da IL-33 e do receptor ST2 |
|---|--|
| <i>Leishmania major</i> | Aumento da resistência conferida por anti-ST2 em modelo experimental |
| <i>Trichuris muris</i> | IL-33 confere resistência à infecção em camundongos |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | sST2 exacerba ceratite induzida por <i>P. aeruginosa</i> |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | Papel protetor da IL-33 contra infecção pelo <i>T. gondii</i> |
| Vírus respiratório sincicial | Redução da inflamação pulmonar por anticorpo anti-ST2 em modelo experimental |
| Vírus Influenzae | Regulação aumentada do RNAm da IL-33 nos pulmões de camundongos infectados |
| Doença de Alzheimer | Expressão cerebral reduzida do gene da IL-33 |
| Insuficiência renal crônica | Concentração sérica elevada de sST2 em relação a controles saudáveis Relação entre sST2 e gravidade da doença |
| Doença inflamatória intestinal | Regulação aumentada de IL-33 em células colônicas |
| Encefalite autoimune | Expressão aumentada de ST2 na medula espinhal de camundongos com encefalite autoimune Encefalite grave induzida por IL-33 em modelo experimental Exacerbação de encefalite em camundongos deficientes de ST2 |
| Pancreatite aguda | Elevação precoce de níveis séricos de sST2 Correlação entre sST2 e parâmetros de gravidade |
| Vírus da imunodeficiência humana | Elevação dos níveis séricos sST2 em pacientes com HIV Menores níveis séricos de IL-33 em pacientes com HIV comparados a controles saudáveis |
| Hepatite B | Níveis de IL-33 e sST2 séricos estão elevados em relação a controles saudáveis Redução dos níveis séricos de IL-33 com tratamento. |
| Hepatite C | Níveis séricos de IL-33 e sST2 aumentados em relação aos controles e àqueles com resolução espontânea da hepatite C Correlação positiva entre IL-33 e transaminases séricas |

INTERLEUCINA-33 e ARTRITE REUMATOIDE

O papel do complexo IL33/ST2 tem sido bastante discutido na AR principalmente a partir dos achados de que a expressão da IL-33 está aumentada na membrana sinovial.⁵⁵

Diversos estudos, utilizando modelos experimentais de artrite, têm avaliado a participação de IL-33 em quadros de inflamação articular. O primeiro estudo a avaliar a associação da IL-33 com processo inflamatório articular em modelos animais de artrite foi o de Damo e cols., quando descreveram o papel de IL-33 na artrite experimental induzida pelo colágeno (collagen induced arthritis - CIA) em camundongos. Estes autores demonstraram que a IL-33

aumentou a resposta no modelo de CIA através da ativação de mastócitos, os quais expressam elevada densidade de ST2. Os mecanismos propostos para a indução de inflamação articular pela IL-33 foram: ativação dos mastócitos e, com isso, produção de citocinas inflamatórias; aumento da secreção de IL-6 e IL-1beta por mastócitos ativados; ou estímulo de células T CD4+, o que levaria à produção de IL-5 e IL-13. Este último mecanismo aumentaria a ativação dos linfócitos B e a produção de imunoglobulinas, agravando a inflamação articular, estimulando a degranulação de mastócitos e a formação de complexos imunes com colágeno. Estes autores demonstraram que, nesse modelo experimental, os mastócitos são importantes, ainda que não essenciais para o desenvolvimento da artrite.²⁴

Em contrapartida, Lee e cols. mostraram que os animais deficientes em mastócitos eram completamente resistentes à indução de artrite.⁵⁶ As razões para esta diferença não são claras, mas podem dever-se ao fato de que os animais utilizados por Lee e cols. eram também deficientes em neutrófilos, ao contrário dos experimentos de Damo e cols. Isso poderia explicar os diferentes resultados, especialmente quando se considera o papel crítico de neutrófilos na patogênese da CIA.^{24,56}

Reforçando a função dos neutrófilos neste processo, Verri e cols. demonstraram que a IL-33 é um potente atrativo químico para neutrófilos no modelo experimental de artrite induzida pela albumina bovina metilada. A IL-33 foi produzida principalmente por FS e macrófagos através da resposta imune adaptativa. Embora a natureza exata da indução da síntese de IL-33 por essas células seja ainda desconhecida, ela provavelmente envolve o efeito de citocinas inflamatórias produzidas pelas células T e por macrófagos após o desafio com antígeno específico. Na presença da IL-33 há recrutamento de neutrófilos para o sítio articular através de, pelo menos, dois mecanismos: estimulação da produção por macrófagos e por sinoviócitos de TNF e IL-1beta, além dos receptores de superfície ligantes de citocinas do tipo CXCL1 e CCL3, os quais, por sua vez, permitiriam o recrutamento dos neutrófilos para o espaço articular ou ainda, a IL-33 poderia ativar diretamente os neutrófilos recrutando-os para o local da inflamação.⁵⁷

A demonstração da presença de IL-33 e ST2 na membrana sinovial de pacientes com AR, concomitantemente aos estudos experimentais, tem despertado grande interesse para o papel desse complexo na patogênese da doença.¹⁰

Palmer e cols. detectaram expressão de IL-33 em amostras de tecido sinovial humano, em cultura de FS de pacientes com AR e em culturas de FS de camundongos com artrite. A IL-33 também foi encontrada em células endoteliais do tecido sinovial normal e inflamado. FS

humanos de pacientes com AR expressaram constitutivamente níveis baixos dessa citocina e a expressão do RNAm e da proteína IL-33 aumentaram após o tratamento com IL-1beta ou TNF-alfa. Esses autores concluem que IL-33 é produzida localmente nos tecidos inflamados e que a sua neutralização pode exercer efeitos terapêuticos na AR.⁵⁸

O precursor de IL-33 foi detectado no sobrenadante de culturas de FS estimuladas com TNF e IL-1beta. Esses resultados indicam que a IL-33 é produzida localmente em articulações inflamadas e que neutralização da ação da IL-33 de tem um efeito terapêutico no curso da artrite. No modelo animal de CIA, administração de um anticorpo bloqueador do ST2 atenuou a severidade da artrite e reduziu a destruição articular, associando-se à diminuição na produção de INF-gama, bem como com uma redução na produção de IL-17. Além disso, os níveis de RNAm do ligante do fator nuclear ativador do receptor κ B (Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand – RANKL) na articulação foram reduzidos com o uso do anti-ST2. Esses resultados indicam que a IL-33 é produzida localmente em articulações inflamadas e que neutralização da ação da IL-33 tem um efeito terapêutico no curso da artrite.^{23,58}

In vivo, a expressão de IL-33 também é induzida em FS estimulados, sugerindo que a expressão pode ser mantida em um ambiente repleto de citocinas, promovendo a sustentação da inflamação crônica.¹⁰

O primeiro estudo a identificar níveis elevados de IL-33 no soro e no líquido sinovial de pacientes com AR foi o de Matsuyama e cols., ao compará-los com pacientes com doenças infecciosas e com indivíduos saudáveis. Em pacientes com AR, os níveis séricos de IL-33 se correlacionaram positivamente com a atividade da doença pelo score de atividade da doença em 28 articulações (Disease Activity Score 28 - DAS28). O número de articulações dolorosas e edemaciadas foi maior no grupo no qual se detectou IL-33, enquanto que os níveis de proteína C reativa (PCR), IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa não diferiram entre os grupos.⁵⁹

Hong e cols. também evidenciaram níveis séricos de IL-33 e sST2 significativamente maiores em pacientes com AR em relação a controles saudáveis. De interesse foi o fato de que os níveis séricos de IL-33, sST2, e de proteína C reativa (PCR) foram avaliados antes e após terapia com drogas modificadoras do curso da doença (DMCD). Dos dez pacientes estudados, nove receberam mais de um tipo de DMCD, incluindo metotrexato, hidroxicloroquina e sulfasalazina. Glicocorticoides foram administrados em doses baixas para todos os pacientes. Os níveis séricos de IL-33, sST2 e PCR diminuíram, após terapia com DMCD's nos pacientes com AR e foi encontrada relação positiva entre a redução da concentração de IL-33 e o valor da PCR após o tratamento. Não foi encontrada relação entre os valores de sST2 e as alterações

de concentração de PCR. Esses autores concluem que a IL-33 pode agir como uma citocina pró-inflamatória potente.¹⁰

Xiangyang e cols. analisaram os níveis de IL-33 no soro de pacientes com AR e, adicionalmente, investigaram a importância fisiopatológica dessa citocina. Os níveis séricos dessa citocina foram mais elevados em pacientes com AR do que em controles saudáveis, resultados semelhantes aos obtidos por Hong e cols.¹⁰ Foi encontrada correlação positiva e significativa entre níveis de IL-33, positividade para anticorpos contra proteínas citrulinadas e para fator reumatoide, e níveis de metaloproteinase (MMP) -3. Houve também uma forte correlação entre os níveis séricos de IL-33 e a pontuação do índice de Sharp modificado em pacientes com AR. Esses dados despertam grande interesse quanto à utilização da IL-33 como um marcador de prognóstico em AR, embora não tenha sido constatada, nesse estudo, correlação entre os níveis de IL-33 e outros parâmetros clínicos, como velocidade de hemossedimentação, PCR e DAS28. Neste estudo também foi demonstrado que o nível sérico de IL-33 encontrava-se significativamente aumentado nos pacientes com pneumopatia intersticial em comparação com pacientes sem acometimento pulmonar, sugerindo que a IL-33 estaria associada à doença pulmonar intersticial da AR.⁶⁰

Nosso grupo de pesquisa multidisciplinar vem conduzindo outros estudos sobre a IL-33 e o seu papel na resposta inflamatória, cujos resultados confirmam que a IL-33 interage de modo sinérgico com o antígeno, aumentando significativamente a produção de citocinas e quimiocinas em mastócitos. Os efeitos de baixas concentrações de IL-33 (70 pg/mL) e antígenos (3 ng/ml) sobre a produção de citocinas e quimiocinas foram avaliados em mastócitos retirados da medula óssea de ratos. Esses testes indicaram que IL-33 isoladamente induziu a produção de TNF-alfa, IL-6, IL-13, proteína quimotática de monócitos (MCP) 1 e 3 e proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa (MIP-1a) na mesma magnitude ou, no caso de IL-6 e IL-13, em maior extensão do que antígeno isolado.⁶¹

PERSPECTIVAS

AR é uma artropatia crônica associada a elevado dano articular, incapacidade e declínio funcional.⁶² Aliado ao melhor entendimento da sua fisiopatologia, a incorporação de tecnologias genéticas e moleculares têm permitido o desenvolvimento da terapêutica e melhorado o prognóstico dos pacientes. O uso de drogas sintéticas e, mais recentemente, das terapias imunobiológicas, com alvo no bloqueio de citocinas e células inflamatórias, foram determinantes para esse cenário.⁶³

Estudos recentes têm identificado diversas outras citocinas de interesse em AR, entre elas, a IL-33.⁶² A identificação do seu papel pró-inflamatório demonstrado, por exemplo, por sua expressão na sinóvia de pacientes com AR, indicam que a IL-33 pode constituir um alvo terapêutico podendo beneficiar pacientes para os quais os tratamentos atuais se mostram ineficientes.²⁴ Cria-se, entretanto, grande expectativa no caso da AR visto que as evidências relacionam potencial participação da IL-33 na fisiopatologia da doença e, por outro lado, também apontam para uma conexão benéfica com a aterosclerose.

Um grande desafio é definir os mecanismos e as vias reguladoras associados à liberação, ação e resposta da IL-33.⁶² O momento atual no tratamento da AR mostra que existem necessidades não atendidas, como o fato de que até um terço dos pacientes apresenta falha terapêutica aos agentes biológicos. Além disso, descortina-se um novo horizonte de descobertas fisiopatológicas em AR. Já contamos com o início do desenvolvimento e uso das chamadas “pequenas moléculas”, medicamentos que atuam sobre quinases intracelulares, tais como Syk e JAK.⁶³ O uso dessas moléculas baseia-se na identificação do papel crucial das quinases nos processos autoimunes em AR. A cascata de ativação dessas proteínas é responsável por conduzir informações decorrentes do estímulo no nível da membrana celular pelas citocinas até o núcleo celular.⁶³ Tofacitinibe, um inibidor da JAK3, encontra-se aprovado para o tratamento da AR e outros inibidores encontram-se sob investigação com perspectivas promissoras.^{63,64} Para o futuro, além da enorme área disponível para o papel das diferentes citocinas na AR, estamos no início da exploração das vias de sinalização. Ativação ou inibição de quinases específicas poderiam converter um estado inflamatório aberrante para o estado fisiológico funcional do ambiente sinovial.

Nesse sentido, a IL-33 configura-se como citocina pró-inflamatória crucial no estudo das vias de sinalização intracelular ao induzir a expressão de múltiplas respostas celulares através da ativação dos fatores de transcrição AP1, NF-κB e ATF. Esses fatores de transcrição regulam a

produção de MMPs, citocinas inflamatórias e moléculas de adesão, todos envolvidos na AR. Estudos elucidativos sobre a ação da IL-33 e as vias de sinalização intracelular por ela ativadas na AR ainda são esperados, com vistas a revelar todo o processo que se inicia a nível celular, bem como quais as vias de sinalização utilizadas e a resposta fenotípica resultante. Há a possibilidade de que a IL-33 ou seu receptor solúvel ST2 se mostrem marcadores biológicos de gravidade e prognóstico, ou mesmo possam se tornar alvos terapêuticos na AR. Espera-se que intervenções terapêuticas pontuais sejam possíveis, restabelecendo a homeostase imunológica sem interferência sobre mecanismos funcionais dos diversos tipos celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gregersen PK, Plenge RM, Gulko PS. Genetics of rheumatoid arthritis. In: Firestein G, Panayi G, Wollheim FA, editors. Rheumatoid arthritis. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2006. p. 3–14.
2. Gulko PS, Winchester RJ. Rheumatoid arthritis. In: Austen KF, Frank MM, Atkinson JP, Cantor H, editors. Samter's immunologic diseases. 6th ed. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins; 2001. p. 427–63.
3. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003 May; 423(6937):356-61.
4. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010 Jan;233(1):233-55.
5. Keystone EC, Shore A, Miller RG, Tan P, Poplonski L, Leary P, et al. Evidence for activated peripheral blood T-cells in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 1983 Dec;11:85-92.
6. Koetz K, Bryl E, Spickschen K, O'Fallon WM, Goronzy JJ, Weyand CM. T cell homeostasis in patients with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 Aug;97(16):9203-8.
7. Fekete A, Soos L, Szekanecz Z, Szabo Z, Szodoray P, Barath S, et al. Disturbances in B- and T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis: suggested relationships with antigen-driven immune responses. *J Autoimmun* 2007 Sep-Nov;29(2-3):154-63.
8. Bugatti S, Codullo V, Caporali R, Montecucco C. B cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2007 Dec;7(2):137-42.
9. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007 Jun;7(6):429-42.
10. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, et al. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci* 2011 Sep;26(9):1132-9.

11. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005 Nov;23(5):479-90.
12. Xu D, Jiang HR, Li Y, Pushparaj PN, Kurowska-Stolarska M, Leung BP, et al. IL-33 exacerbates autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 2010 Mar;184(5):2620-6.
13. Liew FY. IL-33: a Janus cytokine. *Ann Rheum Dis* 2012 Apr;71 Suppl 2:i101-4.
14. Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol* 2010 Feb;10(2):103-10.
15. Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, Wilmore JR, Lawrence DA, Massa PT. Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia. *J Leukoc Biol* 2008 Sep;84(3):631-43.
16. Kakkar R, Lee RT. The IL-33/ST2 pathway: therapeutic target and novel biomarker. *Nat Rev Drug Discov* 2008 Oct;7(10):827-40.
17. Smithgall MD, Comeau MR, Yoon BR, Kaufman D, Armitage R, Smith DE. IL-33 amplifies both T(h)1- and T(h)2-type responses through its activity on human basophils, allergen-reactive T(h)2 cells, iNKT and NK Cells. *Int Immunol* 2008 Aug;20(8):1019-30.
18. Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K, Kita H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 2008 Jun;121(6):1484-90.
19. Löhning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, et al. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 Jun;95(12):6930-5.
20. Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, Iwahana H, Yanagisawa K, Ohno S, et al. Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Jul;164(2):277-81.
21. Suzukawa M, Koketsu R, Iikura M, Nakae S, Matsumoto K, Nagase H, et al. Interleukin-33 enhances adhesion, CD11b expression and survival in human eosinophils. *Lab Invest* 2008 Nov;88(11):1245-53.

22. Pushparaj PN, Tay HK, H'ng SC, Pitman N, Xu D, McKenzie A, et al. The cytokine interleukin-33 mediates anaphylactic shock. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 Jun;106(24):9773-8.
23. Bourgeois E, Van LP, Samson M, Diem S, Barra A, Roga S, et al. The pro-Th2 cytokine IL-33 directly interacts with invariant NKT and NK cells to induce IFN-gamma production. *Eur J Immunol* 2009 Apr;39(4):1046-55.
24. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Aug;105(31):10913-8.
25. Ali S, Huber M, Kollwe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Nov;104(47):18660-5.
26. Ho LH, Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Suto H, Iikura M, et al. IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-Fc epsilon RI signals. *J Leukoc Biol* 2007 Dec;82(6):1481-90.
27. Moulin D, Donzé O, Talabot-Ayer D, Mézin F, Palmer G, Gabay C. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* 2007 Dec;40(3):216-25.
28. Ali S, Huber M, Kollwe C, Bischoff SC, Falk W, Martin MU. IL-1 receptor accessory protein is essential for IL-33-induced activation of T lymphocytes and mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Nov;104(47):18660-5.
29. Allakhverdi Z, Smith DE, Comeau MR, Delespesse G.. Cutting edge: the ST2 ligand IL-33 potently activates and drives maturation of human mast cells. *J Immunol* 2007 Aug;179(4):2051-4.
30. Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT. IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J Clin Invest* 2007 Jun;117(6):1538-49.
31. Rui T, Zhang J, Xu X, Yao Y, Kao R, Martin CM. Reduction in IL-33 expression exaggerates ischaemia/reperfusion-induced myocardial injury in mice with diabetes mellitus. *Cardiovasc Res* 2012 May;94(2):370-8.

32. Miller AM, Liew FY: The IL33/ST2 pathway – a new therapeutic target in cardiovascular disease. *Pharmacol Therap* 2011 Feb;131(2):179-86.
33. Miller AM, Xu D, Asquith DL, Denby L, Li Y, Sattar N, et al. IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J Exp Med* 2008 Feb;205(2):339-46.
34. Demyanets S, Konya V, Kastl SP, Kaun C, Rauscher S, Niessner A, et al. Interleukin-33 induces expression of adhesion molecules and inflammatory activation in human endothelial cells and in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 Sep;31(9):2080-9.
35. Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, Sugiyama Y. Expression and function of the ST2 gene in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2002 Oct;32(10):1520-6.
36. Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, et al. IL-33 induces antigen-specific IL-5+ T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* 2008 Oct;181(7):4780-90.
37. Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 2005 Jun;5(6):446-58.
38. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA Jr, Auxiliadora-Martins M, et al. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med* 2010 Jun;16(6):708–12.
39. Kunes P, Holubcová Z, Kolácková M, Krejsek J. The counter-regulation of atherogenesis: a role for interleukin-33. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2010;53(3):125-9.
40. Mok MY, Huang FP, Ip WK, Lo Y, Wong FY, Chan EY, et al. Serum levels of IL-33 and soluble ST2 and their association with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2010 Mar;49(3):520-7.
41. Li GX, Wang S, Duan ZH, Zeng Z, Pan FM. Serum levels of IL-33 and its receptor ST2 are elevated in patients with ankylosing spondylitis. *Scand J Rheumatol* 2013;42(3):226-31.
42. Terras S, Opitz E, Moritz RK, Högtermann S, Gambichler T, Kreuter A. Increased serum IL-33 levels may indicate vascular involvement in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2013 Jan;72(1):144-5.

43. Ishikawa S, Shimizu M, Ueno K, Sugimoto N, Yachie A. Soluble ST2 as a marker of disease activity in systemic juvenile idiopathic arthritis. *Cytokine* 2013 May;62(2):272-7.
44. Hamzaoui K, Kaabachi W, Fazaa B, Zakraoui L, Mili Boussen I, Haj Sassi F. Serum IL-33 levels and skin mRNA expression in Behçet's disease. *Clin Exp Rheumatol* 2013 Mar. [Epub ahead of print].
45. Ciccia F, Alessandro R, Rizzo A, Raimondo S, Giardina A, Raiata F, et al. IL-33 is overexpressed in the inflamed arteries of patients with giant cell arteritis. *Ann Rheum Dis* 2013 Feb;72(2):258-64.
46. Chen T, Jia RZ, Guo ZP, Cao N, Li MM, Jiao XY. Elevated serum interleukin-33 levels in patients with Henoch-Schönlein purpura. *Arch Dermatol Res* 2013 Mar;305(2):173-7.
47. Le Goffic R, Arshad MI, Rauch M, L'Helgoualc'h A, Delmas B, Piquet-Pellorce C, et al. Infection with influenza virus induces IL-33 in murine lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011 Dec;45(6):1125-32.
48. Chapuis J, Hot D, Hansmannel F, et al. Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 2009;14:1004–16.
49. Bao YS, Na SP, Zhang P, Jia XB, Liu RC, Yu CY, Mu SH, Xie RJ. Characterization of interleukin-33 and soluble ST2 in serum and their association with disease severity in patients with chronic kidney disease. *J Clin Immunol*. 2012 Jun;32(3):587-94.
50. Jiang HR, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, et al. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- γ production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* 2012 Jul;42(7):1804-14.
51. Ouziel R, Gustot T, Moreno C, Arvanitakis M, Degré D, Trépo E, et al. The ST2 pathway is involved in acute pancreatitis: a translational study in humans and mice. *Am J Pathol* 2012 Jun;180(6):2330-9.
52. Miyagaki T, Sugaya M, Yokobayashi H, Kato T, Ohmatsu H, Fujita H, et al. High levels of soluble ST2 and low levels of IL-33 in sera of patients with HIV infection. *J Invest Dermatol* 2011 Mar;131(3):794-6.
53. Juan Wang, Yanjun Cai, Huifan Ji, Junyan Feng, Desalegn Admassu Ayana, Junqi Niu, et al. Serum IL-33 Levels Are Associated with Liver Damage in Patients with Chronic Hepatitis B. *J Interferon Cytokine Res*. 2012 June; 32(6): 248–253.

54. Juan Wang, Pingwei Zhao, Hui Guo, Xiguang Sun, Zhenyu Jiang, Lijun Xu, et al. Serum IL-33 Levels Are Associated with Liver Damage in Patients with Chronic Hepatitis C. *Mediators Inflamm.* 2012; 2012: 819636.
55. Murphy GE, Xu D, Liew FY, McInnes IB. Role of interleukin 33 in human immunopathology. *Ann Rheum Dis* 2010 Jan;69 Suppl 1:i43-47.
56. Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science* 2002 Sep;297(5587):1689-92.
57. Verri WA Jr, Souto FO, Vieira SM, Almeida SC, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 2010 Sep;69(9):1697-703.
58. Palmer G, Talabot-Ayer D, Lamacchia C, Toy D, Seemayer CA, Viatte S, et al. Inhibition of interleukin-33 signaling attenuates the severity of experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2009 Mar;60(3):738-49.
59. Matsuyama Y, Okazaki H, Tamemoto H, Kimura H, Kamata Y, Nagatani K, et al. Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2010 Jan;37(1):18-25.
60. Xiangyang Z, Lutian Y, Lin Z, Liping X, Hui S, Jing L. Increased levels of interleukin-33 associated with bone erosion and interstitial lung diseases in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine.* 2012 Apr;58(1):6-9.
61. Andrade MV, Iwaki S, Ropert C, Gazzinelli RT, Cunha-Melo JR, Beaven MA. Amplification of cytokine production through synergistic activation of NFAT and AP-1 following stimulation of mast cells with antigen and IL33. *Eur J Immunol* 2011 Mar;41(3):760-72.
62. McInnes IB, O'Dell JR. State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010 Nov; 69(11): 1898-1906.
63. Kyttaris VC. Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs. *Drug Des Devel Ther* 2012 Sep; 6:245-50.

64. Yamaoka K, Tanaka Y. Targeting the Janus kinases in rheumatoid arthritis: focus on tofacitinib. *Expert Opin Pharmacother* 2013 Nov. [Epub ahead of print].

ARTIGO 2: ESTUDO MORFOFUNCIONAL COMPARATIVO ENTRE FIBROBLASTOS SINOVIAIS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E DE MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE

Rafaela Bicalho Viana Macedo¹, Adriana Maria Kakehasi², Marcus Vinicius Melo de Andrade³

1. Médica, especialista em Reumatologia. Mestranda pelo Programa de Saúde do Adulto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.
2. Professora Adjunta, Departamento do Aparelho Locomotor, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.
3. Professor Associado, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

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

Autor responsável:

Marcus Vinicius Melo de Andrade

Avenida Alfredo Balena, 190 – sala 290

Santa Efigênia

Belo Horizonte – MG

CEP 30130-100

andradem@medicina.ufmg.br

Os autores declaram a inexistência de conflitos de interesse.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Erosão óssea e destruição articular são resultantes finais do processo inflamatório sinovial característico da artrite reumatoide (AR). Fibroblastos sinoviais (FS) ativados contribuem ativamente para a inflamação, angiogênese e degradação da matriz extracelular através da produção de citocinas inflamatórias, fatores pró-angiogênicos e metaloproteinases (MMPs). Fibroblastos sinoviais podem ser ativados por interleucina 33 (IL-33), um novo membro da família da interleucina 1 (IL-1), estimulando-os a produzir MMPs e citocinas inflamatórias como interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa). Vários estudos utilizaram FS obtidos de modelo de murino em substituição a FS de pacientes com AR para estudar o papel destas células na fisiopatologia da AR. Entretanto, poucos estudos têm estabelecido a comparação morfofuncional entre as células humanas e de camundongos.

OBJETIVOS: Comparar a morfologia de FS humanos de pacientes com AR e de camundongos com artrite induzida pelo colágeno (CIA) por microscopia óptica e eletrônica de varredura e de transmissão. Estudar a produção de IL-6, TNF-alfa e MMPs 1 e 3 por FS no período basal e após estimulação com IL-33, TNF-alfa e IL-1beta.

MÉTODOS: Foram extraídos FS de amostras de tecido e de líquido sinovial de pacientes com AR em atividade, além de amostras de tecido sinovial provenientes de camundongos com CIA. Após cultivo, as culturas foram avaliadas por microscopia óptica e eletrônica de varredura e de transmissão. As concentrações basais de IL-6 foram avaliadas nos FS humanos e murinos. Os FS de modelo de CIA foram estimulados por 18 horas com IL-33 nas doses de 1, 3, 10, 30 e 100ng/mL e a produção de TNF-alfa e IL-6 foi identificada pela técnica de ELISA. FS humanos receberam estímulo com IL-33 10ng/mL e as concentrações de IL-6 foram dosadas após 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas. FS humanos também foram estimulados com TNF-alfa e IL-1b nas doses 0,5; 1, 5 e 10 ng/mL cada um isoladamente por 18 horas e a produção de MMP 1 e 3 foi analisada por ELISA.

RESULTADOS: FS humanos e murinos exibiram morfologia ultraestrutural semelhante, com citoplasma abundante e presença de corpúsculos lamelares. Em células não estimuladas a concentração de IL-6 foi muito elevada em FS murinos e humanos. Concentrações de MMP-1 e -3 também estavam aumentadas em células humanas não estimuladas. Em FS murinos a adição de IL-33 aumentou os níveis de IL-6 de modo dependente da dose, o que não foi

observado em humanos. Os FS de pacientes com AR não produziram MMP-1 ou 3 quando estimuladas com IL-33, mas apenas quando estimulado com TNF-alfa e IL-1beta.

CONCLUSÃO: Análises morfológica e funcional demonstraram que FS humanos de pacientes com AR e de camundongos com artrite induzida pelo colágeno são semelhantes para estudos em AR. A IL-33 participa da fisiopatologia da AR provocando aumento da concentração de IL-6 e das MMPs 1 e 3 pelas células estimuladas com IL-33. Esses dados auxiliam no entendimento da fisiopatologia da AR e fornecem novas perspectivas de tratamento para esses pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: artrite reumatoide, artrite experimental, interleucina 33, sinalização intracelular, fibroblasto, cultura de células.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Bone erosion and joint destruction are final results of synovial inflammation of rheumatoid arthritis (RA). Activated Synovial fibroblasts (SF) contribute actively to inflammation, angiogenesis, and extracellular matrix degradation through production of inflammatory cytokines, pro-angiogenic factors and matrix metalloproteinases (MMPs). Synovial fibroblasts can be activated by interleukin 33 (IL-33), a new member of the family of interleukin 1 (IL-1), stimulating them to produce MMPs and inflammatory cytokines such as interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF alpha). Several studies utilize fibroblast-like synoviocytes from mice arthritis model in substitution of synoviocytes from RA patients to study the role of these cells in the pathophysiology of RA. However, few studies have compared the morphology and the stimuli response of these cells obtained from human and mice.

OBJECTIVES: To compare the morphology and stimuli response of fibroblast-like synoviocytes from RA patients and from mice with collagen-induced arthritis. Culture of fibroblast-like synoviocytes will be examined by optical and electron microscopy (EM) and the production of IL-6, TNF-alpha and MMPs-1 and -3 will be determined after stimulation with IL-33, TNF-alpha and IL-1beta.

METHODS: Fibroblast-like synoviocytes were extracted from tissue samples and synovial fluid of patients with RA in activity, as well as from synovial tissue samples from mice with

collagen-induced arthritis (CIA). Culture of fibroblast-like synoviocytes were examined by optical and electron microscopy. Basal levels of IL-6 were evaluated in murine and human SF. The CIA model SF were stimulated for 18 hours with IL-33 at doses 1, 3, 10, 30 and 100ng/ml TNF-alpha and IL-6 was identified by ELISA. Human SF received stimulation with 10ng/mL IL-33 and IL-6 concentrations were measured after 1, 3, 6, 9, 12 and 24 hours. Also SF were stimulated with human TNF-alpha and IL-1b at doses of 0.5, 1, 5 and 10 ng/ml each alone for 18 hours, and production of MMP 1 and 3 was analyzed by ELISA.

RESULTS: Human and murine synovial fibroblasts exhibited similar ultrastructural morphology with abundant cytoplasm and presence of lamellated corpuscles. In non-stimulated cells the concentration of IL-6 was very high in fibroblast-like synoviocytes from mice and human. MMP-1 and -3 were also increased in human non-stimulated cells. In fibroblast-like synoviocytes from mice, but not human, the addition of IL-33 increased the levels IL-6 in a dose-dependent manner. Cells from human did not produce either MMP-1 or 3 when stimulated with IL-33 but only when stimulated with TNF-alpha and IL-1beta.

CONCLUSION: Morphological and functional analyzes showed that FS from human RA patients and from mice with collagen-induced arthritis studies are similar to RA studies.

IL33 participates in the pathophysiology of rheumatoid arthritis causing an increase of IL-6 and MMPs 1 and 3 cells stimulated with IL-33. These data help in understanding the pathophysiology of RA and provide new perspectives of treatment for these patients.

KEY WORDS: rheumatoid arthritis, experimental arthritis, interleukin 33, intracellular signaling, fibroblast, cell culture.

INTRODUÇÃO

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica crônica de etiologia autoimune. Afeta cerca de 1% da população mundial. Apesar de todos os esforços dispensados, persistem lacunas no conhecimento a serem compreendidas quanto à patogênese e tratamento da AR, acarretando grande morbimortalidade aos pacientes.^{1,2} Na AR, a membrana sinovial (MS) é sede das alterações anatômicas. Nessa membrana encontramos duas camadas: a camada superficial de revestimento, composta por fibroblastos sinoviais (FS) e macrófagos sinoviais.³ Na AR, FS ativados são detectados precocemente na camada de células de revestimento sendo um dos tipos celulares dominantes nos locais de lesão da cartilagem e do osso adjacente, apresentando um fenótipo caracterizado por baixa susceptibilidade à apoptose e crescimento independente da ancoragem.^{1,2}

Experimentos demonstraram que FS de pacientes com AR e aqueles cultivados *in vitro* retêm o fenótipo agressivo na ausência de estimulação exógena imprimindo a essas células o título de protagonistas nos processos fisiopatológicos da AR.⁴⁻⁶ FS estão envolvidos na produção de metaloproteinases (MMPs), as quais apresentam importância fundamental na fisiopatologia da AR ao promoverem proteólise e remodelamento tecidual. As MMPs mais importantes em AR são as collagenases (MMP-1, MMP-13) e a estromelisina (MMP-3).⁷ Paralelamente, os FS da MS produzem citocinas essenciais na cascata inflamatória da AR, tais como fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucina 1 beta (IL-1beta), interleucina 6 (IL-6) e parecem ser importantes na promoção da erosão óssea através da secreção do ligante do fator nuclear ativador do receptor κ B (RANKL), promovendo a diferenciação do osteoclasto.^{1,8}

Recentemente demonstrou-se que FS podem constituir uma fonte importante de IL-33 na sinóvia reumatoide. A expressão dessa citocina é induzida em FS estimulados nos quais também encontramos o receptor da IL-33, receptor ST2.⁹

IL-33 é um novo membro da família da IL-1, considerada importante citocina mediadora do processo inflamatório.¹⁰

Estudos em modelo experimental de artrite demonstraram que a IL-33 aumentou a resposta inflamatória através da ativação de mastócitos e promoveu migração de neutrófilos para o tecido articular.^{11,12}

Em pacientes com AR, os níveis de IL-33 se encontram elevados no soro e no líquido articular em comparação com controles saudáveis. Níveis séricos dessa citocina se correlacionaram positivamente com atividade clínica da AR, progressão radiográfica e

acometimento pulmonar. Acredita-se que a neutralização da IL-33 em FS pode exercer efeitos terapêuticos na AR.^{13,14}

Assim, evidências da participação dos FS na AR, aliado às lacunas no conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessa colagenose, despertam o interesse para o estudo funcional dos FS, em especial dos FS sob exposição à IL-33.

Todo o avanço no conhecimento fisiopatológico da AR contou com a utilização de modelos experimentais de artrite. Embora nenhum modelo experimental mimetize completamente a AR em seres humanos, a artrite induzida por colágeno (CIA) em murinos tem se tornado o modelo mais comumente adotado.¹⁵

A análise morfológica comparativa dos FS sinoviais de camundongos com CIA com FS de indivíduos com AR é etapa determinante na validação do modelo animal como fonte de FS para estudos em AR. FS de CIA nunca foram avaliados à microscopia eletrônica. Assim, avaliação por microscopia óptica e eletrônica pode permitir a caracterização dos FS possibilitando a utilização de células animais como modelo de estudo de uma doença humana. Este estudo avalia as características morfológicas de FS provenientes de líquido e de tecido sinovial de pacientes com AR, bem como de FS de camundongos com CIA, contribuindo para a validação do modelo experimental e estabelecendo a correspondência dessas células em duas espécies geneticamente distintas. A demonstração da participação da IL-33 em diversas doenças inflamatórias e o reconhecimento do receptor ST2 em FS motivaram a avaliação funcional desses FS após estímulo com IL-33, a fim de colaborar para a elucidação da intrincada rede fisiopatológica da AR.

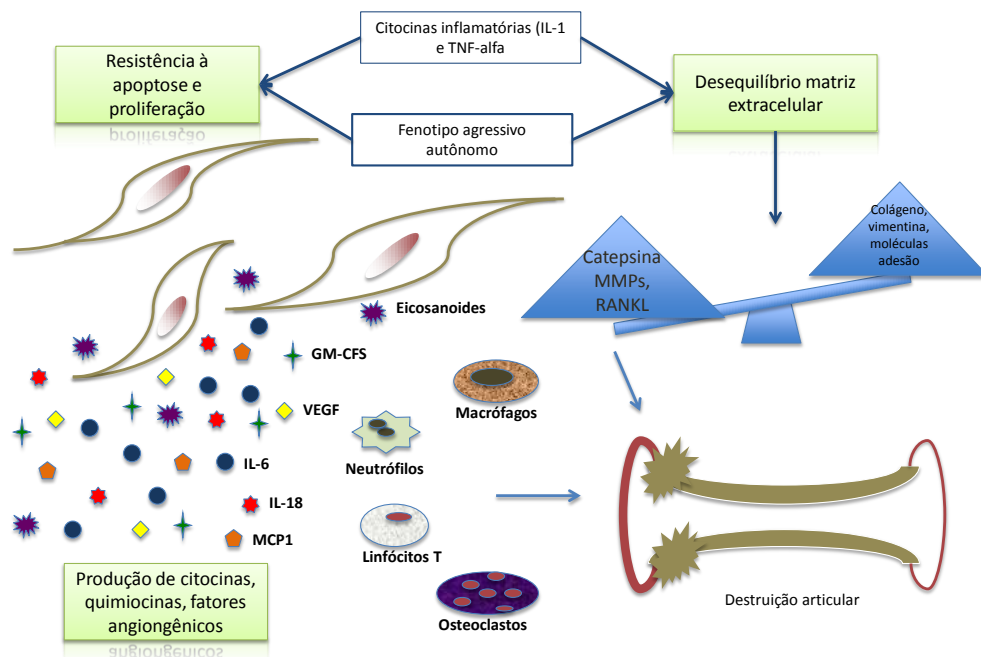


Figura 1. Características e aspectos fenotípicos dos fibroblastos sinoviais na artrite reumatoide. GM-CSF: granulate-macrophage stimulating factor; VEGF: vascular endothelial growth factor; MCP-1: monocyte chemoattractant protein 1; IL-6: interleucina 6; IL-18: interleucina 18.

MÉTODO

Culturas de fibroblastos sinoviais humanos

Foram obtidos FS humanos a partir de amostras de líquido sinovial e de tecido sinovial de pacientes com AR definida segundo os critérios do Colégio Americano de Reumatologia de 1987 ou do Colégio Americano de Reumatologia/Liga Europeia contra o Reumatismo de 2010.

Os pacientes envolvidos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, antes de qualquer procedimento do estudo.

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

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

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

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

Para a obtenção das amostras de tecido sinovial, pacientes submetidos à artroplastia de joelho ou quadril doaram o excedente sinovial ressecado. Após a coleta, o fragmento removido era transportado ao LabCir imerso em meio DMEM em frascos estéreis a 4°C. Na amostra cirúrgica a sinóvia foi separada das estruturas cartilaginosas e adiposas adjacentes e o conteúdo sinovial foi cortado em pedaços de dois milímetros com ajuda de tesoura cirúrgica esterilizada. Após, seguiu-se incubação com colagenase tipo IV (Sigma n° cat. C5138) a 0,1% em meio DMEM por duas horas em agitação de 100 rpm a 37°C. Ao término da digestão com colagenase, o material era centrifugado e o sedimento transferido para garrafa de cultura imerso em meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino, 1% de solução estreptomicina/penicilina/anfotericina B e 1% de aminoácidos não essenciais. Toda a manipulação foi feita em capela de fluxo laminar (VECO) empregando-se técnica asséptica.

Culturas de fibroblastos de camundongos com artrite induzida por colágeno

Para a confecção do modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) foram utilizados camundongos DBA1/J (8-12 semanas, peso médio 20 gramas). Os animais foram mantidos durante o experimento, em caixas plásticas de 30x20x12 cm forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 18 e 22°C. A água e a ração eram administradas *ad libidum*. Este estudo obedeceu à Legislação Brasileira e do Código Estadual

de Proteção aos Animais, (Lei 11794/ 2008), com políticas locais no cuidado e uso de animais de acordo com os códigos relacionados à prática.¹⁶

A artrite foi induzida por colágeno bovino tipo II (Chondrex; Redmond, WA; cat n° 20022) conforme explicitado a seguir. Os animais foram anestesiados com inalação de isoflurano e imunizados com emulsão de 50 mcL contendo volumes iguais de colágeno bovino tipo II (2 mg/ml) e adjuvante completo de Freund (Sigma, n° cat. F5881) por injeção intradérmica a uma distância de 1,5 cm da base da cauda no dia zero. O reforço da imunização foi realizado no 18° dia com a mesma concentração de colágeno bovino do tipo II emulsificado com adjuvante incompleto de Freund (Sigma, n° cat. F5506). Os camundongos foram novamente anestesiados e a injeção foi administrada por via intradérmica na base cauda distalmente ao primeiro local da injeção. Após dez dias procedeu-se ao sacrifício por deslocamento cervical e o tecido sinovial foi retirado das articulações (femorotibial, tibio-tarsal e rádio-cárpica) e colocado em placas de seis poços com uma solução de colagenase I (Sigma n° cat. C5138) a 1mg/ml e incubadas a 37°C com agitação por uma hora em estufa com 5% de CO₂.

Em seguida, o sobrenadante foi coletado e centrifugado a 1100 rpm por dez minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o líquido foi desprezado e o material sedimentado, suspenso novamente em meio de cultura DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Fetal Bovine Serum, Sigma n° cat. F-0643), 1% de solução estreptomicina/penicilina/anfotericina B (Gibco, n° cat. 15245-012) e 1% de aminoácidos não essenciais (Gibco, n° cat. 11140-050). Toda a manipulação foi feita em capela de fluxo laminar (VECO) empregando-se técnica asséptica.

Culturas de FS murinos foram doadas pelo Laboratório de Doenças Autoimunes do Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

Após atingir confluência, as células eram lavadas com PBS, submetidas à remoção enzimática com solução de tripsina a 0,05 % em EDTA 0,02 % (Trypsin-EDTA, Gibco n° cat. 25300-

062) a 37°C durante quatro minutos e semeadas em três garrafas de mesmo tamanho. Esse processo foi realizado de quatro a oito vezes para as culturas humanas e 27 a 38 vezes para as culturas animais.

As culturas foram avaliadas por microscopia invertida diariamente para avaliação do crescimento e morfologia celular, além da averiguação da presença de contaminação. Garrafas cujas células não exibiam configuração fusiforme típica a partir da quarta passagem eram excluídas.

Para os experimentos, foram utilizadas culturas humanas entre a 4ª e 8ª passagens e culturas de camundongo entre a 23ª e 38ª passagens.

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

Para cada experimento foram preparadas quatro placas de cultura de células de 24 poços cada. Alguns poços foram utilizados para o grupo controle, sem estimulação, na qual foi feita apenas a troca do meio.

O processo de estimulação tinha início com a retirada do meio DMEM em cada poço seguido pela lavagem com PBS por duas vezes com substituição por novo DMEM enriquecido com 1% de soro fetal bovino e 1% de solução estreptomicina/penicilina/anfotericina B. A seguir cada poço recebeu IL-33 nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e 100 ng/mL e o sobrenadante foi colhido após 18 horas para a detecção da IL-6 e TNF-alfa no modelo de CIA e MMP 1 e 3 nos FS humanos. FS humanos foram estimulados com IL-33 na dose 10ng/mL com dosagem de IL-6 nos tempos 1, 3, 6, 9, 12 e 24 horas. FS humanos também foram estimulados com IL-1b ou TNF-alfa nas concentrações 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 ng/mL para a coleta de MMP 1 e 3. Todas as dosagens foram feitas através da técnica de ELISA conforme recomendações do fabricante (RD system). As amostras foram estocadas em freezer -80°C até o momento das dosagens.

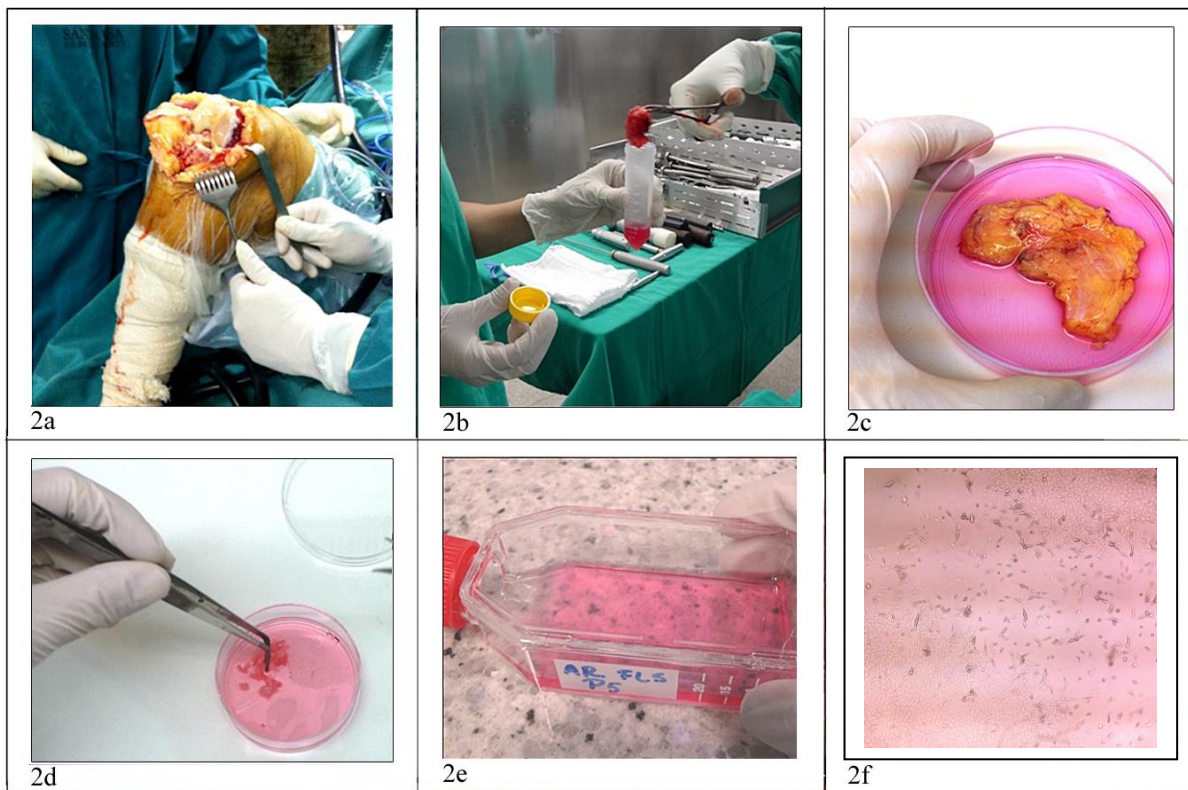


Figura 2. Preparação da amostra sinovial e aspecto da cultura celular na terceira passagem. 2a: artroplastia total em joelho direito em paciente com artrite reumatoide. Imagem das estruturas intrarticulares. 2b: coleta de amostra de tecido sinovial. 2c: material cirúrgico proveniente de articulação coxofemoral de paciente com artrite reumatoide contendo membrana sinovial e tecido adiposo imersos em meio de cultura DMEM. 2d: preparação da amostra de tecido sinovial. 2e: garrafa de cultura de células contendo cultura de fibroblastos sinoviais. 2f: cultura de fibroblastos sinoviais de tecido humano de paciente com artrite reumatoide. Terceira passagem. Microscópio Zeiss. Aumento de 10 vezes.

Análise Morfológica

Microscopia Óptica

Culturas de FS humanos e de camundongos acima descritas foram avaliadas sob microscopia óptica. Culturas de FS humanos na sétima passagem provenientes de tecido sinovial, na quinta passagem oriundos do líquido articular e na 30ª passagem provenientes de membrana sinovial de camundongos com CIA foram submetidos à coloração por Giemsa, Hematoxilina ou Hematoxilina/Eosina (HE) e analisadas sob microscopia óptica no Microscópio Zeiss.

Microscopia Eletrônica

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para análise sob MEV, foram preparadas culturas de FS de camundongos com artrite induzida por colágeno na 38ª passagem e de FS humanos provenientes de líquido sinovial na sétima passagem e de membrana sinovial na 4ª passagem provenientes de pacientes com AR. FS foram cultivados sobre lamínulas tratadas com poly-L-Lisina e, após fixação celular, procedeu-se aspiração do meio de cultura DMEM e lavagem com PBS. A seguir as culturas foram imersas em Glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato 0,1M. Após 120min a solução de fixação foi aspirada e substituída por tampão Cacodilato 0,1M. As culturas foram mantidas a 4°C até a transferência ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais. As células foram visualizadas no microscópio eletrônico de varredura FEG - Quanta 200 FEI.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a análise sob MET em FS humanos, utilizou-se cultura de FS na sexta passagem proveniente de tecido sinovial e na sétima passagem proveniente de líquido sinovial. Para a análise sob MET em cultura de camundongo com artrite induzida por colágeno, utilizou-se cultura na 29ª passagem.

Para a preparação de todas as culturas acima, procedeu-se aspiração do meio de cultura DMEM seguido pela lavagem com PBS. A seguir as culturas foram fixadas por 120 minutos com Glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato 0,1M.

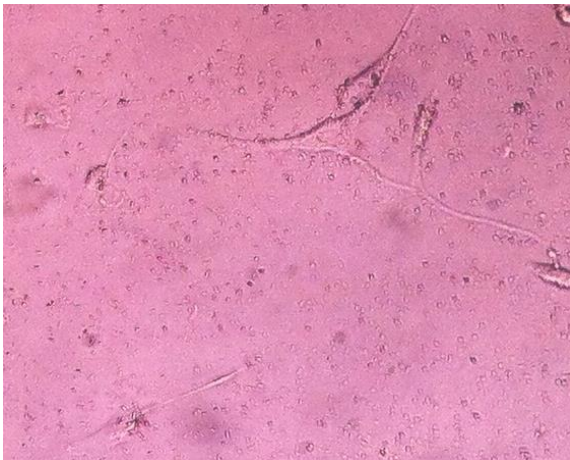
Após fixação, as células em cultura foram raspadas com auxílio da espátula para raspagem de cultura de células (Sigma, 195 x 14 mm, 150/cs) e acondicionadas em tubos Falcon estéreis de 50 ml e submetido à centrifugação por 10 minutos na velocidade de 1200 rpm. O sedimento foi transferido para tubos Ependorff com capacidade para 1,5 ml e encobertos pela solução tampão Cacodilato 0,1M. O material foi acondicionado em caixas térmicas em temperatura de 4°C e transferido ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais para análise por MET. As células foram visualizadas no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 SpiritBiotwin FEI - 120 kV.

RESULTADOS

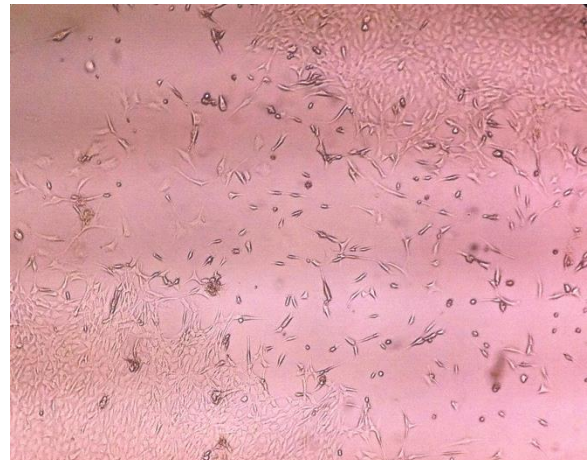
CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

Microscopia Óptica

Na avaliação morfológica por microscopia óptica invertida, as culturas provenientes de tecido e líquido sinovial de portadores de AR exibiam, a partir da quarta passagem, uma população de FS fusiformes com núcleo alongado central e expansão citoplasmática formando ramificações. Alguns FS exibiam aspecto polidendrítico com ramificações curtas e outras alongadas fazendo comunicação com células vizinhas. Essa morfologia se manteve semelhante nas passagens quatro a oito e 27 a 38 nas culturas humanas e animais, respectivamente (Figuras 3, 4 e 5).

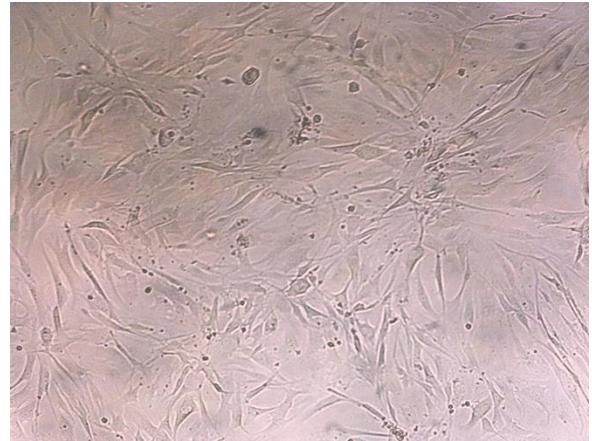


3a



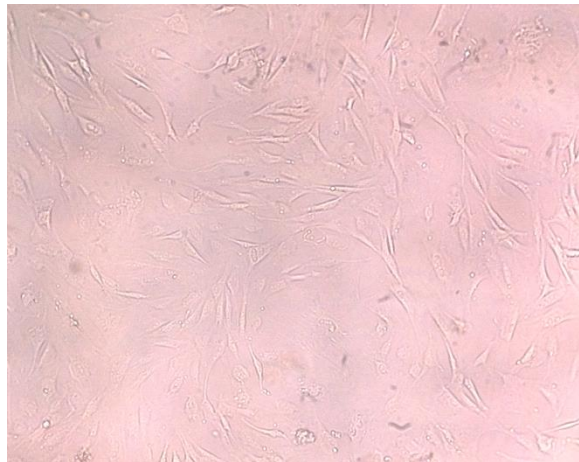
3b

Figura 3. Cultura de células sinoviais provenientes de tecido sinovial de paciente com artrite reumatoide. 3a: células na primeira passagem, presença de debris teciduais, células esféricas correspondendo provavelmente a macrófagos e células fusiformes compatíveis com fibroblastos sinoviais. Visualização sob microscopia óptica invertida (aumento de 4 vezes). 3b: células na terceira passagem. Observar a proliferação celular a partir de dois implantes teciduais. Visualização sob microscopia óptica invertida (aumento de 4 vezes).

4^a

4b

Figura 4. Cultura de fibroblastos sinoviais provenientes de líquido sinovial paciente com artrite reumatoide. 4a: células na primeira passagem. Atentar para a presença de células alongadas com morfologia típica dos fibroblastos ao lado de células arredondadas compatíveis com macrófagos e para a ausência de debris teciduais. Visualização sob microscopia óptica invertida (aumento de 4 vezes). 4b: células na quinta passagem. Visualização sob microscopia óptica invertida (aumento de 4 vezes).



5

Figura 5. Cultura de fibroblastos sinoviais provenientes de tecido sinovial de camundongo DBA com artrite induzida por colágeno. Células na 37^a passagem; cultura em semi-confluência, aspecto semelhante à cultura de células humanas sob microscopia óptica invertida; aumento de 4 vezes.

Os FS de tecido sinovial humanos foram submetidos à coloração por Giemsa e evidenciou-se cor azulada intensa no citoplasma correspondente a elementos de pH básico, devido à produção de componente basofílico da matriz extracelular (Figura 6a). A coloração por HE

confirmou a basofilia celular com intensa coloração avermelhada dos núcleos celulares (Figura 6b).

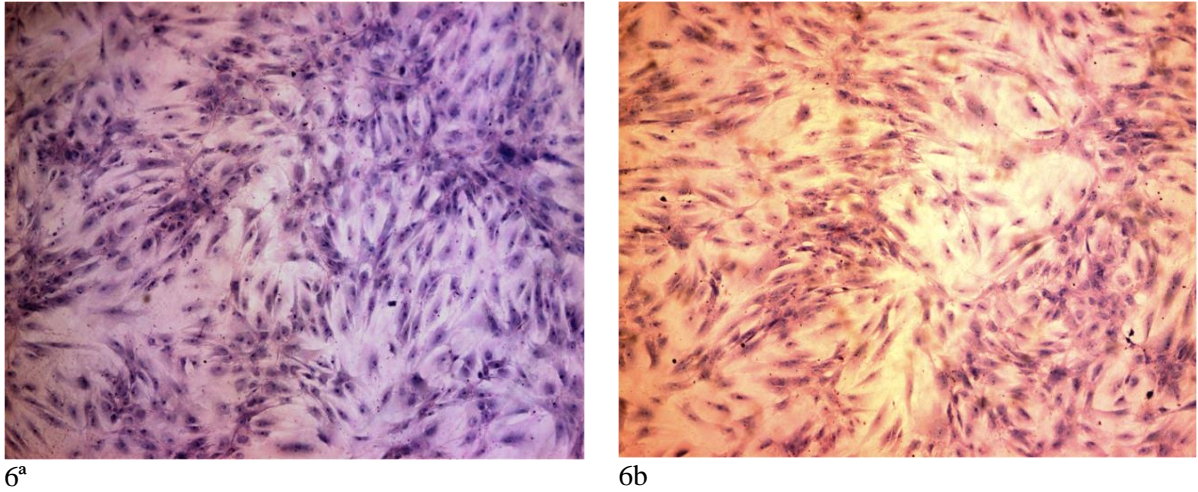
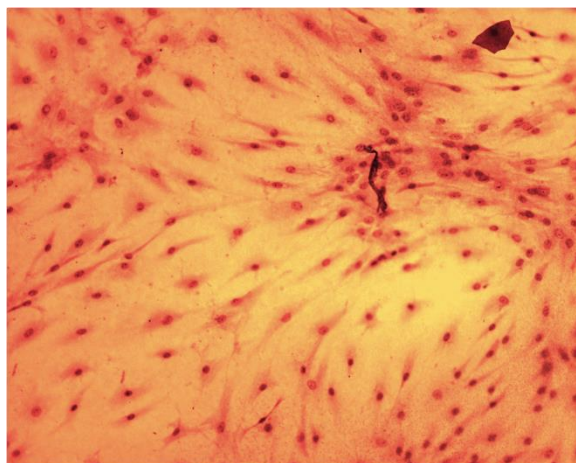


Figura 6. Análise por microscopia óptica de cultura de fibroblastos sinoviais de paciente com artrite reumatoide na sétima passagem. 6a: coloração por Giemsa, aumento 50 vezes. 6b. Coloração por Hematoxilina e Eosina; aumento de 50 vezes.

FS humanos na quinta passagem provenientes de líquido articular de pacientes com AR exibiam cor avermelhada no núcleo celular sob coloração com Hematoxilina, confirmando a basofilia celular.



7

Figura 7: análise por microscopia óptica de cultura de fibroblastos sinoviais de líquido articular de paciente com artrite reumatoide na quinta passagem. Coloração por Hematoxilina; aumento 50 vezes.

FS de camundongos com CIA na 30ª passagem exibiam configuração fusiforme com núcleo central e prolongamentos formando ramificações. Nas células murinas observaram-se células com núcleos de forma mais esférica do que os encontrados em células humanas, bem como uma relação núcleo/citoplasma maior.

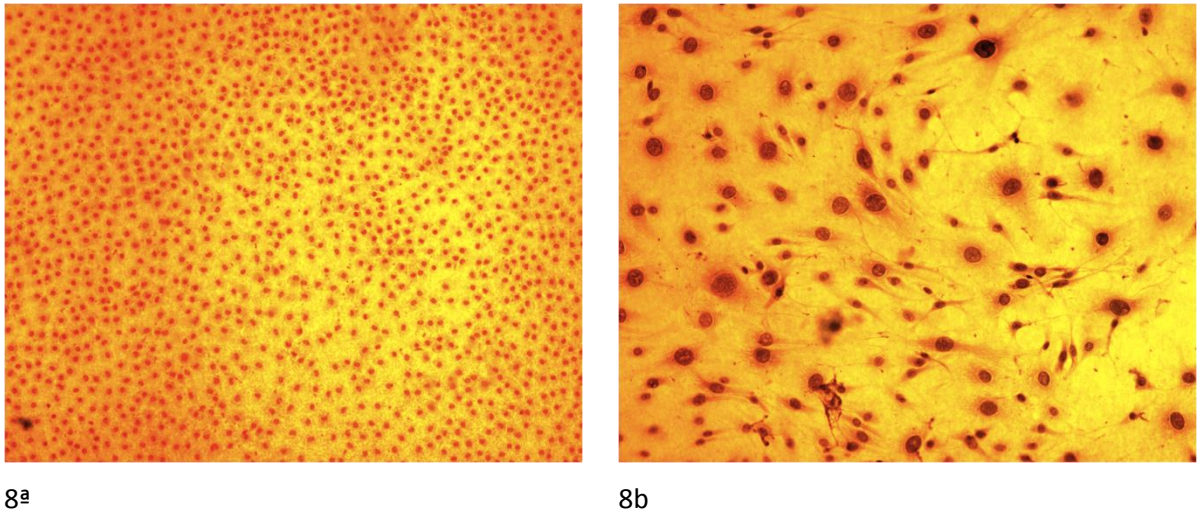


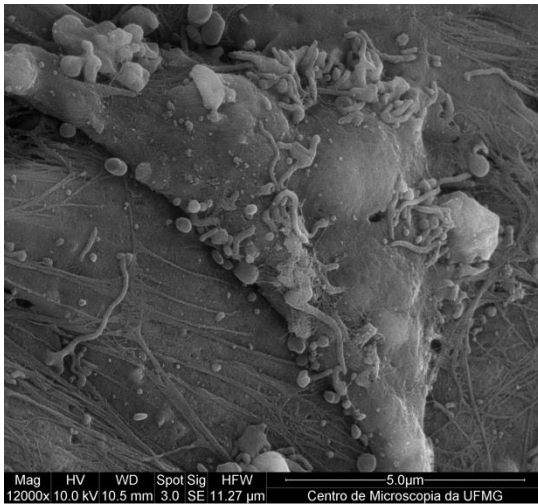
Figura 8. Fibroblastos sinoviais de camundongos com artrite induzida por colágeno. 8a: aumento original de 50 vezes. 8b: aumento original de 100 vezes.

Microscopia Eletrônica

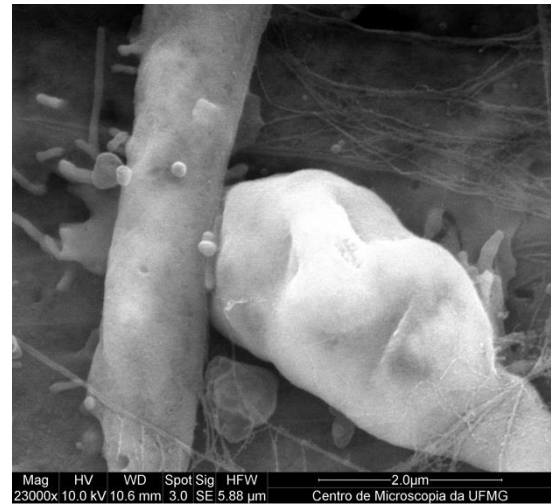
Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

MEV evidenciou que FS humanos e de camundongos apresentam ancoramento ao substrato com inúmeras projeções citoplasmáticas nas extremidades da *lamellipodia*, estrutura proteica do citoesqueleto composta de actina que se projeta na extremidade móvel da célula. *Lamellipodia* impulsiona toda a estrutura da célula através do substrato.¹⁷

Nesta análise a superfície celular evidenciou estruturas globulares em média de 500 a 1000 nm de diâmetro. As projeções citoplasmáticas terminais e *filopodia*, projeções citoplasmáticas finas que se estendem além da borda líder de *lamellipodia* nas células em migração, frequentemente encontravam-se ancoradas em células vizinhas (Figuras 9 a 11).

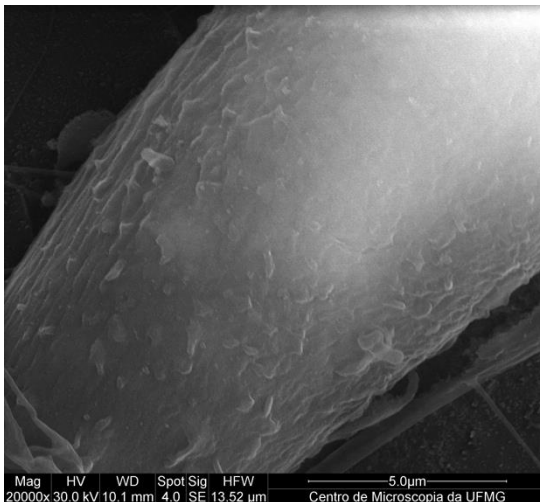


9a

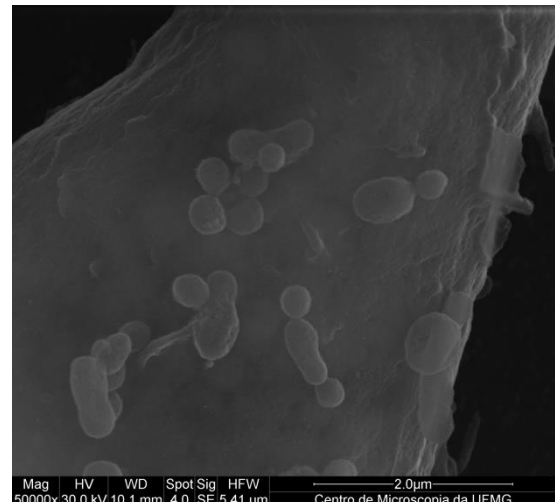


9b

Figura 9. Avaliação de fibroblastos sinoviais humanos na sétima passagem oriundos de membrana sinovial por microscopia eletrônica de varredura. 9a: imagem de uma célula com prolongamentos citoplasmáticos e numerosas vesículas em sua superfície. 9b: imagem de duas células em íntimo contato.



10a



10b

Figura 10. Avaliação de fibroblastos sinoviais humanos oriundos do líquido sinovial na sétima passagem por microscopia eletrônica de varredura. 10a: imagem de prolongamento citoplasmático. Presença de grânulos correspondendo à exocitose de vesículas. 10b: imagem dos grânulos em maior aumento.

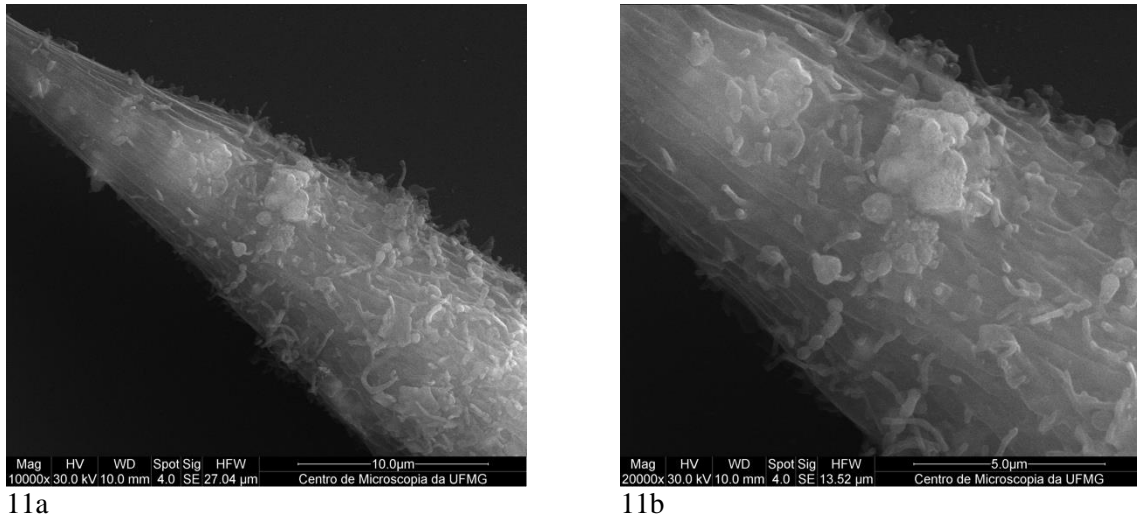


Figura 11. Avaliação de fibroblastos sinoviais de camundongos com artrite induzida por colágeno na 38ª passagem por microscopia eletrônica de varredura. 11a: imagem de prolongamento citoplasmático. Presença de grânulos correspondendo a excitose de vesículas 11b: imagem dos grânulos em maior aumento. Estruturas semelhantes às estruturas humanas.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A avaliação dos FS por MET demonstrou que, em todas as amostras, as células exibiam característica de alta atividade celular, evidenciada por retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi proeminentes e bem desenvolvidos. Foi observada alta concentração de microfilamentos e inclusões citoplasmáticas lipídicas. Foram vistos FS adjacentes em íntimo contato através das projeções citoplasmáticas, correspondente a regiões eletrodensas nos locais das junções gap.

Em todas as amostras analisadas foram encontrados corpúsculos lamelares em abundância, esses consistem em estruturas cavitárias com paredes circulares em justaposição, exclusivas dos FS da MS interna. Corpúsculos lamelares com diferentes fases de maturação foram encontrados na mesma célula (Figuras 12 a 14).

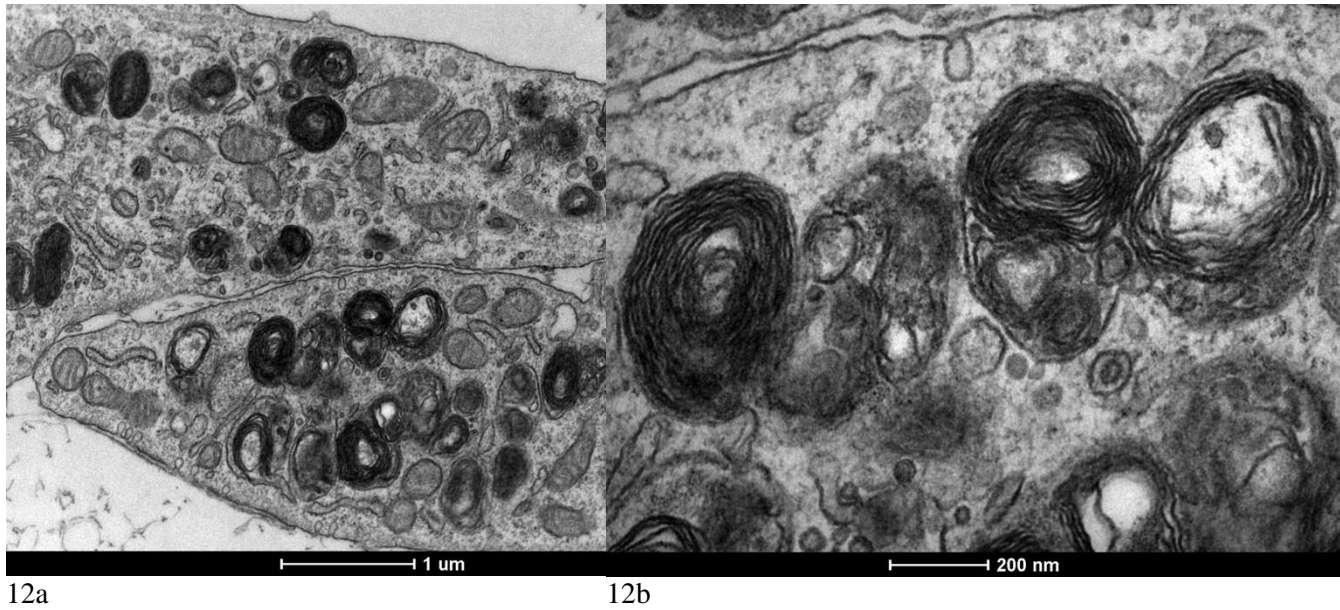


Figura 12: Análise por microscopia eletrônica de fibroblastos sinoviais humanos na sexta passagem proveniente de membrana sinovial de paciente com artrite reumatoide. 12a: imagem do citoplasma onde se observa a presença de grânulos, retículoendoplasmático rugoso e complexo de Golgi; célula com alta atividade secretiva. 12b: imagem de corpúsculos lamelares agrupados.

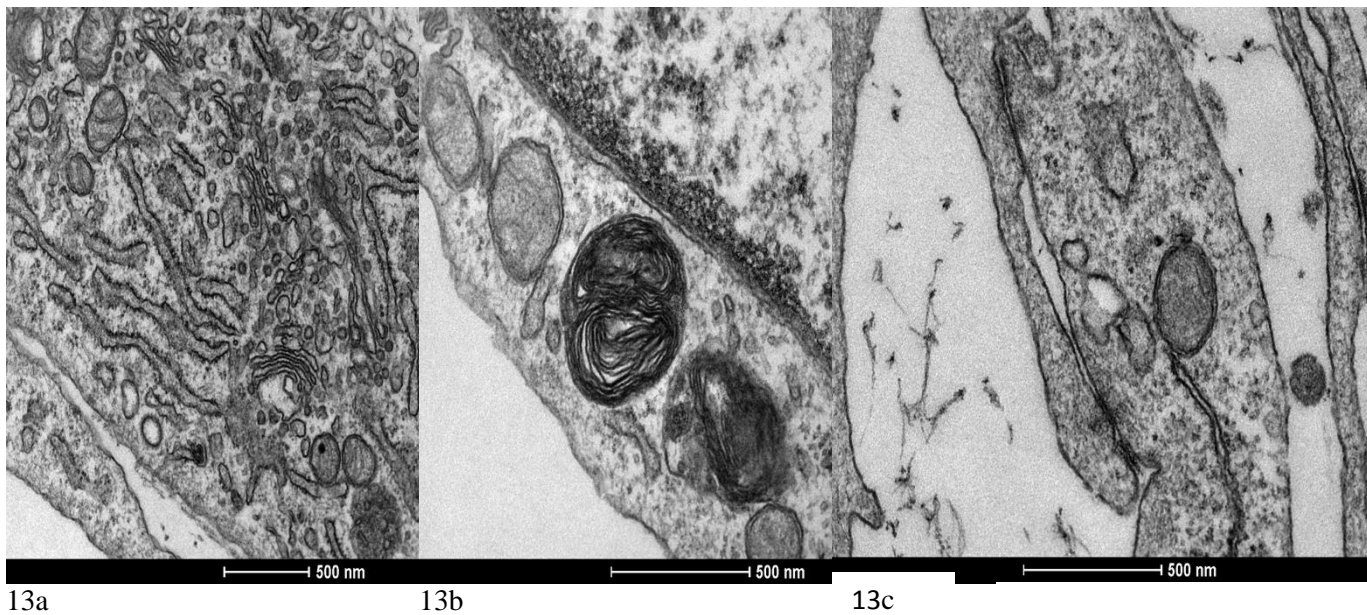
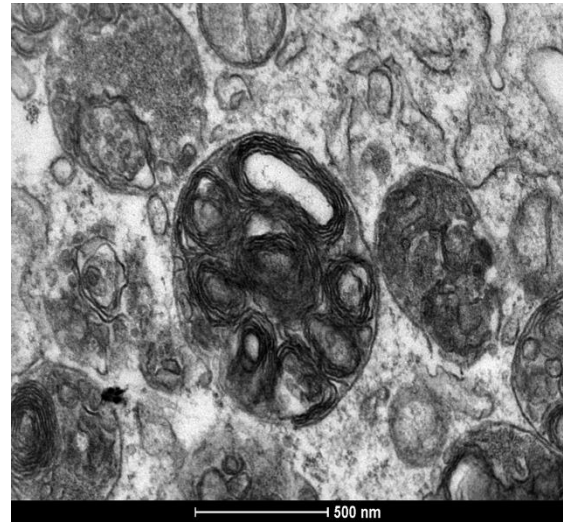


Figura 13: Análise por microscopia eletrônica de fibroblastos sinoviais humanos na sétima passagem provenientes de líquido articular de paciente com artrite reumatoide. 13a: imagem do citoplasma com presença de grânulos, retículoendoplasmático rugoso e complexo de Golgi; célula com alta atividade secretiva. 13b: imagem de corpúsculos lamelares agrupados. 13c: imagem de duas células em íntimo contato. Atentar para a presença de regiões eletrodensas nos pontos de maior contato.



14a



14b



14c



14d

Figura 14. Análise por microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos sinoviais de camundongo na 28ª passagem. 14a: imagem do citoplasma. Presença de grânulos, retículoendoplasmático rugoso e complexo de Golgi; célula com alta atividade secretiva. 14b: imagem de corpúsculos lamelares agrupados. 14c: imagem de um corpúsculo lamelar. Atentar para a presença de paredes concêntricas. 14d: imagem do citoplasma com vesícula sofrendo exocitose.

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

Efeito do estímulo com IL-33 sobre a produção de IL-6 em fibroblastos de modelo de CIA

Fibroblastos de modelo CIA não estimulados apresentaram produção média de IL-6 de 73,9 (\pm 10,4) ng/mL. Após dezoito horas de estímulo com IL-33 nas doses de 1, 3, 10 e 30 ng/mL as concentrações médias de IL-6 no sobrenadante dos FS de camundongo foram de 60,1 (\pm 19,1); 75,5 (\pm 8,0); 124,7 (\pm 31,9); 220,6 (\pm 3,0); 224,7 (\pm 25,7) ng/mL, respectivamente (Figura 15).

Não foi detectado nível de TNF-alfa basal ou após estímulo com IL-33.

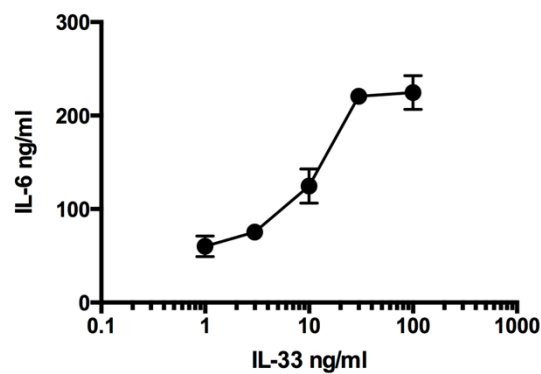


Figura 15. Produção de IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais de camundongos com artrite induzida pelo colágeno na 27ª passagem com IL-33 por 18 horas.

IL-33: interleucina 33; IL-6: interleucina 6

Efeito do estímulo com IL-33 na concentração de 10ng/mL sobre a produção de IL-6 em fibroblastos humanos de paciente artrite reumatoide

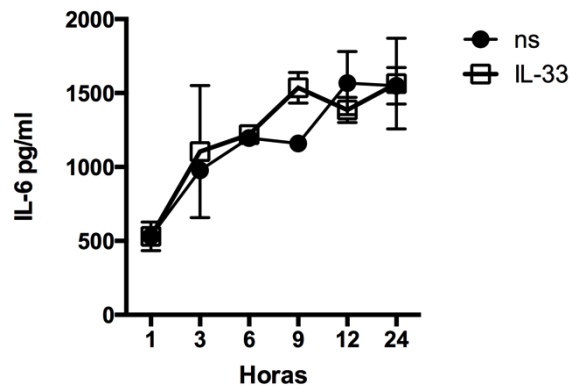


Figura 16. Produção de IL-6 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de paciente com artrite reumatoide na 7ª passagem com IL-33 10ng/mL nos tempos 1, 3, 6, 9, 12, 24 horas. IL-33: interleucina 33; IL-6: interleucina 6

A produção basal média de IL-6 por FS humanos de paciente com AR foi 1549 (\pm 122,9) pg/mL e por FS de camundongos com CIA foi de 73,94 (\pm 4,0) ng/mL.

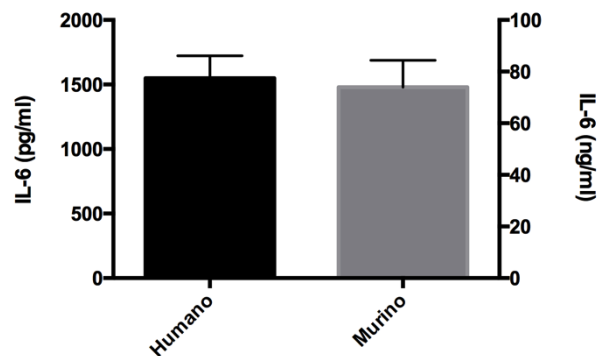


Figura 17. Produção basal de IL-6 em fibroblastos sinoviais humanos de paciente com artrite reumatoide na 7ª passagem e em fibroblastos sinoviais de camundongos com artrite induzida pelo colágeno na 27ª passagem. IL-6: interleucina 6

Efeito do estímulo com IL-33, TNF-alfa e IL-1 beta sobre a produção de MMP 1 e 3 em FS humanos.

As concentrações de MMP1 nos FS humanos foram de 10,6; 9,64 ($\pm 1,12$); 10,21 ($\pm 1,13$); 10,14 ($\pm 1,13$); 8,45 ($\pm 0,38$) ng/mL após estimulação com IL-33 nas doses 1, 3, 10, 30 e 100 ng/ml respectivamente (Figura 18).

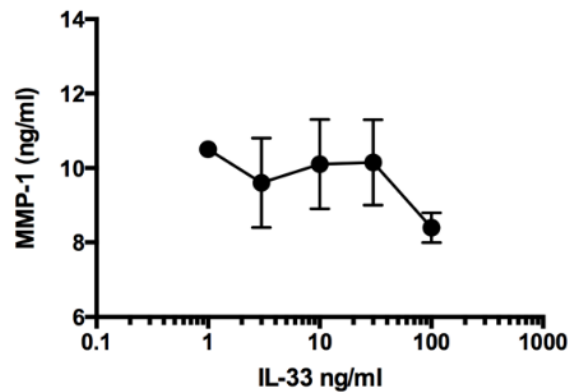


Figura 18. Produção de MMP 1 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos de pacientes com artrite reumatoide na sétima passagem com IL-33 por 18 horas.
IL-33: interleucina 33; MMP 1: metaloproteinase 1

Em relação às concentrações de MMP1 nos FS humanos após estímulo com TNF-alfa, os resultados foram 11,77 ($\pm 0,85$); 12,11 ($\pm 0,24$); 12,90 ($\pm 0,51$); 14,72 ($\pm 0,35$) e 16,07 ($\pm 0,96$) ng/mL para as doses 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 ng/ml, respectivamente (Figura 19).

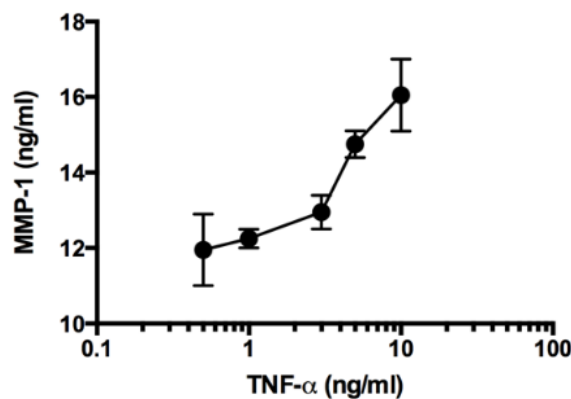


Figura 19. Produção de MMP 1 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos na sétima passagem com TNF-alfa por 18 horas.
IL-33: interleucina 33; TNF-alfa: fator de necrose tumoral alfa

Após estimulação por IL-1 beta, as dosagens de MMP 1 foram 12,2 (\pm 0,3); 21,4 (\pm 0,9); 19,7 (\pm 0,7); 19,45 (\pm 0,85), 17,6 (\pm 1,8) e 17,79 (\pm 0) ng/mL nas doses de estimulação de 0,1; 0,5; 1; 5 e 10 ng/ml, respectivamente (Figura 20).

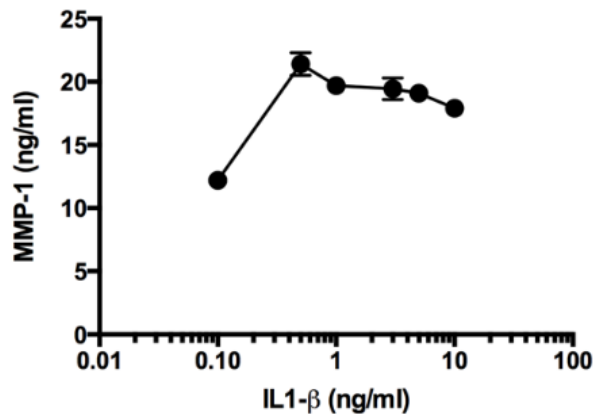


Figura 20. Produção de MMP 1 após estimulação de cultura de fibroblastos sinoviais humanos na sétima passagem com IL-1 beta por 18 horas.
IL-33: interleucina 33; IL-1 beta: interleucina 1 beta

As dosagens de MMP3 basal e após estímulo com IL-33, TNF-alfa e IL-1 beta ultrapassaram o limite de detecção do Kit..

DISCUSSÃO

A AR é uma doença que acomete particularmente seres humanos. A adoção de modelos experimentais dessa doença tem propiciado avanços na elucidação dos seus mecanismos fisiopatológicos, além do desenvolvimento da grande maioria dos medicamentos específicos. Entretanto, nenhum modelo experimental é realmente idêntico à doença ou prediz de forma consistente os efeitos terapêuticos de diferentes drogas em seres humanos.

Diversos modelos de artrite em animais têm sido adotados como correspondente à AR, incluindo aqueles desenvolvidos em camundongo, rato, coelho e macaco. O modelo de CIA em camundongos DBA/IJ emerge como o principal modelo de estudo dessa enfermidade. Em parte, a escolha dos modelos mais apropriados se baseia nas semelhanças entre os mecanismos da doença nos animais e no humano. Assim, a CIA tem como base o

envolvimento do sistema imune adaptativo, com a presença de respostas características dos linfócitos T e B. Desse modo, o modelo CIA deveria ser útil somente ao estudo do efeito de drogas que interfiram nesse eixo da resposta imune.¹⁸

Adicionalmente, a ampla análise das características filogenéticas comparando primatas, carnívoros e roedores, realizada por Cannarozzi e colaboradores, demonstrou que existe estreita relação entre humanos e cães, enquanto os roedores apresentaram grande distância filogenética dos humanos.¹⁹ Como correspondente clínico, demonstrou-se que o metotrexate, droga padrão-ouro para o tratamento da AR, é pouco eficaz no modelo animal utilizando camundongos. Os antiinflamatórios não-esteroidais, por sua vez, são extremamente efetivos no modelo animal, enquanto trazem apenas alívio parcial em humanos.¹⁸

As divergências entre os modelos animais e a doença humana podem resultar no abandono do estudo de drogas que poderiam inovar a terapêutica em humanos e, da mesma forma, levar a frente programas de desenvolvimento de medicamentos que, além de ineficazes, poderiam ser deletérios à saúde humana.

Nesse sentido, a adoção do modelo experimental de artrite em camundongos poderia não ser o modelo mais adequado. O presente trabalho, na sua primeira etapa, avaliou as características morfológicas dos FS de modelo animal de CIA, comparando-os aos exemplares celulares obtidos de dois sítios diferentes, líquido e membrana sinovial de pacientes com AR. Nossos resultados demonstram semelhança ultraestrutural entre os FS humanos de membrana e líquido sinovial oriundos de portadores de AR e de membrana sinovial de murinos com CIA, respaldando a adoção do modelo experimental em camundongo, principalmente quando se pretende avaliar essas células ou seus produtos.

Os primeiros estudos com FS datam do início da década de 70 e, logo a seguir, surgiram as primeiras observações da atividade dessas células na AR.^{20,21} Os FS são as células mais comuns nos locais de erosão articular pois, sabidamente detentores de grande capacidade destrutiva sobre a cartilagem, invadindo o tecido através da produção de MMP. Na AR, essas células adquirem fenótipo autônomo, se tornam resistentes à apoptose e contribuem para a hiperplasia sinovial, além de produzirem citocinas e quimiocinas, exacerbando o processo inflamatório local.

Embora diversos estudos prévios atestarem a predominância de FS em culturas de células sinoviais humanas a partir da quarta passagem, a preocupação em demonstrar a origem sinovial dos FS em culturas celulares foi importante para a validação desta pesquisa.^{22,23} Diversas metodologias têm sido utilizadas para confirmar a origem sinovial dessas células e a

pureza das culturas mas a utilização de marcadores de superfície, como a caderina-11, vem sendo o método mais comumente utilizado.^{3,24,25} Entretanto, a adoção da caracterização ultraestrutural por microscopia eletrônica permitiu, além da certificação da autenticidade dos fibroblastos, a verificação do estado funcional e das relações que os FS exibiam em cultura. A análise por MET evidenciou a presença de corpúsculos lamelares no citoplasma dos FS humanos oriundos de líquido e de tecido sinovial e igualmente nos FS derivados da MS de camundongos com artrite induzida por colágeno. Esses corpúsculos são estruturas específicas dos fibroblastos da MS, encontrados somente nas células da camada íntima, e representam organelas de armazenamento de substância surfactante, importante componente do líquido sinovial.²⁶ Descreve-se assim, mais uma forma de caracterização celular para estudos com FS que poderia, inclusive, dispensar a pesquisa da caderina-11. Assim, embora a análise por microscopia óptica tenha evidenciado diferenças morfológicas no tamanho do núcleo e na relação núcleo/citoplasma entre os FS humanos e de camundongos, a análise por microscopia eletrônica permitiu atestar a semelhança ultraestrutural entre essas duas populações celulares. A análise por MET demonstrou que tanto os FS humanos quanto murinos apresentavam corpúsculos lamelares, citoplasma rico em retículo endoplasmático rugoso e complexos de Golgi exuberantes, o que caracteriza células com alta atividade funcional e grande capacidade adesiva.²⁶

A MEV evidenciou as mesmas projeções de superfície nos FS humanos e murinos, que devem corresponder à iminência da exocitose dos corpos lamelares, permitindo demonstrar mais uma semelhança estrutural das células, além de comprovar a atividade funcional das mesmas. Da mesma forma, o presente estudo mostrou semelhança morfológica ultraestrutural entre os FS oriundos do líquido e do tecido sinovial, o que corrobora achados prévios disponíveis que validam a utilização de fluido sinovial para a obtenção de FS humanos.²⁷

No presente estudo, as avaliações morfológicas e funcionais foram realizadas entre a quarta e a nona passagens, uma vez que avaliações anteriores demonstraram que FS humanos se tornam quiescentes e pouco adequados para estudo após a nona passagem.²⁸ Ao contrário dessas células, FS murinos do modelo experimental mantiveram a capacidade funcional preservada por muitas passagens conforme atestado pelas elevadas concentrações de IL-6 produzida pelas células não submetidas a estímulos.

FS humanos e murinos se comportaram como expressivos produtores de IL-6, citocina central na AR.^{29,30} O bloqueio da IL-6 nessa doença tem se mostrado efetivo na redução dos sintomas e das deformidades articulares.²⁵ A confirmação de que FS produzem IL-6 reforçam a atuação

dessas células nas alterações inflamatórias descritas na AR. A demonstração de que a produção de IL-6 é aumentada em ambiente repleto de IL-33 na CIA indica o papel potencial que a IL-33 assume na resposta inflamatória desse modelo.

Da mesma forma, a demonstração de que FS humanos produzem grandes quantidades de MMPs 1 e 3 fortalece o papel determinante exercido por essas células na sinovite e no dano estrutural observados na AR.

Esses resultados corroboram a importância dos FS na AR e suscitam questionamentos se a atuação sobre o complexo FS/IL-33 poderia favorecer o controle dos sintomas e do dano estrutural, visto que a IL-33 demonstrou ser um forte estimulante da produção de IL-6 nos FS de CIA mas não de IL-6 ou MMP-1 nos FS de humanos com AR.

Dando continuidade ao presente estudo, novas dosagens serão realizadas procedendo-se à diluição das amostras a fim de detectar se o estímulo com IL-33 leva a aumento da produção dessas enzimas no modelo CIA, como ocorre com IL-6.

De acordo com os nossos resultados sobre a ação da IL-33 em FS demonstra-se que essa citocina talvez não seja um mero reflexo do ambiente inflamatório da AR mas que, pelo contrário, exerça um papel ativo na perpetuação da sinovite.

A próxima etapa de estudo do nosso grupo objetiva a avaliação das vias de sinalização intracelular decorrentes do estímulo com IL-33. Temos interesse na avaliação da via JNK uma vez que essa cascata leva à ativação de AP-1, um dos fatores de transcrição mais importantes na regulação dos genes das MMP e, portanto, intimamente relacionado à capacidade invasiva dos FS.

Outras possibilidades são a avaliação da densidade de expressão dos receptores ST2 nos FS, uma vez que a ação da IL-33 depende da presença do seu receptor, e a experimentação utilizando o sST2, receptor chamariz da IL-33, portanto, capaz de bloquear seus efeitos.

Os resultados deste estudo trazem conclusões corroboradas pela literatura e apontam para o amplo campo de investigação na fisiopatologia e no tratamento da AR.

CONCLUSÕES

A comparação morfológica por microscopia óptica e eletrônica de FS humanos e murinos com CIA evidenciou a semelhança dessas células e atestou a origem sinovial das mesmas.

A avaliação funcional comprovou a alta secreção basal de IL-6 por essas células. A IL-33 estimulou a secreção basal de IL-6 nos FS do modelo de CIA mas não se demonstrou efeito

semelhante nos FS humanos. FS revelaram alta secreção basal de MMP 1 e 3 que foi aumentada após estímulo com TNF-alfa mas não com IL-33 ou IL-1beta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neumann E, Lefèvre S, Zimmermann B, Gay S, Müller-Ladner U. Rheumatoid arthritis progression mediated by activated synovial fibroblasts. *Trends Mol Med* 2010 Oct;16(10):458-68.
2. Niedermeier M, Pap T, Korb A. Therapeutic opportunities in fibroblasts in inflammatory arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010 Aug;24(4):527-40.
3. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2010 Jan;233(1):233-55.
4. Firestein, G. S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996 Nov;39(11):1781-90.
5. Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 1996 Nov;149(5):1607-15.
6. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med* 2009 Dec;15(12):1414-20.
7. Hammaker D, Sweeney S, Firestein GS. Signal transduction networks in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003 Nov;62 Suppl 2:ii86-9.
8. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol* 2013 Jan;9(1):24-33.
9. Hong YS, Moon SJ, Joo YB, Jeon CH, Cho ML, Ju JH, et al. Measurement of interleukin-33 (IL-33) and IL-33 receptors (sST2 and ST2L) in patients with rheumatoid arthritis. *J Korean Med Sci* 2011 Sep;26(9):1132-9.
10. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005 Nov;23(5):479-90.
11. Xu D, Jiang HR, Kewin P, Li Y, Mu R, Fraser AR, et al. IL-33 exacerbates antigen induced arthritis by activating mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 Aug;105(31):10913-8.

12. Verri WA Jr, Souto FO, Vieira SM, Almeida SC, Fukada SY, Xu D, et al. IL-33 induces neutrophil migration in rheumatoid arthritis and is a target of anti-TNF therapy. *Ann Rheum Dis* 2010 Sep;69(9):1697-703.
13. Matsuyama Y, Okazaki H, Tamemoto H, Kimura H, Kamata Y, Nagatani K, et al. Increased levels of interleukin 33 in sera and synovial fluid from patients with active rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2010 Jan;37(1):18-25.
14. Xiangyang Z, Lutian Y, Lin Z, Liping X, Hui S, Jing L. Increased levels of interleukin-33 associated with bone erosion and interstitial lung diseases in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2012 Apr;58(1):6-9.
15. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc* 2007; 2(5):1269-75.
16. Castor CW, Rowe K, Dorstewitz EL, Wright D, Ritchie JC. Regulation of collagen and hyaluronate formation in human synovial fibroblast cultures. *J Lab Clin Med* 1970 May;75(5):798-810.
17. Vuorio E, Takala I, Pulkki K, Einola S. Effects of sodium aurothiomalate on hyaluronic acid synthesis in normal and rheumatoid synovial fibroblast cultures. *Scand J Rheumatol* 1979;8(3):173-6.
18. Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008 Nov;67(11):1505-15.
19. Cannarozzi G, Schneider A, Gonnet G. A Phylogenomic Study of Human, Dog, and Mouse. *PLoS Comput Biol* 2007 Jan 5;3(1):e2.
20. Council NR. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Eighth ed. Washington, dC: The National Academies Press; 2011.
21. Bornschlögl T. *How filopodia pull: What we know about the mechanics and dynamics of filopodia*. Cytoskeleton (Hoboken) 2013.
22. Kim HR, Cho ML, Kim KW, Juhn JY, Hwang SY, Yoon CH, et al. Up-regulation of IL-23p19 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by IL-17 through PI3-kinase-,

NF-kappaB- and p38 MAPK-dependent signalling pathways. *Rheumatology (Oxford)* 2007 Jan;46(1):57-64.

23. Valencia X, Higgins JM, Kiener HP, Lee DM, Podrebarac TA, Dascher CC, et al. Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes. *J Exp Med* 2004 Dec 20;200(12):1673-9.

24. Kim HR, Cho ML, Kim KW, Juhn JY, Hwang SY, Yoon CH, et al. Up-regulation of IL-23p19 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by IL-17 through PI3-kinase-, NF-kappaB- and p38 MAPK-dependent signalling pathways. *Rheumatology (Oxford)* 2007 Jan;46(1):57-64.

25. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GF, Chisaka O, et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* 2007 Feb;315(5814):1006-10.

26. Vandenabeele F, De Bari C, Moreels M, Lambrichts I, Dell'Accio F, Lippens PL, et al. Morphological and immunocytochemical characterization of cultured fibroblast-like cells derived from adult human synovial membrane. *Arch Histol Cytol* 2003 May;66(2):145-53.

27. Stebulis JA, Rossetti RG, Atez FJ, Zurier RB. Fibroblast-like Synovial Cells Derived From Synovial Fluid. *J Rheumatol* 2005 Feb;32(2):301-6.

28. Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods Mol Med* 2007;135:365-75.

29. Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989 Jul;74(1):1-10.

30. Le Goff B, Blanchard F, Berthelot JM, Heymann D, Maugars Y. Le Goff B, Blanchard F, Berthelot JM, Heymann D, Maugars Y. Role for interleukin-6 in structural joint damage and systemic bone loss in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2010 May;77(3):201-5.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O presente estudo estabeleceu protocolo para a cultura dos FS humanos e representa importante passo para o fortalecimento da linha de pesquisa “Estudo de Mediadores e Reguladores da Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica”. Propiciou a ampliação dos estudos com cultura de células, com foco voltado para a artrite reumatoide. Além disso, esta pesquisa estabeleceu a cooperação científica com a equipe do Laboratório de Doenças Autoimunes do Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, coordenado pelo prof. Ricardo Machado Xavier.

O estudo morfológico sedimentou a técnica de cultivo celular e ampliou o conhecimento sobre a estrutura dos FS. Estabeleceu, através da avaliação ultraestrutural, que o modelo murino em camundongos DBA é um modelo adequado para estudos em AR, principalmente em relação aos fibroblastos. Da mesma forma, a dosagem de IL-6 e MMP 1e 3 comprovou o estado ativo e central dessas células na CIA e na doença reumatoide. O desafio atual é ampliar essas dosagens nos FS de todas as fontes aqui discutidas além de determinar as diluições corretas para avaliação do papel da IL-33 nesses estímulos. No curto prazo também estão previstos estudos envolvendo outra doença articular inflamatória, a artrite psoriásica. Pretende-se contribuir com a elucidação dos mecanismos fisiopatológicos das doenças reumáticas inflamatórias para que, no futuro, esses dados possam ser utilizados para o desenvolvimento de terapias mais eficazes e específicas.

Ao término deste estudo delineam-se como objetivos para trabalho posterior de pós-graduação:

- Avaliação das vias de sinalização intracelular decorrentes do estímulo com IL-33.
- Avaliação da densidade de expressão dos receptores ST2 nos FS.



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

Parecer nº. ETIC 0637.0.203.000-10

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

DECISÃO

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

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


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

FACULDADE DE MEDICINA

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / 2º andar

Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100

Fone: (031) 3409-9762

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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

Prezado Paciente,

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa sobre artrite reumatóide.

Antes de decidir se quer participar, é importante que o senhor(a) entenda a razão deste estudo, os possíveis benefícios, riscos e desconfortos. Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto. Por favor, faça perguntas se tiver qualquer dúvida. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma, ou seja, todo o seu tratamento continuará da mesma maneira como foi programado.

Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento.

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

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

A artrite reumatoide é uma doença crônica do sistema articular, ou seja, acomete as articulações. As manifestações clínicas podem variar de pessoa para pessoa, mas, de modo geral, os pacientes apresentam as

juntas inchadas, avermelhadas e doloridas. O diagnóstico é feito pelo conjunto de sintomas que você apresenta e pela interpretação de exames complementares (sangue e imagem) solicitados pelos médicos. Em um grupo de pacientes a doença pode evoluir sem complicações, mas em outros ela pode levar até à deformidade óssea, o que impede os pacientes de exercerem suas atividades diárias, lazer ou trabalho. O tratamento inclui o uso de medicamentos por tempo prolongado e tem por objetivo impedir que ocorram as deformidades nas juntas. Infelizmente, nem todos os pacientes apresentam melhora satisfatória com as medicações disponíveis e, por isso, justificam-se as pesquisas que tentam investigar os mecanismos que levam à artrite reumatoide, com vistas ao desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e com menos efeitos indesejáveis. Como ainda não conhecemos a causa da artrite reumatoide, não dispomos de cura definitiva e, como cada pessoa pode apresentar manifestações diversas da doença, é importante que pesquisas contínuas busquem conhecer melhor os mecanismos da doença, para que disso possa resultar um melhor tratamento para as pessoas com esse reumatismo. Em alguns casos as articulações inflamadas são tratadas com a cirurgia para substituição por prótese, que é um aparelho que pode ficar dentro do seu corpo no lugar da articulação. Nesta pesquisa para a qual o Sr.(a) está sendo convidado a participar, se você tiver que fazer uma cirurgia por causa da artrite reumatoide para colocar uma prótese no joelho, pé ou quadril, e concordar em participar, um fragmento do tecido que será retirado da articulação doente será coletado para estudos sobre as células e as substâncias que fazem parte do processo inflamatório da doença. Esse fragmento será obtido do tecido que deve ser retirado do seu corpo para a colocação da prótese durante a cirurgia, sendo que, em hipótese alguma, será retirado qualquer fragmento de tecido que não faça parte daquele que já seria retirado no procedimento cirúrgico.

Caso o Sr.(a) seja submetido a punção articular, previamente à infusão da medicação anti-inflamatória, realizaremos aspiração do líquido articular inflamado. Esse processo visa ao alívio da dor e em alguns casos à análise em laboratório das características desse aspirado. Solicitamos autorização para que o líquido excedente seja utilizado na pesquisa acima mencionada.

Não está previsto a realização de qualquer exame ou procedimento que não faça parte da avaliação habitual necessária ao cuidado de qualquer pessoa com artrite reumatoide. Em nenhum momento sua identidade será revelada e o material colhido da sua articulação ou os resultados desse estudo não serão utilizados para outros fins que não sejam o desse estudo. Não existem riscos ou desconfortos para o senhor(a) uma vez que todos os procedimentos serão realizados somente com o fragmento do tecido, já em laboratório de pesquisa.

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

Se concordar em participar pedimos que assine esse papel dizendo que entendeu as explicações e está concordando. Se o Sr.(a) deseja mais esclarecimentos ou se tem qualquer dúvida sobre a pesquisa nós estamos dispostos a responder qualquer pergunta em qualquer momento. As dúvidas podem ser esclarecidas com os médicos do estudo, pelo telefone 31 3409-9930 ou

diretamente pelo coordenador da pesquisa, a Dra. Adriana Maria Kakehasi, 31 8787-7318. Sua participação é totalmente voluntária e o Sr.(a) pode não querer participar ou pode desistir em qualquer momento, sem que isso implique em qualquer prejuízo para a sua pessoa ou familiares, e você pode continuar normalmente o seu acompanhamento no serviço. Uma cópia deste documento será entregue a você.

Tenho ciência do exposto e concordo em participar deste estudo.

Nome sujeito da pesquisa: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: _____

Nome: _____

Testemunha: _____ Data: _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO
ADULTO

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA RAFAELA BICALHO VIANA MACEDO

Realizou-se, no dia 25 de novembro de 2013, às 09:00 horas, Sala 034, andar térreo da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **ESTUDO MORFOFUNCIONAL COMPARATIVO ENTRE FIBROBLASTOS SINOVIAIS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E DE MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE**, apresentada por **RAFAELA BICALHO VIANA MACEDO**, número de registro 2011657215, graduada no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO ADULTO, à seguinte Comissão Examinadora: Prof. Marcus Vinicius Melo de Andrade - Orientador (UFMG), Prof^a. Adriana Maria Kakehasi - Coorientadora (UFMG), Prof^a. Mônica Maria Demas Álvares Cabral (UFMG), Prof. Ricardo Machado Xavier (UFRGS).

A Comissão considerou a dissertação:

- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 25 de novembro de 2013.

Prof. Marcus Vinicius Melo de Andrade
Doutor - USP

Prof^a. Adriana Maria Kakehasi
Doutora - UFMG

Prof^a. Mônica Maria Demas Álvares Cabral
Doutora - UFMG

Prof. Ricardo Machado Xavier
Doutor - Shimane Medical University



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE DO
ADULTO

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

**ESTUDO MORFOFUNCIONAL COMPARATIVO ENTRE FIBROBLASTOS
SINOVIAIS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE E DE MODELO
EXPERIMENTAL DE ARTRITE**

RAFAELA BICALHO VIANA MACEDO

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

Aprovada em 25 de novembro de 2013, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Marcus Vinicius Melo de Andrade - Orientador
UFMG

Prof. Adriana Maria Kakehasi - Coorientadora
UFMG

Prof. Mônica Maria Demas Álvares Cabral
UFMG

Prof. Ricardo Machado Xavier
UFRGS

Belo Horizonte, 25 de novembro de 2013.