

FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

GUSTAVO GOMES RESENDE

**Expressão de moduladores da via Wnt por sinoviócitos fibroblasto símile de
pessoas com doenças articulares inflamatórias.**

Belo Horizonte

2016

GUSTAVO GOMES RESENDE

**Expressão de moduladores da via Wnt por sinoviócitos fibroblasto símile de
pessoas com doenças articulares inflamatórias.**

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

Área de concentração: Ciências Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Maria Kakehasi

Belo Horizonte

2016

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

R433e Resende, Gustavo Gomes.
Expressão de moduladores da via Wnt por sinoviócitos fibroblasto
símile de pessoas com doenças articulares inflamatórias [manuscrito]. /
Gustavo Gomes Resende. - - Belo Horizonte: 2016.
78f.: il.
Orientador: Marcus Vinícius Melo Andrade.
Coorientador: Adriana Maria Kakehasi.
Área de concentração: Saúde do Adulto.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Artrite Reumatoide. 2. Espondilite. 3. Via de Sinalização Wnt. 4.
Fibroblastos. 5. Fator de Necrose Tumoral alfa. 6. Interleucinas. 7.
Dissertações Acadêmicas. I. Andrade, Marcus Vinícius Melo. II. Kakehasi,
Adriana Maria. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina. IV. Título.

NLM: WE 346

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor

Prof. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação

Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira

Pró-Reitora de Pesquisa

Profa. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor

Prof. Humberto José Alves

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

Coordenadora

Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

Subcoordenador

Profa. Suely Meireles

Colegiado

Representantes Docentes

Prof. Marcus Vinícius Melo de Andrade

Profa. Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Profa. Gilda Aparecida Ferreira

Profa. Rosângela Teixeira

Prof. Paulo Caramelli

Profa. Valéria Maria de Azeredo Passos

Representante Discente

Mônica Maria Teixeira

Dedico este trabalho à Vanessa, por entrar na minha história, aventurar-se comigo pela vida e pela coautoria de nossa obra mais primorosa; à Lara e ao Caio, pelo presente que me deram ao existir; e aos meus pais, por seu cuidado e amor no tempo certo, exemplo para inúmeras ocasiões, adubo vital e preciso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, prof. Marcus Vinícius M. de Andrade e profa. Adriana M. Kakehasi, pela oportunidade de fazer parte deste grupo e pela generosidade em partilhar do conhecimento.

Aos meus mestres, professores Marco Antônio P. Carvalho, Caio Moreira, Cristina C. D. Lanna, Gilda A. Ferreira e Flavia Patrícia S. T. Santos, por me abrirem muitas das portas, e também me ensinarem a carregar minhas próprias chaves.

A todos os amigos da reumatologia do HC-UFGM, por sua acolhida fraternal, fecunda cooperação e pelo exemplo de paixão pelo trabalho e pelas pessoas.

Aos companheiros do laboratório Lineu Freire Maia, por sua colaboração cuidadosa e imprescindível a este trabalho.

Aos pacientes, pela plena confiança e desprendida participação neste estudo.

À Sociedade Brasileira de Reumatologia – SBR, por seu Fundo de Apoio à Pesquisa e ao Ensino – FAPE, formidável fomento para o crescimento da pesquisa em nossa especialidade.

"A certeza plena é o maior ato de covardia.
Só o medo e a dúvida me colocam em movimento."

Kaleb, Sangue Azul, 2015

Lírio Ferreira

“A lo hecho, pecho.”

dito popular espanhol

Anônimo

RESUMO

Expressão de moduladores da via Wnt por sinoviócitos fibroblasto símile de pessoas com doenças articulares inflamatórias.

Introdução – A artrite reumatoide (AR), a artrite psoriásica (AP) e a espondilite anquilosante (EA) são exemplos de doenças articulares inflamatórias (DAI) com diferentes padrões de remodelação articular. Os FLS estão envolvidos na transição de uma fase aguda e reparável, para um estágio crônico e persistente, nestas enfermidades. A distinção dos fenótipos articulares envolve citocinas inflamatórias como TNF α , IL17 e IL22, de maneira direta, ou através de vias de sinalização como a Wnt.

Objetivos – Avaliar a expressão de dois moduladores extracelulares (sFRP3/Frzb e Dkk1) da via Wnt por FLS de pacientes com diferentes DAI, em resposta a IL17, IL22 ou TNF α .

Métodos – FLS foram cultivados a partir do líquido sinovial de pacientes com DAI. Os níveis de Dkk1 e sFRP3/Frzb foram medidos por ELISA, nos sobrenadantes das culturas, após diferentes estímulos com IL17, IL22 ou TNF α . As concentrações de Dkk1, sFRP3/Frzb, TNF α , IL17 e IL22 também foram mensuradas no líquido sinovial por ELISA.

Resultados – sFRP3/Frzb e Dkk1 são expressos de forma constitutiva pelos FLS. IL22 se correlacionou positivamente com sFRP3/Frzb ($r = 0,76$; $p < 0,01$) no fluido sinovial e níveis mais altos de IL22 e de sFRP3/Frzb foram observados entre usuários de bloqueadores de TNF α ($p = 0,01$). O estímulo com IL22 aos FLS foi capaz de aumentar sua produção de sFRP3/Frzb, mas não de Dkk1, com maiores efeitos vistos nas doses de 1 e 10 ng/ml e intervalos de tempo entre estímulo e coleta de 24 e 48 horas ($p < 0,01$). TNF α e IL17 não alteraram a expressão basal de sFRP3/Frzb, nem de Dkk1 por FLS.

Conclusões - IL22 e sFRP3/Frzb estão correlacionadas positivamente nas DAI e IL22 induz aumento da expressão de sFRP3/Frzb pelos FLS. Tendo em conta a capacidade de sFRP3/Frzb para bloquear a osteoblastogênese, IL22 pode estar relacionada com diferentes padrões de dano estrutural e remodelação articular.

Palavras chave: Via de Sinalização Wnt. Fibroblastos. Artrite. Espondilite. Fator de Necrose Tumoral alfa. Interleucina-17. Interleucina-22

ABSTRACT

Wnt signaling pathway modulators expression by fibroblast-like synoviocytes in inflammatory joint diseases.

Background – Rheumatoid Arthritis (RA), Psoriatic Arthritis (PsA) and Ankylosing Spondylitis (AS) are examples of inflammatory joint diseases (IJD) with different joint remodeling patterns. The FLS are involved in the transition from an acute and reparable phase to a chronic and persistent stage in these diseases. The distinction of joint phenotypes involve inflammatory cytokines such as TNF α , IL17 and IL22 directly or through signaling pathways such as Wnt.

Objectives – To evaluate the expression of two extracellular modulators (sFRP3/Frzb and Dkk1) of the Wnt pathway by FLS of patients with different IJD, in response to IL17, IL22 or TNF α .

Methods – FLS were cultivated from the synovial fluid of patients with DAI. The levels of Dkk1 and sFRP3/Frzb were measured by ELISA in the culture supernatants after different doses of IL17, IL22 and TNF α . The concentrations of Dkk1, sFRP3/Frzb, TNF α , IL17 and IL22 were also measured in the synovial fluid by ELISA.

Results – sFRP3/Frzb and Dkk1 are constitutively expressed by FLS. IL22 and sFRP3/Frzb were positively correlated ($r=0.76$; $p<0.01$) in synovial fluid and higher levels of IL22 and sFRP3/Frzb were observed among TNF α inhibitors users ($p = 0.01$). The stimulation with IL22 to FLS was able to increase its production of sFRP3/Frzb, but not of DKK1, with greater effects seen at doses of 1 and 10 ng/ml and time intervals between stimulus and collecting of 24 and 48 hours ($p <0.01$). TNF α and IL17 did not alter the basal expression of sFRP3/Frzb or Dkk1 by FLS.

Conclusions - IL22 and sFRP3/Frzb are positively correlated in the IJD and IL22 induces increased expression of sFRP3/Frzb by FLS. Given the capability of sFRP3/Frzb to block the osteoblastogenesis, IL22 can be related to different patterns of structural damage and joint remodeling.

Keywords: Wnt Signaling Pathway. Fibroblasts. Arthritis. Spondylitis. Tumor Necrosis Factor alpha. Interleukin-17. Interleukin-22

Lista de Abreviaturas

ACR: Colégio Americano de Reumatologia
AINH: anti-inflamatório não hormonal
ANOVA: análise de variância
anti-CCP: anticorpo anti-peptídeo citrulinado
AP: artrite psoriásica
APC: proteína da polipose adenomatosa colônica
AR: artrite reumatoide
 β 2M: beta-2-microglobulina
BASDAI: escore de atividade de doença para espondilite anquilosante
BMP: proteína morfogenética óssea
BMU: unidade básica multicelular
CaCN: calcineurina
CamKII: calmodulina dependente cinase II
CASPAR: critério de classificação de artrite psoriásica
CCL: ligante de quimiocina beta
CCR: receptor de quimiocina beta
CD: agrupamento de diferenciação
CE: corticosteroide
CIA: artrite induzida por colágeno
CK-1: caseína cinase - 1
CTLA4: proteína associada ao linfócito T citotóxico – 4
CXCL: ligante de citocina alfa
CXCR: receptor de quimiocina alfa
DAI: doença articular inflamatória
DAMP: padrão molecular associado ao dano
DAS28: escore de atividade de doença de 28 articulações
Dsh: Dishevelled
Dkk1: Dickkopf-1
DMEM: meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
DP: doença psoriásica

EA: espondilite anquilosante
ELISA: ensaio de imun absorvência ligada a enzima
EpA: espondiloartrite
FGF: fator de crescimento de fibroblastos
FLS: sinoviócito fibroblasto símile
Frzb: frisbee (o mesmo que sFRP3)
G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos
GPI-IA: artrite induzida por glicose-6-fosfato isomerase
GSK-3: glicogênio sintetase cinase - 3
HC-gp39: glicoproteína de cartilagem humana - 39
HC-UFMG: Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
Hh: via de sinalização Hedgehog
HLA: antígeno leucocitário humano
hTNFtg: transgênico para TNF humano
IFN: interfeiron
IGF: fator de crescimento semelhante a insulina
IL: interleucina
Krm: Kremen
LD: limite de detecção
LGR: receptor acoplado a proteína G contendo repetição rica em leucina
LRP: proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
MANOVA: análise de variância multivariada
M-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos
MHC: complexo de histocompatibilidade principal
MMP: metaloproteinase
mRNA: ácido ribonucleico mensageiro
MSC: célula mesenquimal tronco
NK: linfócito assassino natural
OA: osteoartrite
OB: osteoblasto
OC: osteoclasto
OPG: osteoprotegerina
PAD4: peptidil arginina desaminase tipo IV
PAMP: padrão molecular associado a patógenos

PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PCR: proteína C reativa / reação em cadeia de polimerase
PGISp: espondilite induzida por proteoglicanos
PRR: receptor reconhecedor de padrões moleculares
PTH: hormônio paratireoideano
RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa-beta
RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-beta
RNM: ressonância nuclear magnética
Rspo: R-spondin
SCL: esclerostina
SFB: soro fetal bovino
sFRP: proteína secretada relacionada a espiralada
TFH: linfócito T folicular auxiliar
TGFβ: fator de crescimento transformante - beta
TH: linfócito T auxiliar
TNFα: fator de necrose tumoral alfa
Treg: linfócito regulador
UDPGD: uridina difosfoglicose desidrogenase
VHS: velocidade de hemossedimentação
WIF1: fator inibidor de Wnt - 1
Wnt: via de sinalização wingless / ligante wingless
Wnt/PCP: via Wnt não canônica relacionada a polaridade celular planar
Wnt/Ca⁺⁺: via Wnt não canônica relacionada a enzimas sensíveis ao cálcio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A Unidade Básica Multicelular (BMU) e o acoplamento entre reabsorção e formação ósseas.....	33
Figura 2 – Padrões distintos de remodelação articular nas doenças articulares inflamatórias.	34
Figura 3 – Diferenciações e reprogramação de linfócitos auxiliares (TH).	39
Figura 4 – O eixo interleucina-23 / interleucina-17 na patogênese das espondiloartrites.	45
Figura 5 – Via de sinalização Wnt canônica e sua modulação extracelular.	48
Figura 6 – Exemplos de sinoviócitos fibroblasto símile em cultura.	58
Figura 7 – Correlação entre as concentrações de IL22 e sFRP3 no líquido sinovial de pacientes com doenças articulares inflamatórias.	62
Figura 8 – Concentrações de IL22 e sFRP3 no líquido sinovial, agrupadas segundo o uso de imunobiológicos.	63
Figura 9 – Concentrações de sFRP3 e Dkk1 no sobrenadante celular sem estímulo.	63
Figura 10 – Concentrações médias de sFRP3 e Dkk1 no sobrenadante celular, por tempo decorrido entre o estímulo e a coleta.	64
Figura 11 – Concentrações de sFRP3/Frzb no sobrenadante celular, após os diferentes estímulos.....	65
Figura 12 – Concentrações de Dkk1 no sobrenadante celular, após os diferentes estímulos. .	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos que avaliam a expressão de moduladores da via de sinalização Wnt em sinoviócitos.....	53
Tabela 2 – Dados demográficos e clínicos dos pacientes incluídos no estudo, agrupados por diagnóstico.....	61
Tabela 3 – Concentrações médias (desvios padrões) de citocinas e moduladores extracelulares da via Wnt medidas no líquido sinovial de pacientes com doenças articulares inflamatórias, agrupados por diagnóstico.....	62

SUMÁRIO

1	Apresentação.....	25
2	Fundamentação teórica.....	27
2.1	As doenças articulares inflamatórias.....	27
2.1.1	ARTRITE REUMATOIDE.....	27
2.1.2	ESPONDILOARTRITES.....	28
2.2	Remodelação articular.....	31
2.3	Sinoviócito fibroblasto símile.....	35
2.4	As citocinas TNF α , IL17 e IL22.....	38
2.4.1	TNF α	39
2.4.2	IL17.....	41
2.4.3	IL22.....	43
2.5	Via de sinalização Wnt.....	45
3	Justificativas.....	52
4	Objetivos.....	55
5	Pacientes e Métodos.....	56
5.1	Seleção de pacientes.....	56
5.2	Cultivo de sinoviócitos fibroblasto símile (FLS).....	57
5.3	Estímulo dos FLS e dosagem de proteínas (<i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>).....	58
5.4	Análise estatística.....	59
6	Resultados.....	61
7	Discussão.....	67
8	Conclusões.....	70
9	Considerações finais.....	71
10	Referências bibliográficas.....	72
11	Apêndices.....	80
11.1	Termo de consentimento livre e esclarecido.....	80
11.2	Quadro com informações de coleta dos 25 pacientes analisados.....	80
12	Anexos.....	81
12.1	Aprovação pelo COEP.....	81
12.2	Folha de aprovação.....	82

1 Apresentação

Este projeto faz parte da linha de pesquisa “Mecanismos reguladores e mediadores da resposta inflamatória sistêmica”, que pertence ao programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto – PGCASA e conta com os seguintes professores pesquisadores: Profa. Cristina Costa Duarte Lanna, Profa. Gilda Aparecida Ferreira, Prof. Marcus Vinicius Melo de Andrade e Profa. Teresa Cristina de Abreu Ferrari.

O projeto iniciou-se pela colaboração entre o Laboratório Lineu Freire Maia da Faculdade de Medicina da UFMG, coordenado pelo orientador deste estudo, o Prof. Marcus Vinicius Melo de Andrade, pelo Departamento do Aparelho Locomotor desta mesma faculdade e pelo Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG, representados pela coorientadora deste estudo, a Profa. Adriana Maria Kakehasi.

Esta linha de pesquisa tem por objeto de estudo principal a inflamação e sua regulação em diversas doenças inflamatórias sistêmicas. Já proporcionou, até o momento, a produção de três dissertações de mestrado: das alunas Rafaela Bicalho Viana Macedo em 2013, Maria Raquel da Costa Pinto em 2014 e Camilla Ribeiro Lima Machado em 2015 (esta última já admitida no programa de doutorado) e de uma tese de doutorado, da aluna Maria Fernanda Brandão de Resende Guimarães, defendida em 2015.

Esta dissertação foi elaborada, segundo a norma técnica ABNT NBR 14724:2011, em vigor desde 17 de abril de 2011.

2 Fundamentação teórica

2.1 As doenças articulares inflamatórias

Artrite reumatoide, artrite psoriásica e espondilite anquilosante são consideradas doenças articulares inflamatórias (DAI) pois, apesar de sua natureza sistêmica, clinicamente se expressam com manifestações predominantemente articulares e periarticulares, sejam no esqueleto axial ou apendicular. Essas doenças foram escolhidas como grupos para comparação entre si por dois motivos: primeiro, pela alta prevalência e importância que possuem em termos de morbimortalidade, piora da qualidade de vida e limitação funcional das pessoas acometidas, além do volume de recursos consumidos em seus cuidados; segundo, por representarem diferentes modelos de etiopatogenia, e por apresentarem padrões típicos de remodelação articular, representativos de dano estrutural distinto, que provavelmente influenciam os resultados das terapias atualmente disponíveis.

2.1.1 Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica, autoimune, sistêmica, com prevalência estimada entre 0,5 e 1% da população geral. Acomete mais mulheres que homens (cerca de 3:1 em estudos europeus e 8:1 em estudos latino-americanos⁽¹⁾) e tem pico de incidência entre os 30 e 50 anos de idade. Caracteriza-se, emblematicamente, pela inflamação sinovial, poliarticular, com envolvimento de pequenas e grandes articulações e de forma habitualmente simétrica. Pode também evoluir com agressão a outros órgãos, como por exemplo os vasos sanguíneos (vasculite), os olhos (esclerite, ceratite), os pulmões (pneumopatia intersticial) ou os nervos periféricos (neuropatia), caracterizando o chamado envolvimento extra-articular⁽²⁾.

Entre os diversos fatores de mau prognóstico na sua evolução, podemos destacar: o uso de tabaco, início precoce dos sintomas, atraso no diagnóstico e para o início do tratamento, níveis persistentemente altos de atividade inflamatória, presença de manifestações extra-articulares, positividade para o fator reumatoide e/ou anti-CCP, especialmente em títulos altos, e a presença do epítipo compartilhado, que são sequências específicas de aminoácidos na região 70-74 da molécula de HLA-DRB1, associadas a maior susceptibilidade e gravidade dos seus portadores⁽²⁾.

Resumidamente, em sua etiopatogenia, há uma fase pré-clínica ou pré-articular, onde ocorre a perda da autotolerância e desenvolvimento da autoimunidade. A presença de

autoanticorpos específicos já foi demonstrada, vários anos antes do desenvolvimento de sintomas. Já se sabe que a citrulinização dos resíduos arginina de determinadas proteínas, como por exemplo, α -enolase, fibrinogênio, colágeno, vimentina e fibronectina, mediada pela enzima peptidil arginina desamininase tipo IV (PAD4), levaria a formação de anticorpos contra estas proteínas transformadas, contribuindo para a ruptura da homeostasia imunológica. Tanto a ação de produtos do tabagismo no epitélio respiratório, quanto a infecção periodontal por *porphyromonas gingivalis*, em indivíduos susceptíveis, levam a expressão local desta enzima e conseqüente formação de neoantígenos. Logo, pode-se dizer que a artrite reumatoide tem origem, pelo menos em alguns casos, no pulmão e na boca.

Uma vez iniciado o processo autoimune, segue-se a localização da doença em seu sítio anatômico principal: a membrana sinovial. Deste processo de localização sinovial, ainda não se sabe como e quando ocorre. Nesta fase, chamada articular, verifica-se o recrutamento de células imunes e a expressão desequilibrada de citocinas, favorecendo uma resposta inflamatória, capaz de se auto alimentar, levando finalmente à formação do *pannus*, um tipo de tecido de granulação, altamente invasivo e capaz de destruir outros tecidos contíguos, como a cartilagem hialina de revestimento e osso subcondral^(2,3).

2.1.2 Espondiloartrites

O conceito de espondiloartrite (EpA) compreende um grupo de doenças que apresentam características epidemiológicas, clínicas, anatomopatológicas e imunogenéticas comuns, que permitiram, historicamente, sua classificação como enfermidades inter-relacionadas, mas distintas⁽⁴⁾. Atualmente, fazem parte deste grupo a espondilite anquilosante, a artrite reativa, a artrite psoriásica, a artrite enteropática (associada às doenças inflamatórias intestinais, colite ulcerativa e Crohn) e as espondiloartrites indiferenciadas, tanto de início adulto, quanto juvenil. Este conceito de grupo tem sido, há algum tempo, questionado a dar lugar ao conceito de doença única com expressão clínica heterogênea^(5, 6). Controvérsias a parte, parece ser mais relevante e com implicações mais práticas sobre o tratamento e o prognóstico, a separação entre espondiloartrite axial e periférica do que sua subdivisão em fenótipos específicos. As EpA, quando combinadas, têm prevalência comparável com a da artrite reumatoide, com cerca de 1% da população geral. As EpA somadas à AR representam as doenças articulares inflamatórias crônicas mais prevalentes em nosso meio.

A EA pode ser considerada o protótipo de espondiloartrite axial, pois por definição, só existe se houver este acometimento. Tem predomínio de homens (2-4:1), com a grande maioria dos pacientes desenvolvendo os primeiros sintomas entre os 20 e os 35 anos de idade.

Tem prevalência estimada em 0,1-0,2%, sujeita a variações conforme a população sob estudo. Entre os fatores de mal prognóstico, ressaltam-se o acometimento de articulações coxofemorais, a presença de dactilite, resposta inadequada aos AINH e de maneira análoga a todas outras doenças inflamatórias crônicas, o início precoce dos sintomas, atraso no diagnóstico e tratamento e níveis elevados de atividade inflamatória⁽⁷⁾.

A AP representa melhor o modelo de espondiloartrite periférica, visto que quadros axiais isolados são a exceção (<5% dos casos). Acomete igualmente ambos os sexos, embora a forma poliarticular seja mais comum em mulheres e a as formas com envolvimento axial em homens, e tem início dos sintomas um pouco mais tardio, até os 50 anos. Cerca de 1/3 das pessoas com psoríase, uma dermatite crônica caracterizada por lesões eritemato-descamáticas, desenvolvem manifestações musculoesqueléticas, que permitem o diagnóstico de artrite psoriásica. Há alguns anos, tem se preferido o conceito de doença psoriásica (DP) que engloba todas as possíveis manifestações cutâneo-ungueais, articulares e periarticulares, bem como oculares e intestinais, além das comorbidades frequentemente associadas. Em cerca de 10-15% dos indivíduos, a artrite precede as lesões cutâneas, e nos casos de poliartite simétrica a distinção entre AP e AR pode ser muito difícil, se não estiverem presentes outros elementos diagnósticos típicos.

Como características comuns ao grupo das espondiloartrite, temos:

- Acometimento axial, por vezes exclusivo, com espondilite (inflamação da coluna vertebral) e/ou sacroiliite (inflamação das articulações sacroilíacas), cuja representação clínica é a dor inflamatória na coluna e nádegas.
- Quadro periférico, que de maneira semelhante, pode ser encontrado isoladamente e quando presente, observa-se maior frequência do padrão de oligoartrite assimétrica de grandes articulações.
- Associação com o HLA-B27, uma molécula do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I. Com maiores frequências vistas na EA e em certos grupos étnicos como os brancos do norte da Europa (até 90%)⁽⁸⁾ e menores nas demais EpA e outras populações. No Brasil, possivelmente pela intensa miscigenação, sua frequência é menor, como observado em estudos realizado por Bomtempo *et al.*⁽⁹⁾ no Hospital das Clínicas da UFMG em Belo Horizonte – MG (64,0%), Ramalho *et al.*⁽¹⁰⁾ em Recife – PE (66,6%) e Sampaio-Barros *et al.*⁽¹¹⁾ em Campinas – SP (78,2%).
- Inflamação ao nível das ênteses (do grego *enthesis* que significa inserção), sítios constituídos por fibrocartilagem ou tecido conjuntivo fibroso de transição, onde tendões, ligamentos, cápsulas articulares e fâscias ligam-se aos ossos⁽¹²⁾. Acumulam-se evidências de

que nas EpA, as alterações fisiopatológicas iniciais ocorram neste local, mas não fiquem confinadas a ele, expandindo o processo também para a sinóvia, a cartilagem e o osso adjacente, resultando em sinovite, condrite e osteíte⁽¹³⁾. Imagens de ressonância magnética (RNM) revelam edema da medular óssea⁽¹⁴⁾ e estudos histológicos já demonstraram infiltração de macrófagos e células T no osso subcondral subjacente a estes sítios⁽¹⁵⁾.

- Marcante agregação familiar, inclusive entre subtipos diferentes de EpA^(6, 16) e tendência à sobreposição clínica entre as enfermidades do grupo. Assim, eventualmente, um paciente pode iniciar um quadro clínico sugerindo uma espondilite anquilosante idiopática ou reativa a uma infecção urogenital por Clamídia ou gastrointestinal por enterobactérias e, após alguns anos, desenvolver outras características específicas como psoríase ou doença inflamatória intestinal, que possibilitem sua reclassificação⁽⁴⁾.

Em resumo, num indivíduo geneticamente predisposto portando não só o HLA-B27, mas também genes não MHC⁽¹⁷⁾, estímulos ambientais como estresse biomecânico e uma microbiota propícia induziriam uma resposta inflamatória, autônoma, aberrante e sem suficiente regulação, iniciada nas ênteses e capaz de agredir os tecidos adjacentes. Logo, nestas doenças não parece haver, como na AR, uma fase pré-clínica de perda da tolerância, residente nos órgãos linfoides centrais, com produção de autoanticorpos. Esta discrepância, entre os eventos iniciais que levam a respostas imunológicas, as subdivide em: doenças autoimunes clássicas (AR) com manifesta autoreatividade contra antígenos próprios e predomínio da imunidade adquirida; e doenças autoinflamatórias poligênicas (EA e AP) onde se sobressai uma resposta imune inata local a algum insulto tecidual com desequilíbrio entre ativação e regulação da inflamação autodirigida⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

Outro aspecto divergente entre estas doenças é o tipo predominante de polarização dos macrófagos, que são mudanças fenotípicas ocorridas durante sua maturação e ativação, influenciadas por estímulos locais e que determinam sua vocação funcional. O tipo M1 (ou clássica) caracterizada pela intensa atividade pró-inflamatória, alta capacidade de eliminação de patógenos intracelulares e produção de RANKL é a marca da artrite reumatóide. Já o tipo M2 (ou alternativa), assinalada pela expressão de CD163+, atividade anti-inflamatória e de reparação tecidual distingue as espondiloartrites^(3, 21). Inclusive, tal polarização também foi associada ao HLA-B27 entre pacientes com EpA, com mais macrófagos M2 entre pacientes B27 positivos que nos negativos⁽²²⁾ e o pior desempenho destes macrófagos M2 em eliminar patógenos poderia explicar a persistência intracelular de Clamídia, reconhecidamente relacionada à artrite reativa, uma das EpA⁽²³⁾.

Em conjunto, estas diferenças podem justificar a heterogeneidade de resultados de ensaios clínicos, entres as diversas doenças, com medicamentos cujos alvos são células responsáveis pelo início ou progressão da resposta imune, como por exemplo, as terapias anticélulas T (proteína de fusão CTLA4-IgG1) e anticélulas B (anticorpo anti-CD20), ambas comprovadamente eficientes na AR e com respostas insuficientes nas EpA^(24, 25). De maneira oposta, terapias dirigidas contra citocinas efetoras como TNF α provaram ser eficazes em ambos os grupos^(26, 27).

2.2 Remodelação articular

Remodelação óssea é um processo complexo e estritamente regulado, que envolve as ações de formação e reabsorção ósseas que, observando-se variações naturais conforme a fase em que se encontra o organismo (crescimento ou envelhecimento, por exemplo), devem estar equilibradas. É vista tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Através dela, o tecido ósseo mantém sua integridade estrutural e a homeostasia mineral, permitindo sua renovação e adequada resposta a novas exigências mecânicas. Quando sua regulação, por algum motivo, não funciona perfeitamente, o equilíbrio se perde e pode haver predomínio da formação ou da reabsorção, levando a anormalidades da massa e arquitetura ósseas⁽²⁸⁾. É orquestrada, essencialmente por duas células: o osteoclasto (OC), célula multinucleada de origem hematopoiética formada pela fusão de precursores mononucleares, responsável pela reabsorção óssea e o osteoblasto (OB), de linhagem mesenquimal, célula formadora óssea. A produção de osso novo pode usar dois mecanismos diferentes: ossificação intramembranosa ou endocondral. No primeiro, há depósito de matriz (essencialmente colágeno tipo 1) em uma camada pré-existente de tecido conjuntivo fibroso. No segundo, a matriz se deposita num modelo cartilaginoso que é então reabsorvido e substituído por tecido ósseo⁽²⁹⁾.

O ciclo de remodelação, tanto no osso cortical, quanto trabecular, se inicia com o recrutamento de pré-osteoclastos, sua diferenciação e ativação com consequente atividade reabsortiva. A seguir, ocorre uma fase de transição camada reversa, quando os OC são inibidos e entram em apoptose e pré-osteoblastos são atraídos e iniciam sua diferenciação. Por fim, sucede a fase de formação e mineralização da matriz óssea e de diferenciação final dos osteoblastos em osteócitos ou em células de revestimento. O tecido ósseo recém-formado, permanece em repouso, até que um novo ciclo tenha início. Osteócitos permanecem viáveis por até décadas, são as células ósseas mais abundantes e servem como mecanosensores sensíveis a variações de carga. As células de revestimento têm vida muito mais curta e entre

outras funções, preparam a superfície óssea, secretando colagenase que digere a fina camada de matriz não mineralizada, expondo o substrato logo abaixo à ação dos OC. A este conjunto funcional de células, dá-se o nome de unidade básica multicelular (BMU)^(28, 29).

Vários são os mecanismos que regulam a remodelação óssea em diferentes níveis. Fatores sistêmicos como o paratormônio (PTH), a calcitonina, a vitamina D (1 α ,25-diidroxivitamina D3), os hormônios sexuais (estrogênios e androgênios), os tireoidianos (tetraiodotironina – T4 e triiodotironina – T3) e os glicocorticoides dirigem o sentido em que o balanço ou saldo da remodelação se dará, muitos deles utilizando-se dos mesmos elementos locais responsáveis pelo acoplamento entre reabsorção e formação.

O principal destes sistemas locais é chamado sistema **RANK-RANKL-OPG**. RANK e desempenha papel essencial na interação entre osteoblastos e osteoclastos e também entre o sistema imune e o tecido ósseo. RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa- β*) é um receptor de membrana, expresso em osteoclastos (precursores e maduros) que se ativa com a ligação de RANKL (ligante do RANK), uma citocina pertencente à família do TNF α . O receptor solúvel osteoprotegerina (OPG), da família de receptores de TNF α , inibe RANKL impedindo-o de se ligar ao receptor funcional RANK. RANK também é expresso em células dendríticas, principal célula apresentadora de antígenos, e está ainda envolvido em sua comunicação com linfócitos T.

A diferenciação, proliferação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos depende basicamente da presença de dois fatores: O fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e RANKL. Os osteoblastos e outras células estromais secretam OPG, RANKL e M-CSF. Linfócitos T e células endoteliais também são uma fonte de RANKL, sobretudo em microambientes sob influência pró-inflamatória. Portanto o osteoblasto, além de produzir osteoide, também detêm uma função vital de regulação da reabsorção óssea secretando citocinas estimuladoras e inibitórias da osteoclastogênese, sendo este último papel desempenhado também por seus descendentes (osteócitos e células de revestimento). Reciprocamente, osteoclastos liberam da matriz, durante a reabsorção, vários fatores de crescimento capazes (pelo menos *in vitro*) de estimular osteoblastos, como IGF (*insulin-like growth factor*), TGF β (*transforming growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) e PDGF (*platelet-derived growth factor*). Uma série de outros pares de moduladores, como por exemplo Ephrin/Eph (que permite sinalização nos dois sentidos), já foram descritos entre estas células e compõem um intrincado sistema de comunicação, que possibilita tão notável grau de conexão entre elas^(28, 29). A figura 1 ilustra esquematicamente a BMU e alguns dos fatores sistêmicos e locais que a controlam.

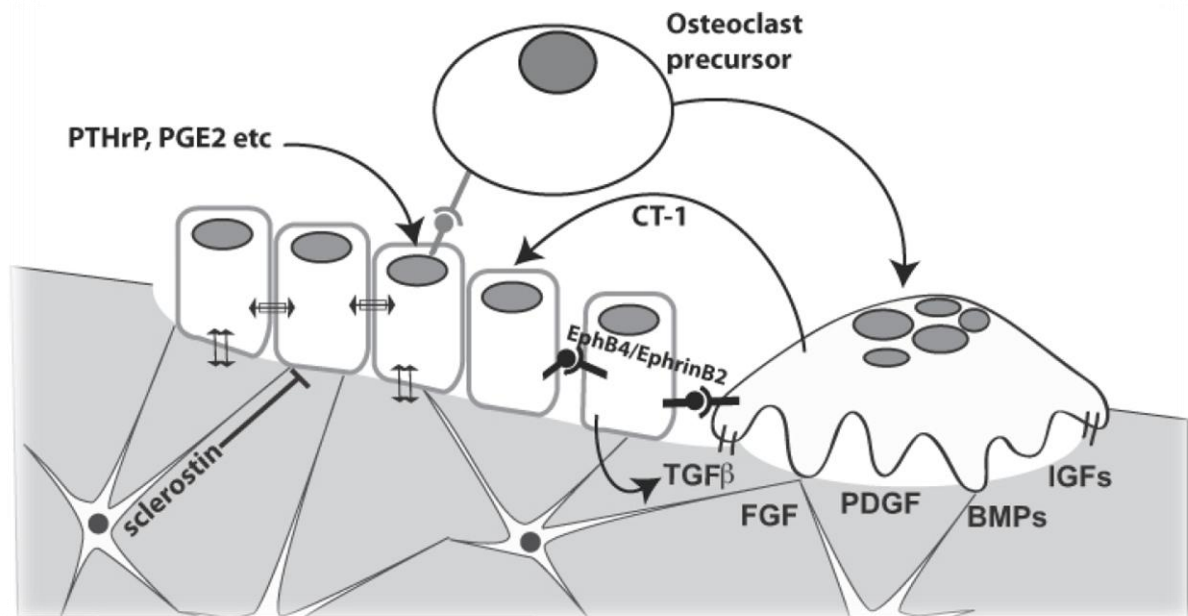


Figura 1 – A Unidade Básica Multicelular (BMU) e o acoplamento entre reabsorção e formação ósseas. Osteoclastos em resposta a ativação de RANK por RANKL, se diferenciam e reabsorvem osso, liberando fatores de crescimento que promovem atividade osteoblástica. Osteoblastos se diferenciam e enchem a lacuna reabsorvida, respondendo a sinais da matriz e de outras células. PTHrP (proteína relacionada ao hormônio paratireoideano), PGE2 (prostaglandina E2), CT-1 (cardiotrofina-1), sclerostin (esclerostina), TGFβ (fator de crescimento transformante - beta), FGF, (fator decrescimento de fibroblastos), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), BMP (proteínas morfogenéticas ósseas), IGF (fator de crescimento semelhante à insulina). Modificado de Martin et al, 2009⁽²⁸⁾.

Outros sistemas locais regulam a remodelação óssea, além do eixo RANK-RANKL-OPG, vários deles inclusive, se inter-relacionando^(30, 31). Podemos citar a via de sinalização **Hedgehog (Hh)**, envolvida na diferenciação, proliferação e maturação de condrócitos, especialmente durante a ossificação endocondral; as **proteínas morfogenéticas ósseas - BMP** (*bone morphogenetic proteins*) que são fatores de crescimento e citocinas, pertencentes à família do TGFβ, envolvidos na homeostase de vários tecidos, inclusive o osso. Algumas destas proteínas (BMP2, BMP6, BMP7 e BMP9) são potentes promotores de formação óssea, enquanto outras (BMP3), reguladores negativos; e a **via de sinalização Wnt**, uma das vias responsáveis pelo comprometimento de células mesenquimais tronco com a linhagem osteoblástica e aumento de sua viabilidade. Esta última é a via de sinalização de maior interesse nesta pesquisa e será melhor discutida mais adiante.

Remodelação articular é o nome dado ao conjunto de alterações estruturais envolvendo os diferentes tecidos articulares, decorrentes da injúria tecidual induzida pela inflamação e também por tentativas de reparação deste dano nas diversas DAI. As diferentes doenças podem ser, segundo o padrão de remodelação predominante, classificadas como **erosivas** como a artrite reumatoide (AR) e a gota ou como **osteoproliferativas** como a espondilite anquilosante (EA) e a osteoartrite (OA). A artrite psoriásica, curiosamente,

apresenta-se como um elo entre estes formatos, sendo possível tanto um curso dominado pela resposta catabólica mediada por osteoclastos levando a osteólise e erosões ósseas, quanto outro sobrepujado pela neoformação óssea mediada por osteoblastos, resultando em proliferação periosteal, surgimento de entesófitos e anquilose articular. Esta duplicidade, pode, inclusive, ser observada ao mesmo tempo, num mesmo paciente e até numa mesma articulação, sugerindo fatores locais para sua existência⁽³²⁻³⁴⁾. Os padrões de remodelação articular são ilustrados na figura 2.

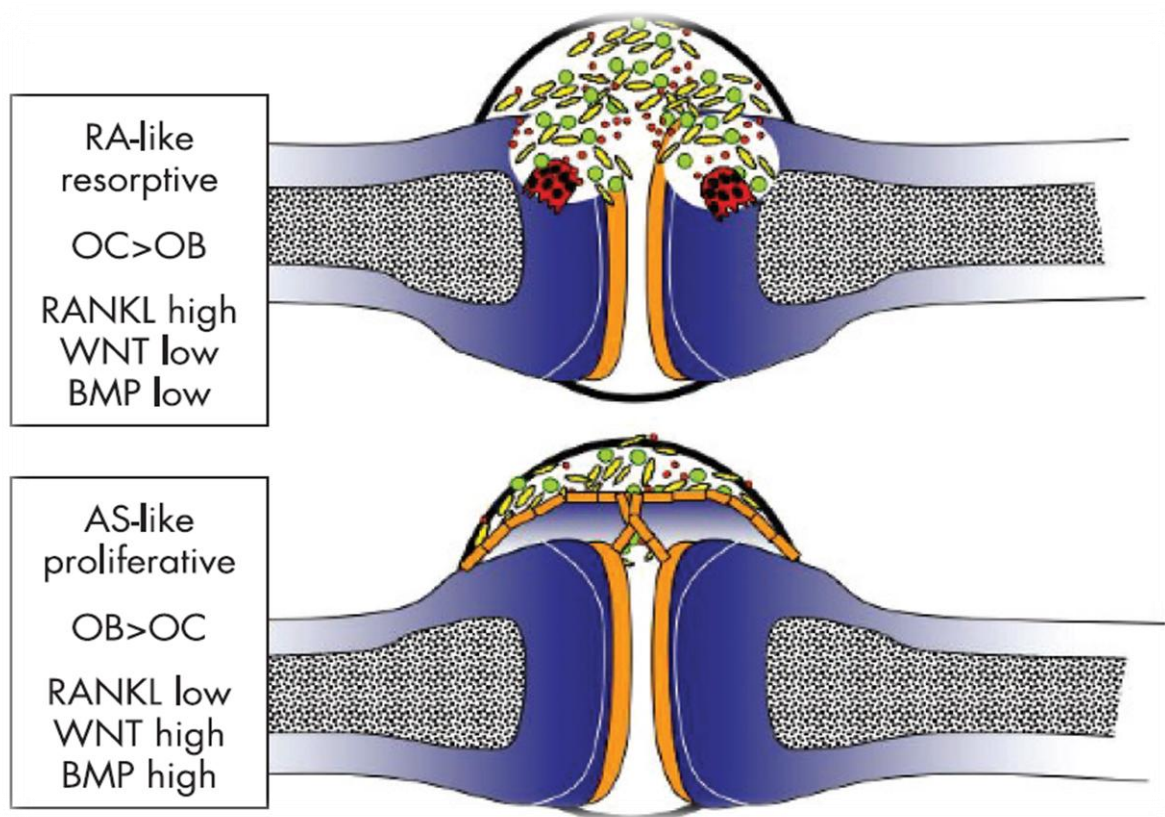


Figura 2 – Padrões distintos de remodelação articular nas doenças articulares inflamatórias.

Acima, padrão osteolítico ou erosivo (AR símile) onde domina a reabsorção mediada por osteoclastos (OC - células vermelhas) e abaixo, padrão osteoproliferativo (EA símile) no qual prevalece a neoformação óssea mediada por osteoblastos (OB - células laranjas). RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-beta), WNT (via de sinalização Wnt), BMP (proteínas morfogenéticas ósseas). Modificado de Schett, 2007⁽³⁴⁾.

Na AR, as drogas sintéticas como metotrexato, leflunomida e tofacitinibe, e os imunobiológicos de diversas classes (anti-TNF α , anti-IL6R, anti-CD20, CTLA4-Ig) já demonstraram ser efetivos em tratar a atividade inflamatória e em reduzir a progressão radiográfica, quando medida por escores que avaliam erosões e, portanto, padrão reabsortivo de dano. Estas drogas, inclusive, foram capazes de reduzir as taxas anuais de progressão radiográfica, nesta doença, nas duas últimas décadas⁽³⁵⁾. A remissão clínica completa ou pelo menos, um estado de baixa atividade de doença, são alvos bem estabelecidos atualmente, no

tratamento da AR, com a finalidade de se proteger a estrutura e a funcionalidade articulares. No entanto, já se demonstrou que mesmo em pacientes que alcançam este objetivo, o dano articular continua ocorrendo^(36, 37).

Nas EpA, as drogas imunossupressoras sintéticas e algumas terapias anticíticas biológicas (anti-TNF α , anti-IL12/23 e anti-IL17), estas últimas com evidências de maior poder, já comprovaram serem capazes de alterar a história natural, quando também é medido apenas o dano erosivo⁽³⁸⁻⁴²⁾. No entanto, quando se avalia o dano osteoproliferativo, ou seja, neoformação óssea patológica, presente principalmente nas EpA axiais, apesar de recentes estudos terem demonstrado algum efeito do bloqueio de TNF α em desacelerar a progressão radiográfica^(43, 44), até o momento, nenhum imunossupressor sintético ou biológico se mostrou indiscutivelmente capaz de inibi-lo, nem no esqueleto axial⁽⁴⁵⁻⁴⁸⁾, nem nas articulações periféricas⁽⁴⁹⁾. Ressalta-se que o uso contínuo de AINH também parece retardar o aparecimento de sindesmófitos na EA, embora isto ainda demande ser confirmado⁽⁵⁰⁻⁵⁴⁾. Não se sabe se tal efeito possa ocorrer também nas articulações periféricas e se, de fato existir, esteja relacionado à redução de prostaglandina-E-2 (PGE2), essencial para osteoblastogênese⁽⁵⁵⁾ e sabidamente inibidora da apoptose em osteoblastos e osteócitos^(31, 56).

Há alguns anos, Maksymovych e cols.⁽⁵⁷⁾ propuseram uma teoria (TNF-*brake* ou freio do TNF) para explicar o motivo pelo qual os bloqueadores de TNF α não reduzem a osteoproliferação nas EpA axiais, mesmo quando controlavam adequadamente a inflamação. Foi proposto que Dkk1 (um inibidor da via Wnt) induzido pelo TNF α , impediria a proliferação óssea (como um freio, motivo de seu nome) e quando terapias bloqueassem TNF α , em última análise, permitiriam o transcurso da sinalização Wnt sem a inibição de Dkk1, liberando assim a osteogênese. Os resultados de recentes estudos, que sugerem a redução da velocidade de formação de sindesmófitos após a terapia prolongada com anti-TNF α , exigem alguma atualização neste modelo^(58, 59).

Tais achados apontam para necessidade de compreender melhor os mecanismos fisiopatológicos por trás da remodelação articular nestas doenças, desenvolver novas abordagens terapêuticas capazes de restringir a neoformação óssea anormalmente exagerada em, pelo menos, alguns subgrupos, e de biomarcadores capazes de discriminá-los.

2.3 Sinoviócito fibroblasto símile

A membrana sinovial normal consiste em uma fina camada de 1-3 células de altura em contato direto com a cavidade articular (íntima, *lining* no inglês), contendo dois tipos celulares com características morfofuncionais de fibroblastos ou de macrófagos em um arranjo epitelióide, sem desmossomas conferindo adesão mais suave entre as células e sem membrana basal que a separe da camada de tecido conjuntivo frouxo subjacente (subíntima, *sublining* no inglês) que contém vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas, fibroblastos, adipócitos e poucos leucócitos. Sua presença e integridade, garantem suporte estrutural, lubrificação e nutrição da cartilagem articular⁽⁶⁰⁾.

A inflamação deste tecido, chamada de sinovite, revela de maneira geral, três alterações universais, presentes em níveis variados nas diversas doenças e até mesmo em fases diferentes da mesma doença: hiperplasia da camada íntima, neoangiogênese e infiltrado inflamatório na camada subíntima⁽³⁾.

Os sinoviócitos fibroblastos símile (FLS) ou sinoviócitos B, uma das células constituintes da camada íntima têm como função básica, secretar as fibras (principalmente o colágeno) e demais componentes proteicos do líquido sinovial. Algumas características morfofuncionais o distinguem, embora não inteiramente, de outros fibroblastos, inclusive dos residentes da camada subíntima: expressão mais difundida de caderina-11 (*calcium-dependent adhesion molecule-11*), com moderada especificidade para o FLS, pois na camada subíntima sua expressão parece se restringir às áreas ao redor dos vasos sanguíneos⁽⁶¹⁾; e, menos especificamente, expressão de lubricina e de UDPGD (*uridine diphosphoglucose dehydrogenase*), esta última necessária para síntese do ácido hialurônico, ambos constituintes do líquido sinovial⁽⁶²⁾.

Nos últimos anos, um maior conhecimento sobre o FLS permitiu expandir o conceito de célula estromal e considerá-la um elemento da imunidade inata. Como justificativa, argumenta-se sua expressão de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR), como os receptores semelhantes a *toll* (TLR), que são típicos de células sentinelas e estão envolvidos em um tipo primitivo e imediato de resposta imune a padrões moleculares endógenos e exógenos (DAMP e PAMP, respectivamente). Células com estes receptores produzem citocinas e quimiocinas em resposta à sua ativação⁽⁶²⁾. Espinoza e cols. já demonstraram, há mais de 20 anos, que sinoviócitos fibroblasto símile de indivíduos com AP e fibroblastos da derme de indivíduos com psoríase têm produção de PDGF β e IL1 β aumentadas em relação a fibroblastos de derme sadia usados como controle. PDGF β é um potente fator de crescimento para células de origem mesenquimal e IL1 β é a principal citocina

promovida pela ativação do inflamassoma⁽⁶³⁾. Adicionalmente, FLS também expressam moléculas do MHC classe II, o que lhes confere capacidade de apresentar antígenos⁽⁶⁴⁾.

Este tipo celular tem sido implicado na transformação de um processo inflamatório agudo e reparável para um crônico e persistente, responsável pela perpetuação da inflamação nas artrites crônicas⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾. Como justificativa para tal, já se confirmou tanto em pacientes com AR quanto EpA, que FLS recrutam linfócitos através de quimiocinas, ativam células dendríticas que migrarão até os órgãos linfoides, onde se dará a transição para a imunidade adquirida, e aumentam sua própria sobrevivência e a de outras células, impedindo a apoptose⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾. Inibir a apoptose, aliás, é a hipótese mais aceita para explicar a hiperplasia da camada íntima presente na sinovite, uma vez que FLS em divisão não são vistos com frequência nos estudos histológicos e várias evidências ligam inflamação a sua resistência à apoptose⁽⁶²⁾.

FLS também desempenham um papel chave na agressão inflamatória aos tecidos articulares por serem capazes de danificar a matriz cartilaginosa, através da expressão de moléculas de adesão que promovem sua aderência e de metaloproteinases (MMP) eficientes em degradá-la. Um modelo animal de artrite induzida em camundongos deficientes (*knockout*) de caderina-11 ampara o conceito da cartilagem como alvo dos FLS, pois nestes animais, a camada íntima sinovial é hipoplásica e há redução acentuada das erosões da cartilagem, o mesmo não ocorrendo com as erosões ósseas⁽⁷¹⁾. Ainda, FLS de indivíduos com AP e AR, mas não de controles saudáveis, são capazes de induzir a diferenciação de precursores mononucleares em osteoclastos, via RANKL⁽⁷²⁻⁷⁴⁾, confirmando sua capacidade indireta de lesar também o osso.

Nas espondiloartrites, as células mesenquimais, entre elas os FLS, parecem ter ainda mais importância na patogênese, como demonstrado em modelos animais e estudos genéticos. Camundongos TNF^{ARE} (um modelo de superexpressão de TNF α por deleção de sequências reguladoras inibitórias ARE – *AU-rich elements*) apresentam artrite, sacroiliite e doença inflamatória intestinal Crohn símile. Nestes animais, a doença intestinal só se desenvolve na presença de linfócitos T e B maduros, enquanto a doença articular ocorre independente destes, sendo mediada por células estromais^(75, 76). Semelhantemente, em ratos transgênicos para HLA-B27 e β -2-microglobulina humanos, o fenótipo completo da doença (artrite, espondilite, colite e doença cutânea/ungueal psoríase símile) também se desenvolve independentemente da presença de linfócitos CD8⁺^(77, 78).

Outro estudo analisou a expressão de genes de indivíduos com diferentes artropatias (EpA, AR e gota), em busca de diferenças que as pudessem distinguir. Os autores encontraram uma “assinatura” específica para as espondiloartrites, independente do seu

subtipo ou do tempo de evolução da doença. Surpreendentemente, a grande maioria destes genes superexpressos (21 dos 22 transcritos mais de três vezes) estava relacionada com a biologia dos miofibroblastos, que são células que exibem características de fibroblastos e de células musculares lisas. A possibilidade de serem FLS locais transdiferenciados em miofibroblastos em resposta a citocinas e fatores de crescimento do microambiente articular inflamatório foi levantada para explicar a presença deste tipo celular no tecido sinovial que, de outro modo, não contém células musculares⁽⁷⁹⁾. O achado de fenótipos equivalentes, em particular a expressão de α SMA (*alfa-smooth muscle actina*), entre sinoviócitos fibroblasto símile e miofibroblastos intestinais no modelo animal TNF ^{Δ ARE} apoia esta teoria⁽⁷⁵⁾.

Quanto à potência celular dos FLS, destaca-se um tópico ainda muito controverso e intrigante que diz respeito à presença de células mesenquimais tronco (MSC) na membrana sinovial, demonstradas por Bari e cols. desde 2001, capazes de se diferenciar até em células ósseas com mineralização da matriz⁽⁸⁰⁾. Até hoje, permanecem sem solução, questões como a origem exata desta célula totipotente, se ela representa um progenitor comum das outras células estromais da sinóvia ou até mesmo um FLS menos diferenciado^(81, 82).

Finalmente, todos estes achados apontam para um papel muito mais ativo, exercido pelos FLS nas diversas artrites. Sua capacidade para agredir os tecidos articulares e para sustentar a inflamação, resistindo à apoptose, produzindo citocinas pró-inflamatórias e recrutando outras células imunes, além da possibilidade de ainda deter alguma plasticidade são exemplos de funções que esta célula, modificada pelo estado patológico crônico, por mecanismos epigenéticos, como mudanças na cromatina ou metilação do DNA, pode desempenhar e que a afastam do modelo de respondedor passivo a estímulos, vigente há até cerca de duas décadas.

2.4 As citocinas TNF α , IL17 e IL22

Citocinas são proteínas, via de regra, pequenas moléculas, secretadas por vários tipos celulares, como as diversas subpopulações de linfócitos T (auxiliares e $\gamma\delta$ por exemplo), macrófagos, granulócitos, células estromais (como o FLS), entre outras. Estas proteínas relacionam-se principalmente com a comunicação entre as células imunes, mas também estão envolvidas na regulação de outros processos biológicos como a hematopoiese, angiogênese, reparação e reorganização de tecidos. Interleucina (IL) é o nome dado a algumas destas citocinas, com um sufixo numérico que a identifica, pois achava-se que agiam e eram produzidas apenas por leucócitos. As células TH podem ser classificadas em linhagens

distintas conforme a (s) citocina (s) necessária (s) para sua diferenciação e também a qual ou as quais compõem sua produção mais típica. Vide a figura 3, para melhor ilustração destas possibilidades, cujo número cresce à medida em que o conhecimento desta matéria avança. Algumas citocinas são agrupadas em “famílias” segundo sua localização genômica, estrutura proteica e/ou quanto aos receptores a que se ligam⁽⁸³⁻⁸⁵⁾.

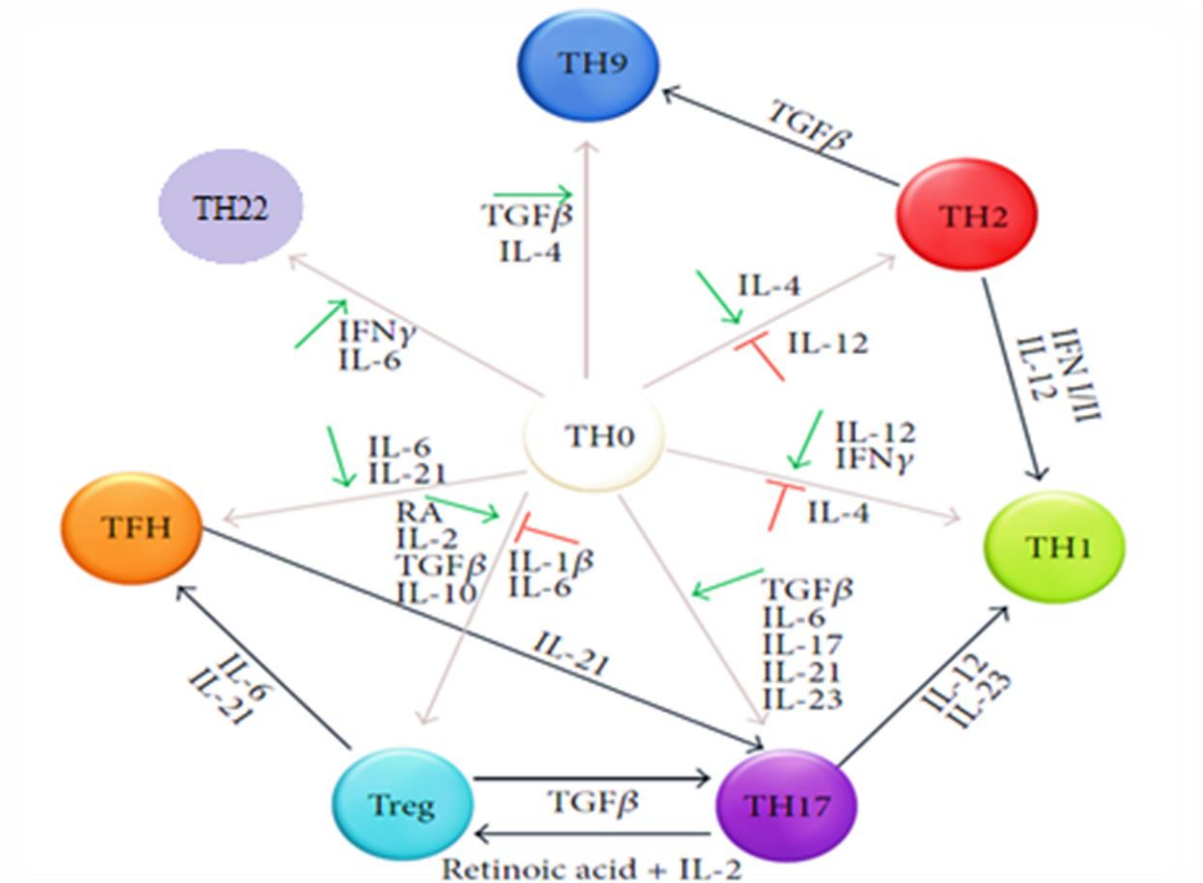


Figura 3 – Diferenciações e reprogramação de linfócitos auxiliares (TH).

Linfócitos CD4+ auxiliares “naive” (TH0) podem se diferenciar em TH específicos (setas cinzas) sob a influência de citocinas, que por um lado podem promover sua diferenciação (setas verdes) e por outro bloquear a de um tipo funcional oposto (traves vermelhas). Além disso, TH diferenciadas podem ser reprogramadas para adquirir um fenótipo diferente (setas pretas). Modificado de Baranovski et al, 2015⁽⁸⁵⁾.

2.4.1 TNFα

O TNFα, descrito em 1975 como um fator que induzia morte de células tumorais, é uma das três principais citocinas da resposta inflamatória aguda, que ainda conta com IL1β e IL6. Esta resposta inflamatória é o principal mecanismo de defesa contra infecções agudas e lesões teciduais por parte do sistema imune inato e se caracteriza pelo intenso infiltrado de leucócitos e aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de fluídos e proteínas do sangue para o espaço extravascular⁽⁸⁴⁾. O TNFα também é requerido para restabelecer a

homeostase, resolvendo a inflamação (por apoptose das células inflamatórias) e reparando os tecidos (remielinização, remodelação cardíaca, regeneração condral) além de outras funções benéficas como a organogênese linfoide.

Os macrófagos, as células dendríticas, as células T e NK são os principais produtores desta citocina, expressa sob duas formas: a primeira, uma proteína de membrana que exerce sua ação através da interação célula-célula, a qual é formada por um homotrímero que por sua vez pode ser clivado liberando as três cadeias no meio extracelular, que então podem se repolimerizar dando origem a sua segunda forma, uma proteína circulante. A forma membranosa liga-se exclusivamente a um dos dois receptores existentes, o tipo II (TNFR_{II}) enquanto que a forma solúvel pode ativar ambos (TNFR_I e TNFR_{II}). TNFR_{II}, quando ativado recruta uma proteína citoplasmática chamada fator associado ao receptor II de TNF α (TRAF2) o que inicia reações em cadeia (chamadas de complexo I) que levarão à ativação de MAPK, NF κ B e AKT e em última análise proliferação e sobrevivência celular, com inflamação e também regeneração teciduais. Já TNFR_I recruta outra proteína, um adaptador ao seu domínio de morte (TRADD do inglês *TNF α receptor associated death domain*) que também pode iniciar o complexo I, resultando predominantemente em inflamação, mas também o complexo II com ativação posterior da caspase-8 que induz apoptose.

A regulação entre a ativação dos complexos I ou II ainda não está totalmente elucidada, mas sabe-se que a presença de outros estímulos (pró ou contra a apoptose, por exemplo) influenciam qual caminho a ser seguido. TNFR_I é expresso universalmente e TNFR_{II} tem sua expressão mais restrita, como em neurônios, células imunes e endoteliais. Acredita-se que os efeitos homeostáticos de TNF α , citados acima, sejam mediados preferencialmente pelo TNFR_{II} e que ao TNFR_I caiba o papel primariamente patogênico^(86, 87).

Em FLS, TNF α induz rapidamente uma produção copiosa e sustentada de IL6, além de CXCL8/IL8, CCL5/RANTES (ambos quimiotáticos de leucócitos) e metaloproteinases (MMP1 e 3). Ressalta-se, que diferentemente do que ocorre em macrófagos, onde a estimulação parece levar a alterações mais fugazes, com retorno às condições basais após 24hs, em FLS os níveis destas proteínas podem permanecer elevados por vários dias⁽⁸⁸⁾. TNF α também induz a expressão de caderina-11, efeito revertido pelo uso de terapia anti-inflamatória potente como corticoide e anti-TNF α ⁽⁶¹⁾.

TNF α está implicado na perda óssea relacionada à inflamação, através de vários efeitos: RANKL tem sua expressão estimulada em diferentes tipos celulares pelo TNF α , entre

outras citocinas inflamatórias⁽⁸⁹⁾; também já se mostrou que TNF α é capaz de induzir a expressão, no tecido sinovial, do inibidor Wnt Dkk1, através de seu receptor TNFRI⁽⁹⁰⁾. Outro trabalho revelou que tanto TNF α quanto IL17 (e mais intensamente quando em conjunto) induziram destruição da matriz, além de reparação insuficiente, em um modelo de explante ósseo (*ex vivo*)⁽⁹¹⁾. Neste mesmo trabalho, estas duas citocinas, de maneira oposta, estimularam genes relacionados à osteogênese (Wnt5a, BMP2 e Runx2) em FLS cultivados isoladamente (*in vitro*), confirmando que o efeito final destas citocinas depende do sítio, das células envolvidas e da conjuntura em que agem.

Há cerca de duas décadas, iniciou-se o uso de imunobiológicos em reumatologia (primeiramente pelos anti-TNF α) e embora uma considerável proporção de pacientes não responda a esta modalidade de bloqueio (falha primária) ou durante seu uso tenha que interrompê-la por perda de eficácia (falha secundária) ou pelo aparecimento de paraefeitos (toxicidade), sua introdução representou uma revolução no tratamento das diversas artrites⁽⁸⁶⁾.

2.4.2 IL17

A IL17 pertence à família homônima que consiste em seis membros: IL17A, B, C, D, E (ou IL25) e F. A maior homologia é vista entre IL17A e IL17F (cerca de 50%), que podem ainda ser encontradas como homodímeros AA, FF ou heterodímero A/F, compartilham o mesmo complexo receptor e, por isso mesmo, exercem efeitos biológicos muito similares. Neste texto, IL17A, IL17A/F e IL17F serão tratadas apenas como IL17. Seu receptor, formado pelas subunidades IL17RA e IL17RC, é expresso ubiquamente em uma grande variedade de células, inclusive em sinoviócitos fibroblasto símile de pacientes com DAI^(92, 93). IL17 é a citocina assinatura de uma linhagem de linfócitos denominada TH17, inicialmente chamada de IL23-*derived*, uma vez que a presença de IL23 é requerida como etapa final de sua diferenciação e expansão. Por isso também, IL17 é conhecida como o elemento efetor do eixo IL23-TH17-IL17. É interessante destacar, como pode ser visto na figura 3, que sob a influência de TGF β , TH0 ativadas podem se comprometer com um dos caminhos funcionalmente opostos TH17 ou Treg dependendo, respectivamente, da presença ou não de IL6. O ambiente inflamatório, portanto, influencia o efeito de TGF β . Curiosamente, também sob o mesmo controle de IL6, mas livre de TGF β , a diferenciação escolhida é TH22.

Outras células, principalmente componentes da imunidade inata, como linfócitos CD8+, T γ δ , macrófagos, neutrófilos e mastócitos também são fontes abundantes desta citocina⁽⁹⁴⁻⁹⁷⁾. A resposta TH17 é, hoje em dia, considerada a responsável por inúmeros

efeitos, antes imputados à TH1 (previamente ao seu reconhecimento como linhagem independente de linfócitos auxiliares há cerca de uma década), tanto na defesa contra infecções bacterianas e fúngicas, quanto contribuindo para o desenvolvimento e cronicidade de diversas doenças inflamatórias^(85, 98).

Como já demonstrado, IL17 é capaz de induzir a proliferação de FLS^(99, 100) ativando-os e estimulando a secreção de vários produtos pró-inflamatórios como IL6, indutora de reagentes de fase aguda e estimuladora de linfócitos B; CXCL8/IL8 um quimiotático de neutrófilos; fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF); metaloproteinases e também CCL20, uma quimiocina atrativa dos próprios linfócitos TH17 que funciona como uma alça de auto alimentação desta resposta. Da mesma maneira, queratinócitos de pessoas com psoríase, também aumentam sua expressão de CCL20 em resposta a IL17⁽¹⁰¹⁾. Além disso, a exemplo do TNF α , IL17 induz a expressão de RANKL em osteoblastos favorecendo a reabsorção óssea^(102, 103). IL17, aliás, tende a sensibilizar os tecidos ao TNF α induzindo a expressão de seu receptor (TNFR2) e estabilizando a expressão de RNA mensageiros (mRNA) ativados por este, sendo por isso consideradas citocinas sinérgicas^(93, 98, 104).

Alguns exemplos de evidências de sua participação nas DAI estão listados a seguir: Níveis séricos e sinoviais de IL17, assim como número de células TH17 no sangue periférico, correlacionaram-se com atividade inflamatória sistêmica e local (histológica) na AR⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾; A expressão de IL17 e de Dkk1 (um inibidor da via Wnt) no tecido ósseo, estiveram aumentadas em pessoas com AR quando comparadas com controles com osteoporose primária, sugerindo ser este um dos mecanismos, além do eixo RANK/RANKL, para a perda óssea induzida por inflamação⁽¹⁰⁹⁾; TH17 foram correlacionados com atividade inflamatória e dano articular na AP⁽¹¹⁰⁾; Na EA, foram encontrados níveis séricos elevados de IL23 e IL17 e demonstradas células IL17+ nas articulações facetarias afetadas⁽⁹⁵⁾; Em adição, células apresentadoras de antígeno (APC) que expressam em sua membrana o homodímero de HLA-B27 (B27₂) no lugar do clássico heterotrímero (B27₂- β 2M), estimularam a sobrevivência e a proliferação de linfócitos T e NK, e a secreção de IL17, através do receptor KIR3DL2 destas células⁽¹¹¹⁾. Este achado, relaciona elegantemente o HLA-B27 à produção de IL17 por células não TH17, corroborando com outros resultados que já ratificaram, nas EpA, as células da imunidade inata como sua fonte principal^(95, 96).

Evidências robustas da participação da sinalização IL23/IL17 na patogênese das EpA, surgiram de estudos genéticos, como por exemplo a associação dos mesmos polimorfismos de IL23R (receptor de IL23) com maior suscetibilidade tanto para EA, quanto para condições relacionadas como a doença de Crohn e psoríase⁽¹¹²⁾. Em um magnífico

trabalho, Sherlock e cols. provaram que IL23 é suficiente para o desenvolvimento de entesite com neoformação óssea, em um modelo animal (camundongos B10.RIII imunizados com colágeno tipo II). Além disso, descobriram células T específicas expressando IL23R, até então ignoradas neste sítio, capazes de produzir IL17 e IL22 *in vitro*. Finalmente, mostraram que o bloqueio com anti-IL23 ou anti-IL17 reduziu a inflamação clínica e histologicamente⁽¹¹³⁾.

Como prova mais cabal da relevância desta citocina, ressalta-se o fato de que terapias dirigidas contra o eixo IL23-TH17/IL17, como os anticorpos monoclonais humanos ustekinumabe (anti-subunidade p40 da IL23) e secukinumabe (anti-IL17A) já foram aprovados em vários países para o tratamento das EpA, incluindo AP e EA. Ademais, encontram-se em fase de desenvolvimento diversas outras, como anti-receptor IL17RA, capaz de bloquear IL17C e IL25, além de IL17A/F; anti-subunidade p19 da IL23, que contrariamente ao anti-p40, não bloqueia IL12, mas apenas IL23; pequenas moléculas capazes de inibir ROR γ t, importante fator de transcrição da célula TH17, instabilizando assim sua resposta; e compostos incluindo duplo bloqueio (simultâneo ao TNF α e à IL17, por exemplo) com grande potencial para resgatar pacientes com resposta inadequada aos medicamentos atualmente disponíveis⁽⁹⁸⁾.

2.4.3 IL22

A IL22 é uma das citocinas da extensa família IL10. Considerada ambígua e com dupla vocação, por promover ações tanto de reparação e atenuação, quanto de agressão e intensificação da inflamação⁽¹¹⁴⁾. Exerce seus efeitos através da ligação a seu receptor, IL22R, um heterodímero formado pelas subunidades IL22R1 e IL10R2 (esta última comum ao receptor de IL10), expresso exclusivamente em células de origem mesenquimal como fibroblastos, queratinócitos e outras células epiteliais e estromais. Existe também um receptor solúvel (com afinidade quatro vezes maior que o transmembrana) chamado proteína ligante de IL22 (IL22BP) com expressão já documentada, em humanos, nas células dendríticas e eosinófilos do trato digestivo (onde IL22 parece ter um papel protetor da mucosa) e que já demonstrou bloquear IL22 *in vitro* e em modelos animais⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾. Apenas células hematopoiéticas secretam IL22 e curiosamente, pelo menos em humanos, não expressam seu receptor, por isso considera-se que IL22 estabeleça um diálogo unidirecional entre o sistema imune e o tecido estromal^(83, 85, 117).

TH22 é o nome como foi chamada a subpopulação de linfócitos T, com uma específica expressão de receptores de quimiocinas (CCR6+ CCR4+ CXCR3– CCR10+), capaz de secretar IL22, TNF α e IL13, mas não IL17, IFN γ ou IL4, respectivas assinaturas das

linhagens TH17, TH1 e TH2⁽⁸⁵⁾. Este subgrupo de linfócitos auxiliares tem origem a partir de um precursor CD4+ TH0 que se encontra localmente sob a influência predominante de IL6 (além de TNF α e/ou IFN γ) na ausência de TGF β . Além de TH22, outras células imunes que secretam IL22 já foram reconhecidas: TH1, TH17, células NK, linfócitos T CD8+ e T $\gamma\delta$ ⁽¹¹⁸⁾.

Acumulam-se evidências da amplificação do eixo TH22/IL22 no soro e tecido sinovial de pessoas com AR e AP, inclusive, correlacionando a intensidade de sua ativação a índices de atividade inflamatória destas doenças^(107, 108, 119-121). Em humanos, vários grupos já demonstraram que IL22 induz a proliferação de FLS (efeito potencializado pela coestimulação com TNF α) e sua ativação com consequente expressão de vários produtos como CCL2/MCP1 (uma quimiocina de monócitos), RANKL (o qual promoveu a osteoclastogênese *in vitro*) e as alarminas ou padrões moleculares associados ao dano (DAMP) S100A8/A9 que formam a calprotectina^(119, 120, 122-124). Similarmente, em um modelo experimental de artrite em camundongos deficientes de IL1Ra (antagonista do receptor de IL1), o bloqueio de IL22 levou a significativa redução da inflamação e número de erosões ósseas⁽¹²⁵⁾.

Já no modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) em camundongos DBA1, o duplo papel de IL22, contexto dependente, ficou bem evidente: IL22 administrada antes do início do quadro articular restringiu sua progressão, elevando níveis da inibitória IL10, além de reduzir *in vitro* a produção de IFN γ por linfócitos T (papel protetor). Contudo, camundongos deficientes de IL22 eram menos susceptíveis à artrite e seu bloqueio, quando administrado após o aparecimento dos sintomas, reduziu a gravidade do quadro (papel agressor)⁽¹²¹⁾.

Na doença psoriásica, estudos genéticos (tanto por análises de variação de números de cópias – CNV, quanto de polimorfismos de único nucleotídeo – SNP) associam IL22 a psoríase^(126, 127) e seu nível sérico já foi correlacionado à gravidade das manifestações cutâneas nesta doença⁽¹²⁸⁾. Modelos animais de superexpressão de IL22 exibem fenótipo semelhante a psoríase⁽¹¹⁴⁾ e o uso de anti-IL22 atenuou o quadro cutâneo nestes modelos.

Por fim, no estudo de Sherlock e cols. já citado previamente⁽¹¹³⁾, a expressão de IL22 também foi capaz, em menor escala que IL23, de provocar entesite. Todavia, IL22 foi a mais eficiente em induzir genes que regulam a formação óssea, especificamente, membros da família Wnt, BMP e fosfatase alcalina, sugerindo ser IL22 a mediadora do componente osteoproliferativo da doença, como ilustrado na figura 4.

Em conjunto, estes dados justificam o conceito de que TNF α , IL17 e IL22, desempenhem funções essenciais, algumas vezes em franca sinergia, já outras em

antagonismo patente, na geração, amplificação e perpetuação da resposta inflamatória e da lesão tecidual em várias doenças inflamatórias, sendo o sinoviócito fibroblasto símile um de seus principais alvos, nas artrites.

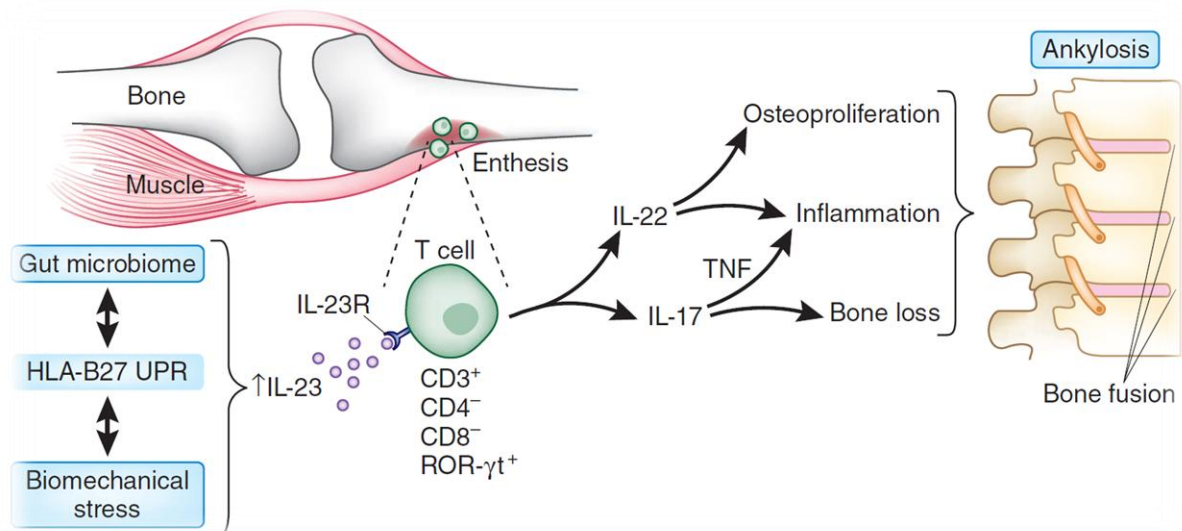


Figura 4 – O eixo interleucina-23 / interleucina-17 na patogênese das espondiloartrites.

Vários mecanismos levam a um aumento da expressão de IL23 nas EpA, como por exemplo, uma microbiota intestinal propícia, respostas de estresse celular por dobramento falho da molécula de HLA-B27 (UPR) e fatores biomecânicos. Esta IL23 é capaz de ativar células T residentes das ênteses que expressam seu receptor (IL23R) e promover inflamação e remodelação articular, através de outras citocinas efetoras como IL17 e IL22. Modificado de Lories e McInnes, 2012⁽¹²⁹⁾ sobre o trabalho de Sherlock et al, 2012⁽¹¹³⁾.

2.5 Via de sinalização Wnt

A via de sinalização Wnt constitui-se de uma rede de proteínas, filogeneticamente preservadas, que transmite sinais da superfície celular para o núcleo, onde induz a expressão de determinados genes (alvos). Seu nome se deve à combinação dos nomes dos proto-oncogenes Wg (*wingless*), em alusão às moscas *Drosophila* sem asas, onde melhor se caracterizou estes genes e de seu homólogo em vertebrados Int (*Integrase-1*). Ela é considerada fundamental nos processos de proliferação e diferenciação celulares e desempenha, entre outros, importante papel na hematopoiese, na sinaptogênese, no desenvolvimento mamário e na osteoblastogênese e, por conseguinte, na formação e na reparação ósseas desde o embrião⁽¹³⁰⁾. A célula mesenquimal tronco (MSC), multipotente, diferencia-se entre determinadas linhagens celulares (fibroblastos, osteoblastos, condrócitos, adipócitos ou miócitos) sob a determinação, entre outros fatores, da sinalização Wnt⁽¹³¹⁾.

Didaticamente, separa-se a Wnt em duas subdivisões, assim denominadas Wnt/canônica ou β catenina dependente e Wnt/não canônicas ou β catenina independente. Esta separação não representa uma distinção absoluta, até por que já se sabe que algumas moléculas são capazes de estimular ou inibir ambas as vias e até de estimular uma e inibir outra, dependendo em grande parte, da conjuntura de receptores expressos⁽¹³²⁾.

A via Wnt/canônica, muito mais estudada em osteoimunologia, tem início pela ligação de proteínas extracelulares (algum dos 19 ligantes Wnt conhecidos), codificadas pelos genes *wingless*, a um complexo receptor transmembrânico formado pela proteína LRP5 ou 6 (*low-density-lipoprotein receptor related protein*) e por uma das 10 proteínas *frizzled* (que possuem forma espiralada, daí esta denominação em inglês). Posteriormente, inicia-se uma cascata de eventos, com ativação da proteína intracelular Dsh (*Dishevelled*) e a inibição do complexo enzimático formado pelas proteínas axina1/2, APC (*adenomatous polyposis coli protein*), CK-1 (*Casein kinase-1*), glicogênio-sintetase-cinase-3 (GSK-3) e β catenina. Este último “passo” da via libera a β catenina deste complexo, também conhecido como “complexo de destruição” e impede sua degradação, constitutivamente programada. Existem dois *pools* de β catenina nas células: um ligado às caderinas-E, compondo na membrana plasmática um agrupamento proteico, capaz de mediar a adesão entre células; e outro, citoplasmático, “sequestrado” no “complexo de destruição” cuja finalidade é degradá-la por proteólise mediada por ubiquitinação (marcação de uma proteína com moléculas de ubiquitina para seu reconhecimento por um proteossoma). Portanto, as reações intracelulares (fase citosólica) da via Wnt/canônica têm como resultado final o acúmulo de β catenina, em sua forma estável, que se transloca para o núcleo (fase nuclear) onde interage com fatores de transcrição (TCF - *T cell factors* ou LEF - *lymphoid enhancing factors*) atuando como um coativador sobre a expressão de genes, como *c-myc*, *Axin2*, *Lef1*, *Opg* e *Ocn*. Desta maneira, induzindo, por exemplo, MSC a se diferenciarem em osteoblastos e não em adipócitos⁽¹³¹⁾ e a reduzirem a expressão de RANKL e aumentarem a de OPG, oscilando o equilíbrio da remodelação óssea em favor da formação⁽¹³³⁻¹³⁹⁾.

As vias Wnt/não canônicas mais conhecidas e bem descritas até o momento são a Wnt/PCP (*Planar Cell Polarity*) e a Wnt/ Ca^{++} . A primeira também se inicia pela ligação de ligantes Wnt a proteína *frizzled* com ativação de Dsh, embora através dos coreceptores ROR1/2 e não LRP5/6, com conseguinte ativação das GTPases (enzimas que hidrolisam GTP) Rho e RAC e das cinases ROCK (*Rho-associated kinase*) e JNK (*c-jun NH₂-terminal kinase*) envolvidas em processos como polarização, movimentação e diferenciação celulares. A via Wnt/ Ca^{++} induz a liberação de cálcio intracelular e consequente ativação de enzimas

sensíveis ao cálcio, como CamKII (*Ca⁺⁺/calmodulin-dependent kinase II*), PKC – proteína cinase C e calcineurina (CaCN)⁽¹⁴⁰⁾.

Existem moduladores extracelulares naturais da via Wnt, que a regulam, tanto inibindo, quanto estimulando, de maneira autócrina e parácrina. São exemplos de inibidores as glicoproteínas solúveis *Dickkopf-1* (Dkk1) e Esclerostina (SCL), a família de proteínas sFRP (*secreted frizzled-related protein*) e WIF1 (Wnt inhibitor factor-1) e Cerberus. Analogamente, existem produtos solúveis, que sinergizam com alguns ligantes Wnt, como as proteínas *R-spondins* 1 a 4 (Rspo 1-4). Dkk1, ao se ligar ao receptor transmembrânico LRP5/6 e a outro coreceptor (*Kremen1/2*), promove a internalização de LRP, impedindo sua ativação pelos ligantes Wnt, inibindo apenas a via Wnt/canônica (dependente do eixo LRP-axina- β catenina). SCL, da mesma forma que Dkk1, inibe a via Wnt/canônica por bloquear o receptor LRP5/6, ligando-se a este e ao coreceptor LRP4 (outro receptor relacionado às lipoproteínas como LRP5/6, mas com função inibitória da via). As sFRP, WIF1 e Cerberus regulam de forma negativa a via Wnt por atuarem como “iscas” solúveis para os ligantes Wnt. Portanto, este último grupo pode inibir tanto a via Wnt/canônica, quanto as independentes do eixo LRP-axina- β catenina. As *R-spondins* modulam positivamente a via Wnt por interferirem na ligação de Dkk1 a Krm2/LRP6 e por aumentar a fosforilação de LRP6, quando unidas a este e ao outro coreceptor LGR5/6 (*leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor*)⁽¹⁴¹⁾. A figura 5 ilustra simplificada a via intracelular e sua modulação extracelular.

Esclerostina tem sua expressão restrita à linhagem osteocítica⁽¹⁴²⁻¹⁴⁵⁾ enquanto Dkk1 já teve sua expressão documentada em várias outras células estromais, inclusive FLS de modelos animais e de humanos com artropatias inflamatórias^(90, 146). As proteínas sFRP-1, 3 (sFRP3 também é chamada de Frzb) e 4 já tiveram sua expressão determinada em sinoviócitos de pacientes com AR e OA, inclusive com expressão distinta entre diferentes tipos celulares, sendo maior a atividade de sFRP-1 e 4 em populações ricas em fibroblastos e sFRP-3/Frzb em populações ricas em macrófagos⁽¹⁴⁷⁾. Neste mesmo estudo, sFRP-2 e 5 não foram detectadas em sinoviócitos de artríticos nem de artrósicos.

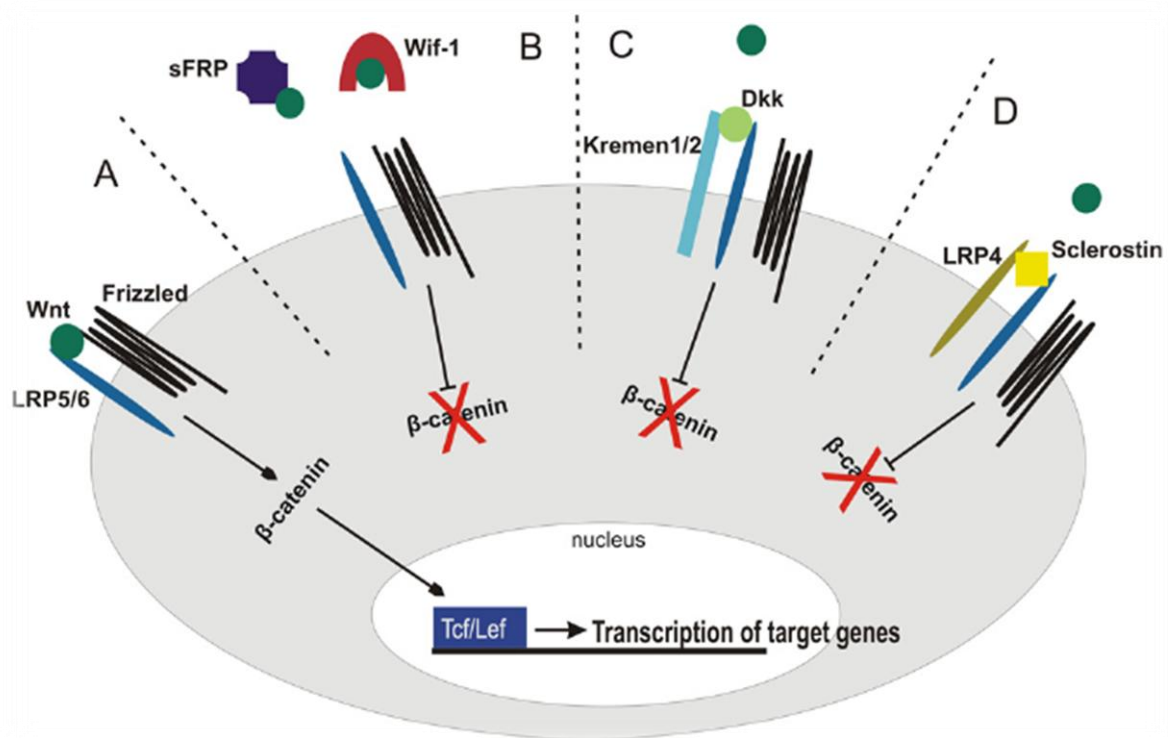


Figura 5 – Via de sinalização Wnt canônica e sua modulação extracelular.

(A) mostra a ativação via complexo LRP5/6 e Frizzled, levando a “liberação” de β catenina para o núcleo, onde se associa a fatores de transcrição (TCF e Lef), para ativação de genes alvo. (B) mostra a inibição por sFRP e WIF1 agindo como “iscas” – inibição canônica e não canônica (não mostrado). (C) e (D) mostram a inibição por Dkk1 e SCL, respectivamente, através do bloqueio ao LRP5/6 – inibição apenas canônica. Modificado de Boudin et al, 2013⁽¹⁴¹⁾.

Há vários indícios da participação da via de sinalização celular Wnt nos processos de remodelação óssea nas artropatias. No modelo animal transgênico de TNF α humano (camundongo hTNFtg), que desenvolve artrite e sacroiliite erosivas, não anquilosantes, o bloqueio de Dkk1, com um anticorpo murino (anti-Dkk1), aumentou os níveis séricos de osteoprotegerina (OPG), reduziu o número de osteoclastos e de erosões nas sacroilíacas, além de aumentar o número de osteoblastos locais e promover a anquilose destas articulações, sem modificar o nível de inflamação local. A expressão de colágeno X, que sugere a diferenciação de condrócitos hipertróficos, e de β catenina também foram aumentadas, indicando atividade da sinalização Wnt. Estes efeitos foram potencializados pelo bloqueio simultâneo de TNF α com infliximabe (um anticorpo monoclonal quimérico anti-TNF α), mas não ocorreram quando somente o TNF α foi inibido⁽¹⁴⁸⁾.

Neste mesmo modelo murino e em outros dois modelos experimentais de artrite, também em camundongos, (*collagen-induced arthritis* – CIA e *glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis* – GPI-IA), usando-se ainda o bloqueio de Dkk1, converteu-se o padrão de destruição óssea semelhante ao da artrite reumatoide em um padrão de osteoproliferação semelhante ao da osteoartrite⁽⁹⁰⁾. A análise da histologia articular revelou

redução do número de osteoclastos, aumento de osteoblastos e de deposição de osteóide, quando comparados com camundongos não bloqueados para Dkk1. Também se documentou redução dos níveis séricos de marcadores de reabsorção óssea e aumento dos níveis de marcadores de formação. Dkk1 estava aumentado (cerca de três vezes mais) no soro de camundongos hTNFtg, comparado com selvagens e também no tecido sinovial, onde a imunohistoquímica revelou sinoviócitos fibroblasto símile (FLS) e condrócitos como as células responsáveis por sua produção, em resposta ao TNF α . Este mesmo grupo mostrou que os efeitos reabsortivos (estimulação osteoclástica) de Dkk1 são mediados pela redução de osteoprotegerina (OPG), enquanto que os anti-anabólicos (inibição osteoblástica) são independentes do eixo RANKL-OPG, mediados diretamente pela inibição da via Wnt.

Em outro estudo com camundongos hTNFtg, o bloqueio de Dkk1 também levou a uma proteção contra perda óssea induzida pela inflamação, através da restauração da osteoblastogênese, além da neutralização da superexpressão de esclerostina induzida por TNF α em osteoblastos totalmente diferenciados⁽¹⁴⁴⁾. Interessantemente, o uso de *R-spondin 1* (Rspo1) recombinante humana, que pode ser considerado um antagonista natural de Dkk1, produziu efeitos semelhantes aos descritos em todos os estudos acima citados usando camundongos hTNFtg, ou seja, também inverteu o padrão de remodelação de osteólise para osteoproliferação. Além disso, Rspo1 demonstrou efeito protetor também sobre a cartilagem, efeito este que não foi visto quando se bloqueou o Dkk1 com anticorpo monoclonal. Tal achado levanta a possibilidade de Rspo1 poder exercer efeito (independente de Dkk1) na cartilagem⁽¹⁴⁹⁾.

Noutro estudo, utilizando-se de outro modelo experimental de espondiloartrite, camundongos PGISp (*proteoglycan-induced spondylitis mouse*) que apresentam espondilite e fusão articular após estímulo inflamatório inicial encontrou-se expressão de Dkk1 e SCL reduzidas (em 49% e 63%, respectivamente) quando comparadas com os tipos selvagens⁽¹⁵⁰⁾.

Em humanos, estudos prévios já documentaram níveis circulantes aumentados de Dkk1 em pessoas com artrite reumatoide, quando comparados com controles saudáveis e reduzidos em pacientes com espondilite anquilosante. Além disso, em indivíduos com AR, os níveis circulantes de Dkk1 se correlacionavam com a atividade da doença medida pelo índice DAS28 e houve redução significativa destes níveis após tratamento com anticorpos anti-TNF α . Também se demonstrou expressão aumentada de Dkk1 em tecido sinovial de pacientes com artrite reumatoide em comparação com o de pessoas com osteoartrite⁽⁹⁰⁾.

Em oposição a estes achados, outro grupo encontrou Dkk1 elevado no soro de espondilíticos, comparativamente com o soro de pacientes com AR, AP e controles saudáveis

e, estranhamente, houve aumento dos níveis desta proteína após terapia com anti-TNF α . O mesmo grupo avaliou o efeito da adição de soro de espondilíticos e controles saudáveis à cultura de células T *Jukart* (linhagem imortalizada de linfócitos T). A concentração de β catenina ativa (não fosforilada) foi analisada com o propósito de se medir a sinalização da via Wnt. O experimento também foi conduzido com a adição de anti-Dkk1. As células T *Jukart* tratadas com soro de EA apresentaram elevados níveis de β catenina ativa em relação às tratadas com soro controle. Quando presente o bloqueio de Dkk1, houve aumento da β catenina nas células tratadas com soro controle, o que não foi visto nas tratadas com soro de pacientes com EA. Os autores concluíram que o soro destes pacientes apresentava elevada concentração de Dkk1, porém com reduzida capacidade de inibir a via Wnt, aventando a possibilidade de redução qualitativa e não quantitativa de inibição da via Wnt na EA por parte de Dkk1⁽¹⁵¹⁾.

Heiland e cols. analisaram os níveis séricos de Dkk1 prospectivamente por dois anos, em 65 pacientes com EA de uma coorte alemã, e encontraram correspondência entre estes níveis e os de esclerostina, além de correlação inversa com o surgimento de sindesmófitos (altos níveis de Dkk1/SCL protegiam e baixos níveis marcavam risco)⁽¹⁴⁴⁾. Também já se documentou níveis circulantes aumentados de Dkk1, em pessoas com artrite psoriásica (mesmo entre indivíduos com doença não erosiva) quando comparados com controles saudáveis e acometidos apenas por psoríase cutânea, porém, sem se correlacionarem com escores de erosão e redução de espaço articular medidos por radiografia de mãos, pés e sacroilíacas⁽¹⁵²⁾.

Hardy e cols. concluíram que a expressão de Dkk1 por FLS humanos (provenientes de peças cirúrgicas de pacientes com artrites inflamatórias) é regulada pelos corticosteroides endógenos⁽¹⁴⁶⁾. As citocinas inflamatórias como TNF α e IL1 β não foram capazes isoladamente de aumentar a expressão deste inibidor em comparação com controles não tratados. O tratamento com corticosteroides por 24-48 horas aumentou significativamente a expressão de Dkk1 em comparação com controles não tratados. TNF α e IL1 β foram capazes de induzir a expressão de 11 β -HSD1 (11- β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo I – enzima que converte a cortisona inativa em cortisol ativo) sensibilizando os fibroblastos aos corticosteroides endógenos e assim indiretamente induzindo a produção de Dkk1. Além de estimular a secreção de Dkk1, os corticosteroides também aumentaram a expressão de sFRP-3, gene de outro inibidor da via Wnt e reduziram a expressão de Wnt2 (gene de um agonista desta via), caracterizando o que os autores chamaram de ação coordenada (sinérgica) de

inibição da via Wnt. É significativo notar que nem corticosteroides nem citocinas inflamatórias produziram os mesmos efeitos em fibroblastos da derme usados como controles.

De outro inibidor da via Wnt, a esclerostina (SCL), também há evidências de atividade distinta em diferentes doenças articulares. Já se encontrou SCL normalmente expressa em osteócitos de controles sem doença ósteo-articular e pacientes com artrite reumatoide, enquanto que estava reduzida nos osteócitos de indivíduos com osteoartrite e virtualmente ausente nos espondilíticos⁽¹⁴³⁾. Além disso, os níveis circulantes de SCL estavam diminuídos significativamente em indivíduos com EA comparados com controles saudáveis e, interessante, se correlacionavam com formação de novos sindesmófitos. Recentemente, outro grupo confirmou estes níveis circulantes reduzidos em pacientes com espondilite anquilosante em comparação com controles saudáveis. O tratamento com anti-TNF α produziu aumento destes níveis. Este aumento foi menor no subgrupo de pacientes que persistiam com PCR elevado e que coincidentemente tinham os mais baixos níveis basais de SCL⁽¹⁵³⁾.

Em síntese, estes dados apontam para um papel essencial, exercido por esta via de sinalização na distinção do tipo de remodelação articular a se processar nas diferentes artropatias. A confirmação do papel desempenhado pelos FLS como células chave na regulação desta via e, por conseguinte, nas diferenças fenotípicas encontradas em diferentes doenças articulares pode ter grandes implicações na compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos e em pesquisas futuras sobre alvos terapêuticos, em especial, que inibam a osteoproliferação, aparentemente excessiva, presente nas espondiloartrites.

3 Justificativas

Como já exposto no capítulo anterior, existe uma demanda por se compreender melhor os mecanismos por trás do dano e da consequente remodelação estrutural nas articulações, presentes nas doenças articulares inflamatórias. Encontrar preditores apropriados que definam os subgrupos de maior risco para progressão rápida e desenvolver novos alvos terapêuticos capazes de minimizar o dano osteoproliferativo, ainda sem inibição adequada, com as terapias atualmente disponíveis, são necessidades prementes no manejo destas doenças.

Tentar contribuir para esta busca é a justificativa clínica alegada por nosso grupo para escolher estudar uma via de sinalização e um tipo celular, seguramente implicados nestes fenômenos patológicos.

Uma revisão bibliográfica revelou uma escassez de trabalhos que investigaram a relação entre as citocinas inflamatórias, especialmente as recentemente descritas IL22 e IL17 e a expressão de moduladores da via de sinalização Wnt, especificamente pelo sinoviócito fibroblasto símile, nas doenças articulares inflamatórias. Na tabela 1 são mostrados os trabalhos originais encontrados nas bases de dados MEDLINE e LILACS até 31 de dezembro de 2015, usando-se diversas combinações dos descritores: *Wnt signaling pathway*, *Wnt ligands*, *Dkk1*, *sFRP3*, *Frzb*, *TNF α* , *IL17*, *IL22*, *inflammatory joint diseases*, *rheumatoid arthritis*, *psoriatic arthrititis*, *ankylosing spondylitis*, *spondyloarthritis*, *synovial fibroblast*, *synoviocytes* e *fibroblast-like synoviocytes*. As referências secundárias citadas em cada artigo, de outros trabalhos relacionados ao assunto, também foram incluídas.

Nosso projeto, idealizado em 2013, pretendeu preencher uma lacuna existente nesta área, ao estudar os efeitos de três citocinas (TNF α , IL22 e IL17) sobre a expressão de dois inibidores da via Wnt (sFRP3/Frzb e Dkk1) por FLS de indivíduos com três doenças articulares inflamatórias (AR, AP e EA).

Tabela 1 – Estudos que avaliam a expressão de moduladores da via de sinalização Wnt em sinoviócitos.

AUTOR, ANO	ESTÍMULOS USADOS	CÉLULA OU TECIDO ALVO	N	MODULADORES AVALIADOS	MÉTODO DE AVALIAÇÃO	DOENÇAS INCLUÍDAS	PRINCIPAIS RESULTADOS
Sen, 2000 ⁽¹⁵⁴⁾	- ¹	FLS	10	Wnt1, 5a, 10b, 11 e 13	RT-PCR e NB	AR e OA	Wnt5a + expresso em AR.
Ijiri, 2002 ⁽¹⁴⁷⁾	- ¹	Sinoviócitos	20	sFRP1 a 5	RT-PCR	AR e OA	Expressão predominante de sFRP3 em macrófagos e de sFRP1 e sFRP4 em fibroblastos.
Nakamura, 2005 ⁽¹⁵⁵⁾	- ¹	Sinóvia ²	26	Wnt7b e 10a	RT-PCR e IHQ	AR, OA e trauma (s/artrite)	Wnt7b + expresso em AR e OA.
Imai, 2006 ⁽¹⁵⁶⁾	- ¹	Sinóvia ²	14	Wnt5a, 10b e 14 sFRP1 a 5	RT-PCR e IHQ	AR e OA	Wnt10b + expresso em AR (~ inflamação). sFRP1 + expresso em OA (~ fibrose).
Diarra, 2007 ⁽⁹⁰⁾	- ¹	Sinóvia	10	Dkk1, Wnt4 e 5a	IHQ	AR e OA	Dkk1 + expresso em AR por FLS, endotélio e condrócitos.
Hardy, 2012 ⁽¹⁴⁶⁾	TNF α , IL1 β e CE	FLS	9	Dkk1	RT-PCR, ELISA, microarray	AR, OA e EA.	CE \uparrow expressão de Dkk1, mas não TNF α nem IL1 β . Dkk1 – expresso em EA.
Osta, 2015 ⁽⁹¹⁾	TNF α e IL17	FLS	6	Wnt5a	RT-PCR e Vermelho de alizarina	AR e OA	TNF α e IL17 \uparrow expressão de Wnt5a e mineralização da matriz
Yeremenco, 2015 ⁽¹⁵⁷⁾	TNF α e IL6	FLS	16	Dkk1	ELISA e microarray	AR e EpA	Correlação inversa entre Dkk1 e IL6. TNF α \uparrow e IL6 \downarrow Dkk1.

AR (artrite reumatoide), OA (osteoartrite), EA (espondilite anquilosante), EpA (espondiloartrites), FLS (sinoviócitos fibroblasto símile), Wnt (ligantes Wnt), sFRP (proteína secretada relacionada à espiralada), Dkk1 (*Dickkopf-1*), RT-PCR (reação em cadeia de polimerase em tempo real), NB (northern blot), IHQ (imunohistoquímica), \uparrow (induz), \downarrow (inibe), + (mais), - (menos), ~ (correlacionado a áreas de maior), TNF α (fator de necrose tumoral alfa), IL (interleucina), CE (corticosteroide).

¹ avaliação da expressão basal, sem estimulação experimental.

² sem identificar o tipo celular.

4 Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a expressão de moduladores da via Wnt por sinoviócitos fibroblasto símile de pessoas com doenças articulares inflamatórias.

O principal objetivo específico constituiu em produzir uma curva dose x resposta que pudesse identificar qual o binômio **dose e tempo de coleta do sobrenadante** pudesse melhor reconhecer possíveis diferenças existentes no efeito de cada estímulo pró inflamatório (com TNF α , IL17 ou IL22) sobre a expressão das proteínas de interesse. Pretende-se que esta informação sirva como referência para futuros experimentos com amostras maiores, incluindo outros métodos de avaliação de expressão gênica, como por exemplo, a quantificação do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) por reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR).

Adicionalmente, como objetivos específicos secundários, propôs-se analisar as concentrações de Dickkopf-1 (Dkk1) e de proteína secretada relacionada à espiralada (sFRP3/Frzb) no sobrenadante de FLS, comparando subgrupos de diferentes diagnósticos e estímulos, e também no líquido sinovial, onde incluiu-se o exame das citocinas usadas como estímulos.

Espera-se, com o cumprimento destes objetivos:

- Melhor caracterização fenotípica destas células.
- Maior elucidação dos processos fisiopatológicos envolvidos na origem do dano estrutural frequentemente presente nas doenças articulares inflamatórias e responsável por grande parte da deterioração funcional e da qualidade de vida dos pacientes que as apresentam.
- Propiciar o aparecimento de novas questões e hipóteses relacionadas ao problema estudado.
- Fomentar o crescimento de recursos humanos, captação de financiamentos, produção científica e colaborações desta linha de pesquisa.

5 Pacientes e Métodos

5.1 Seleção de pacientes

Adotou-se como critérios de inclusão, indivíduos com diagnóstico prévio de alguma das doenças articulares inflamatórias (DAI) sob investigação que estivessem sendo acompanhados nos ambulatórios de Reumatologia do HC-UFMG; idade igual ou maior a 18 anos; indicação pelo médico assistente de infiltração articular com corticoide, por atividade inflamatória de ao menos uma grande articulação (tornozelos, joelhos, punhos ou cotovelos), independentemente do tratamento sistêmico em vigência. Como garantia de que o diagnóstico de cada paciente estivesse correto, incluiu-se apenas os que preenchessem os critérios de classificação CASPAR de 2006⁽¹⁵⁸⁾ para AP, de Nova Iorque modificado de 1984⁽¹⁵⁹⁾ para EA e ACR de 1987⁽¹⁶⁰⁾ para AR. Seguiu-se como critérios de não inclusão: suspeita de artrite infecciosa; alguma condição que contraindicasse o procedimento como infecção de pele próxima à articulação, uso de anticoagulantes ou conhecida presença de distúrbio de coagulação; história prévia de artroplastia total em qualquer época ou de outro procedimento intra-articular nos últimos 12 meses.

No período de dezembro de 2013 a junho de 2015, foram incluídos 38 indivíduos. Porém, por dificuldades técnicas relacionadas a coleta (pouco ou nenhum fluido recuperado da artrocentese) ou ao cultivo celular (contaminação bacteriana e/ou fúngica, morte celular pela interrupção do fluxo de CO₂ para a estufa), 13 pacientes foram excluídos. No final, obteve-se material em condições adequadas para o estudo de 25 pacientes. Destes, 19 tinham amostras de líquido sinovial para dosagem direta (dois com AP, dois com EA e 15 com AR) e 14 tinham FLS cultivados para os experimentos (três com AP, quatro com EA e sete com AR).

A artrocentese foi realizada pelo próprio aluno (GGR) que possui experiência neste método, paramentado com equipamentos de proteção individual (luvas estéreis, óculos e máscara) após antissepsia da pele com clorexedina degermante a 4% e anestesia local com lidocaína a 1% sem vasoconstritor. Usou-se agulha de 18 G x 1 ½'' (1,2 x 40 mm) para aspiração do líquido sinovial em seringa estéril, sem conservantes ou anticoagulantes. Após o máximo esvaziamento articular, foi realizada a infiltração com corticosteroide de uso intra-articular na dose adequada para cada indicação. Os pacientes receberam orientações por escrito sobre os cuidados pós-procedimento, inclusive como proceder em caso de anormalidades.

Dados clínicos foram consultados nos prontuários de atendimento do serviço somente pelos investigadores envolvidos na pesquisa. Para análise dos marcadores de inflamação (PCR e VHS), foram considerados os resultados até 30 dias antes ou depois da coleta do líquido sinovial. Para o fator reumatoide, considerou-se uma pesquisa positiva em qualquer época. Para os tratamentos em uso, considerou-se os vigentes nos últimos três meses, antes da coleta. Todos os pacientes envolvidos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (vide apêndice – 11.1), aprovado pelo comitê de ética em pesquisa local Processo nº CAAE 161.968.13.3.0000.5149 (vide anexo – 12.1). Um quadro com as informações da coleta de cada paciente, cujos dados entraram na análise, encontra-se no apêndice – 11.2.

5.2 Cultivo de sinoviócitos fibroblasto símile (FLS)

O líquido sinovial foi coletado por artrocentese no Ambulatório Bias Fortes do HC-UFG e levado, em até duas horas, ao Laboratório Lineu Freire Maia, na Faculdade de Medicina da UFG, para processamento das amostras. Após ser centrifugado a 2000 RPM por 10 minutos deu origem a dois tipos de material: o sobrenadante (predominantemente proteico) de 19 amostras, congelado a -70°C para posterior dosagens de interesse e o precipitado (predominantemente celular) de 14 pacientes, usado para obtenção dos FLS.

Para o cultivo celular, este sedimento foi resuspenso em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Gibco, ref.: 12800-017) enriquecido com Soro Fetal Bovino (SFB) a 15% (Sigma, ref.: F-0643), aminoácidos não essenciais a 1% (MEM 100X – Gibco, ref.: 11140-050) antibióticos (Penicilina 10000 U Estreptomicina 10000 U – Gibco, ref.: 15140-122) e antifúngico (anfotericina B 1% – Gibco, ref.: 15245-012), semeado em placas de cultura de seis poços e mantido em estufa para cultura de células a 37°C e 5% de CO_2 . As trocas de meio de cultura foram realizadas a cada três dias e, assim que alcançavam confluência, as culturas eram repicadas para garrafas progressivamente maiores (com áreas de crescimento de 25, 75 e finalmente 175 cm^2). A cada repique, usou-se de 0,5 a 3ml de solução contendo tripsina a 0,05 % em EDTA 0,02 % (Gibco, ref.: 25300-062), após duas lavagens com PBS 1X (*phosphate buffered saline* ou tampão fosfato-salino) para remoção enzimática das células aderidas. Por fim, alíquotas (com aproximadamente 10^6 células) de cada amostra celular em quarta passagem (P4) foram congeladas, utilizando-se solução com SFB a 70%, DMEM a 22% e o crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO) a 8% em freezer a -70°C . Posteriormente transferiu-se as amostras para tanque de nitrogênio até sua utilização em

algum experimento. Toda a manipulação foi feita em capela de fluxo laminar (VECO) empregando-se técnica asséptica. Exemplos de FLS em cultura são mostrados na figura 6, a seguir.

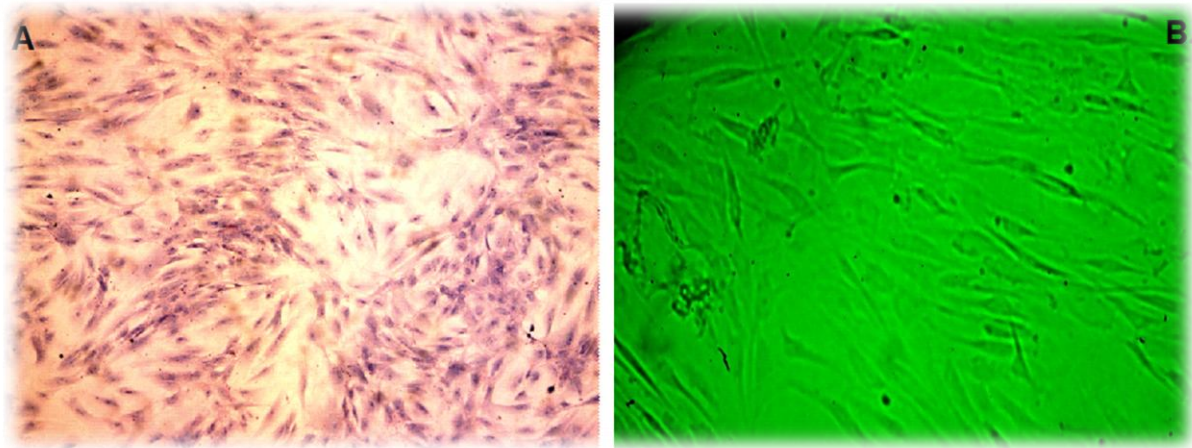


Figura 6 – Exemplos de sinoviócitos fibroblasto símile em cultura.

A – Microscopia óptica, coloração por Hematoxilina e Eosina, objetiva de 10X. Cedida pela dra. Rafaela Bicalho Viana Macedo. B – Microscopia de inversão, sem coloração, objetiva de 40X. arquivo do aluno GGR.

Como já foi demonstrado em nosso laboratório⁽¹⁶¹⁾ e também por outros grupos, para culturas originadas de líquido sinovial, as passagens iguais ou superiores a P4 tem como tipo celular predominante (representado por mais de 95%) o sinoviócito fibroblasto símile⁽¹⁶²⁻¹⁶⁶⁾. Para FLS humanos cultivados, já se revelou diferenças de expressão gênica consideráveis (>10% de diferença) a partir da nona passagem (P9)^(167, 168) e, por isso, limitou-se o uso de passagens entre P4 e P8 para todos os experimentos.

5.3 Estímulo dos FLS e dosagem de proteínas (*in vitro* e *ex vivo*)

FLS de um paciente com AP, um paciente com AR e um paciente com EA (n = 3), nas passagens entre sete (P7) e oito (P8) foram semeados em placas de 24 poços (contendo 250×10^3 células por poço) com meio DMEM e SFB 1%, incubadas por 24 horas, para posterior troca por meio contendo uma das três citocinas usadas para os estímulos: TNF α recombinante humano (Peprotech, ref.: 300-01A); ou IL-17A recombinante humana (Peprotech, ref.: 200-17) nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 ng/ml; ou IL-22 recombinante humana (Peprotech, ref.: 200-22) em doses de 1, 10, 100 e 200 ng/ml. Para todas as amostras houve controles sem estímulo e o sobrenadante celular foi coletado, em alíquotas de 100 μ l, após 24, 48 e 72 horas. O material foi estocado em freezer -70°C até o momento das dosagens. Dkk-1 e sFRP-3 (Frzb) foram dosados nos sobrenadantes celulares utilizando kits

para ELISA (*human Dkk1 DuoSet*[®] – R&D systems ref.: DY1906 e *human sFRP-3 DuoSet*[®] – R&D systems ref.: DY192) seguindo-se os protocolos do fabricante. Resumidamente, revestiu-se cada poço de uma microplaca de 96 poços com a solução de anticorpo de captura e manteve-se incubado por 24 horas em temperatura ambiente. Seguiu-se os demais passos do protocolo, sempre intercalados com lavagens manuais (realizadas três vezes entre cada passo) com a solução de lavagem (Tween^R 20 a 0,05% em PBS), respeitando-se os intervalos de tempo recomendados pelo fabricante: bloqueio das placas com reagente diluente (Albumina de soro bovino a 1% em PBS); colocação das amostras; cobertura com a solução de anticorpo de detecção; a seguir com a solução de estreptavidina-HRP, de substrato e finalmente com a *stop solution* (2 N H₂SO₄).

A espectofotometria foi realizada em leitor de placas com filtro de comprimento de onda calibrado a 450 nm. Todos os experimentos foram realizados, desde a estimulação até os ensaios para dosagem, em três repetições independentes (*triplicata*).

Dkk-1 e sFRP-3, além de TNF α , IL-17 e IL-22 (*human TNF α DuoSet*[®] – R&D systems ref.: DY210; *human IL-17 DuoSet*[®] – R&D systems ref.: DY317; *human IL-22 DuoSet*[®] – R&D systems ref.: DY782) também foram dosados no líquido sinovial das 19 amostras armazenadas, seguindo-se o mesmo protocolo descrito acima.

5.4 Análise estatística

Para a caracterização dos indivíduos do estudo, usou-se o teste exato de Fisher a fim de se comparar as frequências das variáveis nominais. Para a análise das concentrações medidas *ex vivo* (dosagem no líquido sinovial), usou-se a correlação de Spearman como medida de associação e os testes de aleatorização e U de Wilcoxon-Mann-Whitney, para comparação destas concentrações entre grupos. Para a análise dos resultados do experimento *in vitro* (dosagens no sobrenadante celular), utilizou-se os testes de aleatorização e U de Wilcoxon-Mann-Whitney, quando os resíduos não seguirem a distribuição normal. O teste F da ANOVA, os testes Hotteling e Pillay da MANOVA e o teste t de Student foram reservados para variáveis com resíduos normais. Considerou-se evidência de serem significativos, efeitos com valores $p < 0,05$ e para os testes de aleatorização, frequências relativas de $F^N > F^O$ menores de 5%, em que F^N representa os valores da estatística para $N = 10^5$ aleatorizações e F^O o valor da estatística para os dados originais, sem transformação. Empregou-se os programas R versão 3.2.3 e GraphPad Prism versão 6.01.

Por se tratar de um estudo piloto, cujo principal objetivo foi identificar a melhor combinação de dose X tempo capaz de discriminar eventuais diferenças de efeito, que deverão ser confirmadas em estudo posterior (já em planejamento) com um número maior de amostras, não foi utilizado todo material já disponível. Determinou-se, por conveniência, um tamanho amostral de três FLS, sendo um paciente de cada doença.

Dentre as amostras de líquido sinovial, obteve-se valores abaixo do limite de detecção (LD) do método, dependendo da proteína testada, em até 83% das amostras. Embora a alta viscosidade de algumas amostras possa ter contribuído para este fenômeno, o tratamento das alíquotas com hialuronidase (Apsen, Hyalozima 2000 UTR a 10 UI / ml por 1 hora a 37°C), não melhorou a performance dos ensaios (correlação de Spearman 0.97 entre as observações com e sem hialuronidase, sem diferença estatística no teste U).

Esta grande porcentagem de dados censurados limitaria grandemente as possibilidades analíticas nesta parte do estudo e como tentativa de se minimizar este problema, empregou-se uma estratégia de tratamento de censura chamada de imputação, que consiste no preenchimento dos valores desconhecidos, com números abaixo do LD, sem repetições, valendo-se da distribuição dos valores restantes conhecidos, para sua geração. Este método foi usado, conforme o que se preconiza, apenas para análise de parâmetros e testes estatísticos que consideraram a amostra como um todo, como por exemplo a análise da variância entre grupos. Quando para a análise, foi necessário considerar especificamente cada indivíduo, por exemplo para as correlações, substituiu-se os valores censurados por 50% do LD.

6 Resultados

Os dados demográficos e clínicos dos pacientes são apresentados na tabela 2. Não houve diferença estatística quanto ao sexo, idade, duração dos sintomas, marcadores inflamatórios, uso de imunossuppressores sintéticos, biológicos ou de corticoides entre os três grupos (tão pouco entre AR e EpA). Houve diferença estatística quanto ao uso de AINH ($p = 0,02$) e à positividade do fator reumatoide ($p < 0,01$). Os imunobiológicos em uso eram todos bloqueadores de TNF α , em doses estáveis há pelo menos seis meses.

Tabela 2 – Dados demográficos e clínicos dos pacientes incluídos no estudo, agrupados por diagnóstico.

	Diagnóstico				p
	AR	AP	EA	EpA	
Número de pacientes	16	4	5	9	
Sexo feminino (%)	75	75	20	44	NS
Idade (anos)	53,2 (12,2)	53,5 (12,9)	42,4 (12,1)	47,3 (13,0)	NS
Duração (anos)	13,7 (13,8)	3,3 (3,2)	15,8 (13,2)	10,2 (11,5)	NS
FR positivo (%)	88	0	0	0	< 0,001 (Entre AR e EpA)
VHS (mm/1ª hora)	30,1 (26,4)	28,0 (40,8)	64,2 (37,8)	48,1 (41,2)	NS
PCR (mg/dl)	27,6 (32,0)	22,6 (37,8)	49,2 (33,3)	37,4 (41,4)	NS
Uso de CE (%)	56	25	40	33	NS
Dose de CE (mg PDN/d)	8,1 (3,5)	10 (0) ¹	3,8 (1,8)	1,9 (3,4)	NS
Uso de AINH (%)	31	100	80	89	0,01 (Entre AR e EpA)
Imunossupressor sintético (%)	81	50	40	44	NS
Imunobiológico (%)	19	0	0	0	NS

AR (artrite reumatoide), AP (artrite psoriásica), EA (espondilite anquilosante), EpA (espondiloartrites, representa os dados agrupados de AP e EA), NS (não significativo), FR (fator reumatoide), VHS (velocidade de hemossedimentação), PCR (proteína C reativa), AINH (anti-inflamatórios não hormonais), CE (corticosteroide), PDN (prednisona)

Frequências são apresentadas em %. Demais valores são apresentados em médias (desvios padrões)

¹ Desvio padrão igual a zero por existir apenas um usuário.

As dosagens feitas no líquido sinovial podem ser vistas na tabela 3. Não houve diferença estatística nas concentrações de IL17, TNF α , IL22, sFRP3/Frzb e Dkk1, entre diferentes diagnósticos, tempo de evolução dos sintomas, uso de imunossuppressores sintéticos, glicocorticoides ou anti-inflamatórios.

Tabela 3 – Concentrações médias (desvios padrões) de citocinas e moduladores extracelulares da via Wnt medidas no líquido sinovial de pacientes com doenças articulares inflamatórias, agrupados por diagnóstico.

	Diagnóstico				p
	AR	AP	EA	EpA	
IL17 pg/ml	8,7 (3,9)	7,8 (0) ¹	7,8 (0) ¹	7,8 (0) ¹	NS
TNFα pg/ml	126,5 (291,9)	4,6 (1,6)	5,6 (3,1)	5,1 (2,1)	NS
IL22 pg/ml	911,8 (2,1 x10 ³)	177,0 (42,4)	113,1 (115,9)	145,0 (80,3)	NS
sFRP3 pg/ml	13,1 x10 ³ (30,2 x10 ³)	125,0 (0) ¹	413,5 (106,8)	269,3 (177,6)	NS
Dkk1 pg/ml	52,0 (57,9)	429,2 (563,0)	39,6 (12,0)	234,4 (395,4)	NS

AR (artrite reumatoide), AP (artrite psoriásica), EA (espondilite anquilosante EpA (espondiloartrites, representa os dados agrupados de AP e EA), NS (não significativo), IL17 (interleucina-17), TNF α (Fator de necrose tumoral alfa), IL22 (interleucina-22), sFRP3 (proteína secretada relacionada à espiralada), Dkk1 (Dickkopf-1)

¹ desvio padrão igual a zero por existirem apenas dados censurados, substituídos por 50% do LD.

As concentrações de IL22 e sFRP3/Frzb no líquido sinovial, foram positivamente correlacionadas, com um coeficiente de Spearman de 0,76 e valor p < 0,01 (Figura 7).

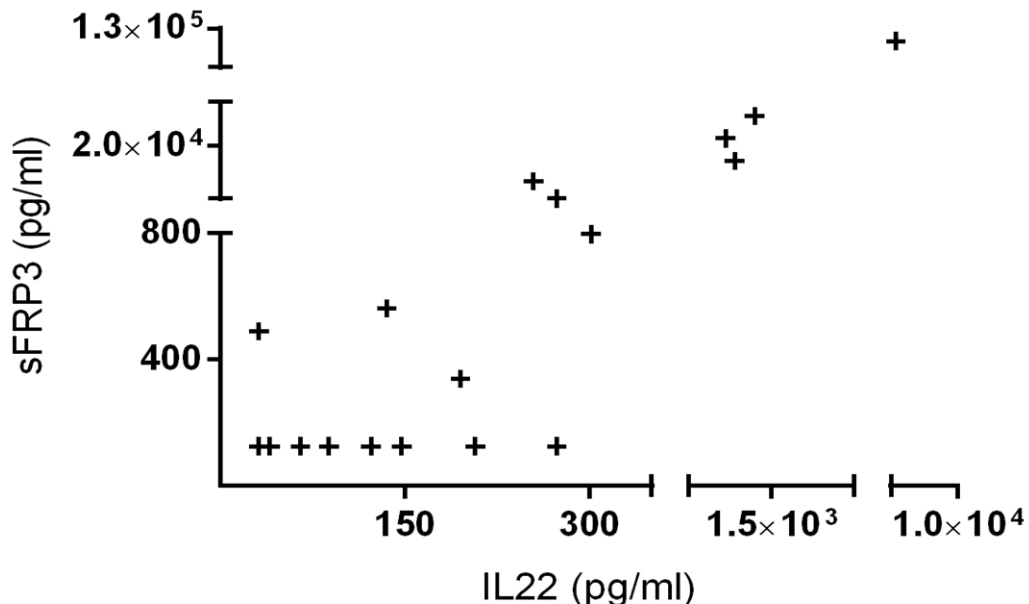


Figura 7 – Correlação entre as concentrações de IL22 e sFRP3 no líquido sinovial de pacientes com doenças articulares inflamatórias.

Coeficiente r de Spearman = 0,76. p = 0,002.

IL22 e sFRP3/Frzb apresentaram médias (\pm erro padrão da média) mais elevadas em usuários de imunobiológico $3.277,0 \pm 2.461,2$ pg/ml vs $276,6 \pm 97,87$ pg/ml (p = 0,02) e $49.654,0 \pm 34.594,1$ pg/ml vs $3.032,2 \pm 1.632,8$ pg/ml (p = 0,01), respectivamente. (Figura 8)

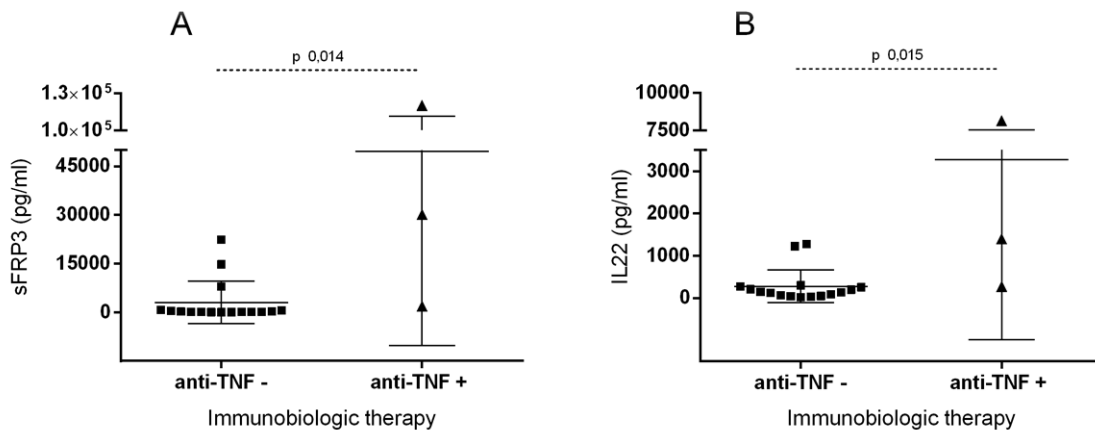


Figura 8 – Concentrações de IL22 e sFRP3 no líquido sinovial, agrupadas segundo o uso de imunobiológicos.

Concentrações de IL22 (A) e sFRP3/Frzb (B) medidas no líquido sinovial de indivíduos com DAI, agrupadas segundo o uso ou não de imunobiológico. As barras representam as médias com os desvios padrões.

Os moduladores sFRP3/Frzb e Dkk1 são expressos constitutivamente por FLS de todas as doenças, como pôde ser observada a presença destas proteínas mesmo no sobrenadante de FLS não estimulados (meio de cultura controle). Não se observou-se diferenças das concentrações de sFRP3/Frzb entre as doenças. Para Dkk1, o sobrenadante de FLS de AP apresentou concentrações mais baixas, com significância estatística ($p = 0,0001$ vs AR e $p < 0,0001$ vs EA), não havendo diferença entre EA e AR (Figura 9).

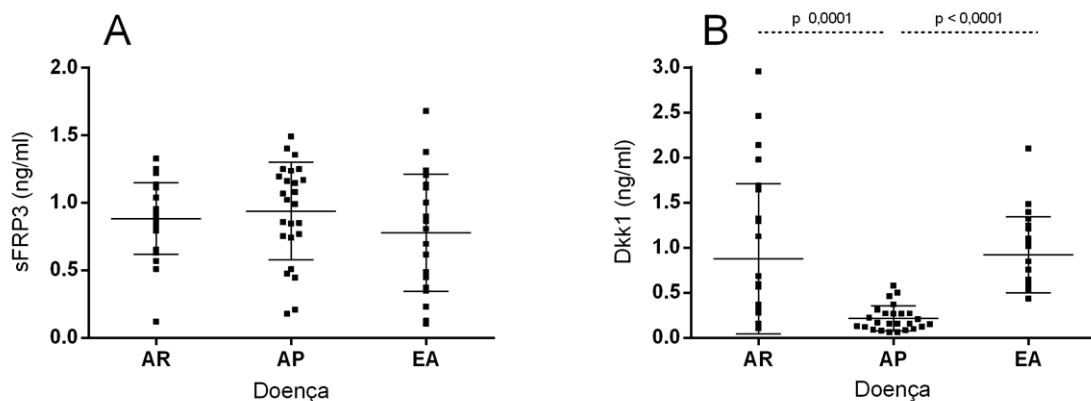


Figura 9 – Concentrações de sFRP3 e Dkk1 no sobrenadante celular sem estímulo.

Concentrações de sFRP3/Frzb (A) e Dkk1 (B) no sobrenadante celular sem estímulo, agrupadas por doenças. Valores apresentados em médias com os desvios padrões, procedentes de três repetições independentes. Sem diferença estatística entre diagnósticos em A.

As concentrações de sFRP3/Frzb e de Dkk1, apresentaram diferenças estatísticas quando comparados os intervalos de tempo entre o estímulo e a coleta do sobrenadante. Foram vistos valores mais baixos de sFRP3/Frzb na coleta após 72hs ($p < 0,0001$ vs 24hs e vs 48hs), mas sem diferença entre as coletas com 24 e 48hs. De maneira oposta, para Dkk1,

observou-se valores mais altos para a coleta com 72hs ($p = 0,020$ vs 24hs e $p = 0,012$ vs 48hs), também sem diferença entre as coletas com 24 e 48hs (Figura 10).

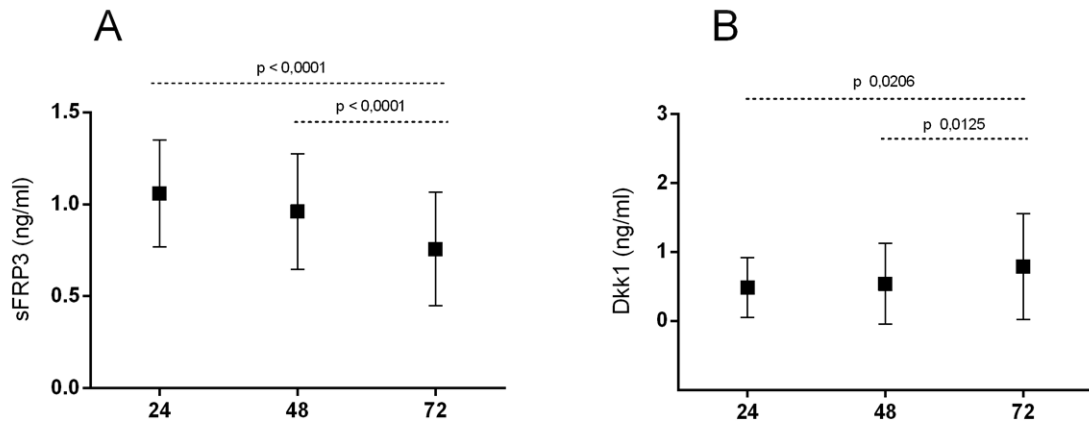


Figura 10 – Concentrações médias de sFRP3 e Dkk1 no sobrenadante celular, por tempo decorrido entre o estímulo e a coleta.

Comportamento das concentrações de sFRP3/Frzb (A) e Dkk1 (B) no sobrenadante celular, agrupadas em função do tempo entre o estímulo e a coleta. Valores apresentados em médias com os desvios padrões, procedentes de três repetições independentes.

A concentração de sFRP3/Frzb no sobrenadante celular apresentou significância estatística, quando comparados os FLS estimulados com IL22 e os não estimulados ($p = 0,0002$), independente do diagnóstico, sendo que as doses de 1 e 10 ng/ml alcançaram maior diferença (Figura 11). Quanto aos outros tratamentos, IL17 e $TNF\alpha$, não houve diferença de concentrações de sFRP3 no sobrenadante destes com o grupo sem estímulo.

Quanto às concentrações de Dkk1, não houve diferença quando os diferentes estímulos empregados foram comparados ao grupo sem estímulo (Figura 12).

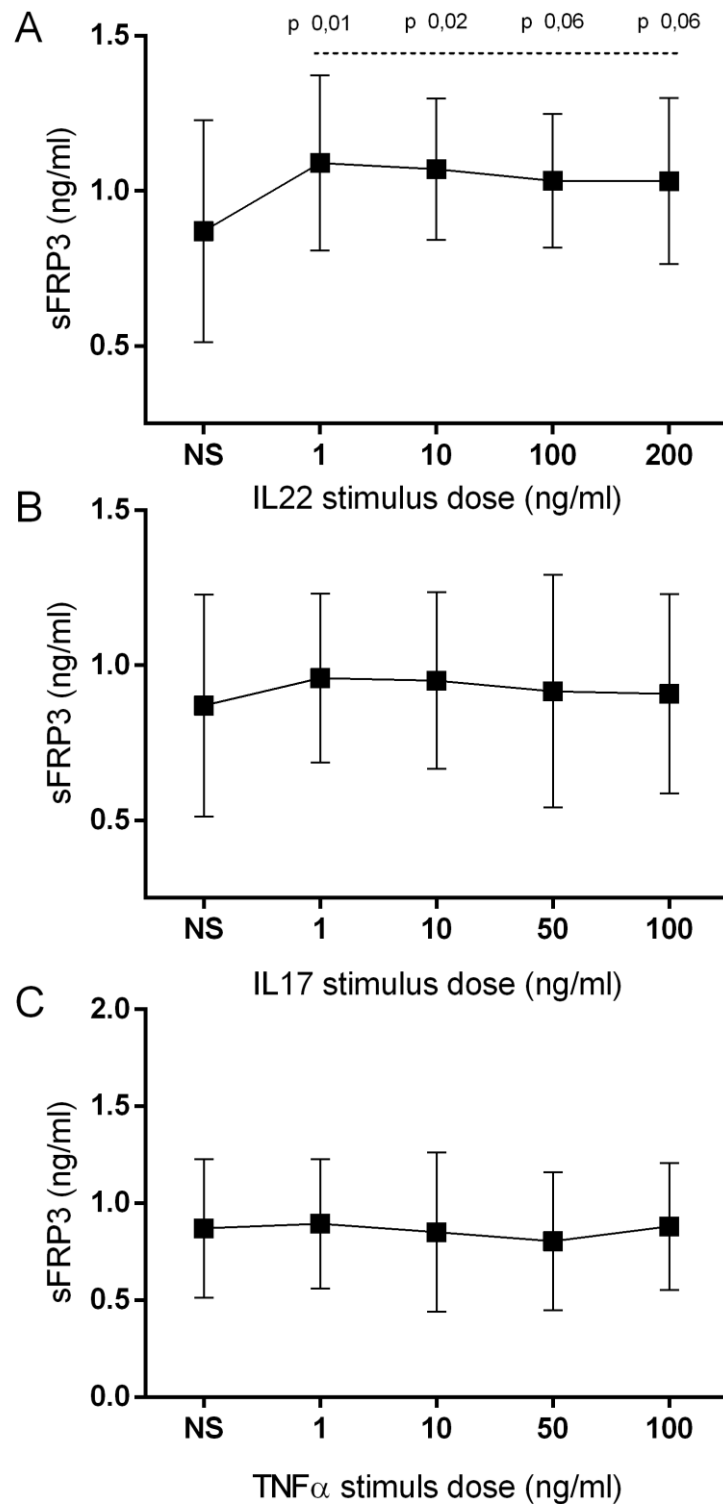


Figura 11 – Concentrações de sFRP3/Frzb no sobrenadante celular, após os diferentes estímulos.

Concentrações de sFRP3/Frzb no sobrenadante celular, após diferentes doses de IL22 (A), IL17 (B) e TNF α (C). Valores apresentados em médias com os desvios padrões, procedentes de três repetições independentes. Sem diferença estatística entre doses em (B) e (C).

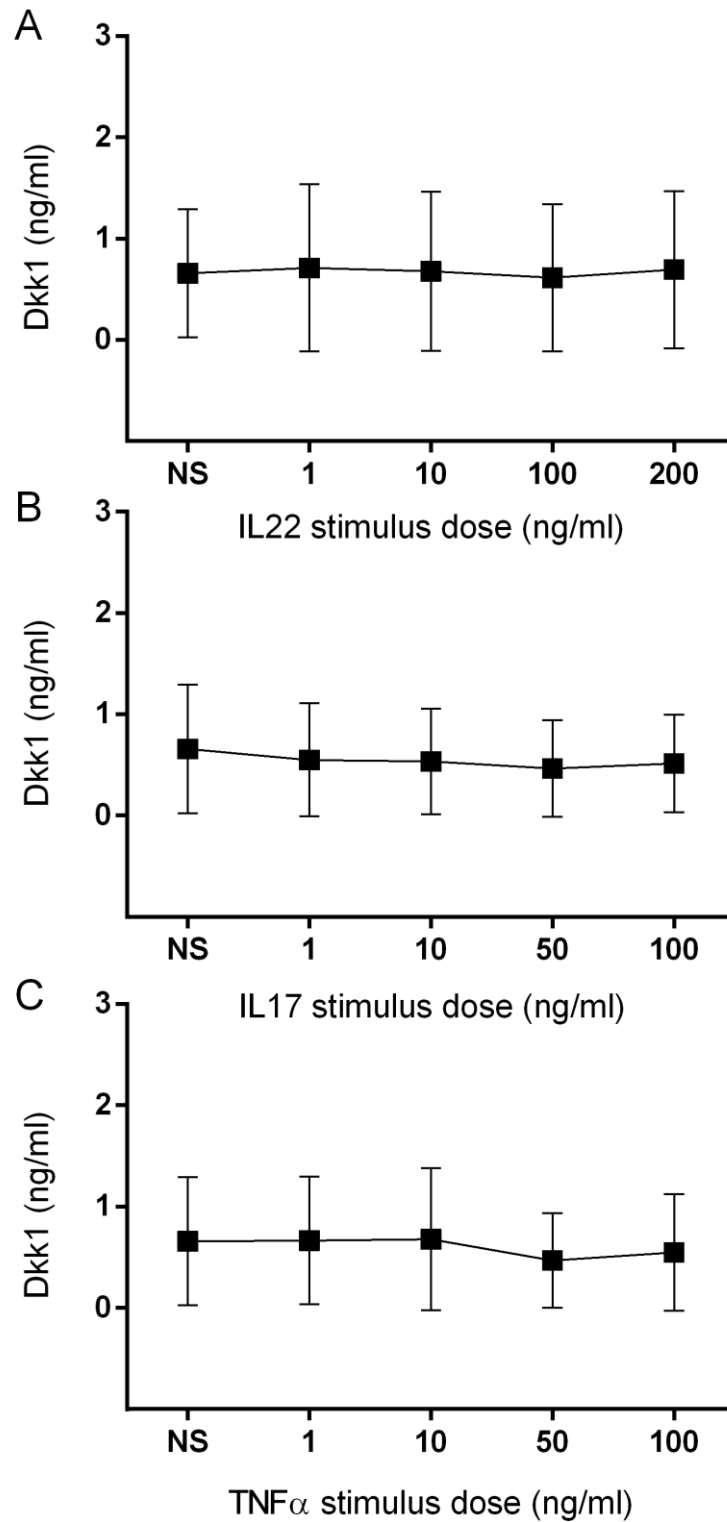


Figura 12 – Concentrações de Dkk1 no sobrenadante celular, após os diferentes estímulos.

Concentrações de Dkk1 no sobrenadante celular, após diferentes doses de IL22 (A), IL17 (B) e TNF α (C). Valores apresentados em médias com os desvios padrões, procedentes de três repetições independentes. Sem diferença estatística entre doses em (A), (B) e (C).

7 Discussão

Nossos resultados mostraram, pela primeira vez, a capacidade de IL22 de induzir a expressão de sFRP3/Frzb em um experimento *in vitro* com FLS e pela dosagem *ex vivo* no líquido sinovial. Inicialmente, este achado associa IL22 à inibição local da sinalização Wnt, com consequente bloqueio à osteogênese e com potencial para contribuir para o dano reabsortivo. Além disso, apresenta o FLS como uma fonte deste inibidor no líquido sinovial, atribuindo a esta célula, mais um mecanismo de lesão ao tecido ósseo. Interessantemente, apesar de não haver diferença estatística, observou-se níveis mais altos destas proteínas no líquido sinovial de pacientes com AR, uma doença reconhecida pelo dano reabsortivo.

Kim e cols.⁽¹²³⁾ já haviam demonstrado relação semelhante entre IL22 e RANKL, outra molécula contribuinte para a perda óssea associada à inflamação. Também, em alguns modelos experimentais de artrite, foi possível identificar o papel de IL22 em estimular a reabsorção óssea^(121, 125). Em direção oposta a estes achados, o estudo de Sherlock e cols.⁽¹¹³⁾ sugeriu que IL22 atue como mediadora do elemento osteoproliferativo nas espondiloartrites, induzindo nas ênteses, a expressão de genes relacionados à osteogênese. A discrepância entre estes achados pode representar a própria ambiguidade funcional de IL22, que já demonstrou desempenhar ações, até mesmo opostas, quando atuando em diferentes elencos celulares e sujeita a diferentes perfis de coestimulação⁽¹²¹⁾.

Ijiri e cols.⁽¹⁴⁷⁾ já haviam demonstrado a expressão de sFRP3 em sinoviócitos, mas predominantemente em macrófagos símile (tipo A) e não em FLS (tipo B). Além disso sua avaliação limitou-se apenas ao nível de transcrição (mRNA), não havendo a dosagem de proteína no extracelular, como foi realizado em nosso estudo.

Encontramos, no líquido sinovial, níveis de IL22 e sFRP3/Frzb mais altos entre os usuários de bloqueadores de TNF α , quando comparados aos de não usuários. Em doenças como psoríase e Crohn, já se demonstrou, em modelos animais e em humanos, a relação entre resposta favorável ao uso destas medicações e a redução, tanto do número de células TH17 e TH22, quanto dos níveis de IL17 e IL22, no sangue e nas articulações. Estes resultados corroboram para a hipótese de que a persistência de níveis elevados destas citocinas, sejam circulantes ou teciduais, esteja associada à resposta inadequada à terapia⁽¹⁶⁹⁻¹⁷²⁾. Como em nosso estudo foram incluídos apenas pacientes que se encontravam com atividade inflamatória articular, nosso resultado pode refletir exatamente o insucesso terapêutico destes casos.

Dkk1, por sua vez, não teve sua expressão aumentada por nenhum dos tratamentos testados. Embora já tenha sido demonstrado que TNF α induza sua expressão no tecido sinovial por sinoviócitos, isto não se repetiu em nosso trabalho^(90, 157). Sabe-se que FLS respondem rapidamente ao estímulo com TNF α , produzindo grandes quantidades de IL6⁽⁸⁸⁾, a qual já se mostrou ser capaz de inibir a produção de Dkk1, nestas mesmas células⁽¹⁵⁷⁾. Assim sendo, uma das hipóteses que levantamos para explicar por que em nosso estudo isto não se confirmou, foi que o presumível aumento de IL6 induzido pelo TNF α pode ter anulado o efeito deste sobre a expressão de Dkk1. Além disso, para Hardy e cols.⁽¹⁴⁶⁾, a expressão de Dkk1 por FLS é regulada diretamente por glicocorticoides e não por citocinas inflamatórias. Uma vez que, naquele estudo, dexametasona, mas não TNF α ou IL1 β levou FLS a aumentar Dkk1 (tanto ao nível de mRNA, quanto da proteína). Além disso, como TNF α foi capaz de sensibilizar os FLS aos corticoides endógenos, aumentando a expressão de 11 β -HSD1 (uma enzima conversora/ativadora de glicocorticoides), os autores atribuíram à esta citocina, um efeito estimulante indireto sobre a expressão de Dkk1.

O comportamento oposto, visto nas concentrações de Dkk1 e sFRP3/Frzb, em relação ao tempo decorrido entre o estímulo e a coleta do sobrenadante, deve refletir diferenças nas meias-vidas destas proteínas no microambiente experimental. Esta distinção, inclusive, não esteve associada a nenhum tipo de doença ou à presença ou não de estímulo e poderia relacionar-se com a degradação mais precoce de sFRP3/Frzb, não compensada por sua produção.

Quanto ao achado de níveis mais baixos de Dkk1 no sobrenadante (sem estímulo) de FLS do paciente com artrite psoriásica, ressalta-se que não se observou o mesmo padrão nas dosagens no líquido sinovial, onde, pelo contrário, foram vistas maiores concentrações de Dkk1, nas amostras desta enfermidade, porém sem significância estatística (Tabela 2). Devido ao pequeno número amostral não é possível concluir tratar-se de uma particularidade desta doença. Além disso, estudos prévios mostram resultados inconclusivos: Hardy e cols. demonstraram que a indução de Dkk1 é menos intensa na EA em relação a AR⁽¹⁴⁶⁾, achado que apoia o modelo de Dkk1 como marcador de dano reabsortivo⁽¹⁷³⁻¹⁷⁵⁾. Já Yemenco e cols. não viram diferença entre os níveis de Dkk1 no líquido sinovial da AR e das EpA, em concordância com nosso estudo⁽¹⁵⁷⁾. Não achamos diferença de concentrações de sFRP3 entre as três doenças em nosso estudo, assim como Ijiri e cols.⁽¹⁴⁷⁾ não o observou entre AR e OA. Trabalhos com maior tamanho amostral, em cada grupo diagnóstico, são necessários para se confirmar a existência de tais diferenças na expressão de moduladores da via Wnt e, mais além, de respostas heterogêneas aos estímulos, inerentes às doenças.

Nosso estudo teve como principal limitação, o pequeno número amostral, decorrente das dificuldades do manejo de culturas primárias, que impuseram um atraso inaceitável aos limites de prazo para um projeto de mestrado. Após os primeiros oito meses de coleta de material, já havíamos alcançado um total de 28 pacientes, porém, por contaminação das culturas e por outros problemas que levaram à morte das células, houve uma perda de cerca de 60% destas amostras (17/28). Este revés nos forçou à extensão do prazo de coleta, tornando inviável nossa intenção inicial, de usar todo o material em um experimento maior, guiado pelos resultados do experimento piloto.

Como outra fragilidade em nosso estudo, podemos mencionar que os resultados das dosagens realizadas no líquido sinovial, especialmente as de IL17 e Dkk1, apresentaram uma proporção de observações abaixo do limite de detecção muito grande: 83% para IL17 e 63% para Dkk1. Tal dimensão de dados censurados pode significar que a referida proteína encontra-se realmente em níveis baixos neste tipo de amostra biológica ou que o método utilizado para sua medida não tenha sido capaz de fazê-lo com boa performance. Um dado que favorece a primeira hipótese, neste caso, é que as únicas referências que encontramos com dosagens de IL17 e Dkk1 no líquido sinovial, relatam valores tão ou mais baixos que os encontrados em nosso estudo, mesmo quando métodos mais sensíveis foram utilizados: Quanto à IL17, Jain e cols.⁽¹⁷⁶⁾, estudando pacientes com AR, utilizaram-se de um ensaio ultrasensível (Erenna® Immunoassay System) e descreveram valores médios de 13 pg/ml, enquanto nós encontramos nossa média nesta mesma doença foi de 8,7 pg/ml. Já para o Dkk1, Honsawek e cols.⁽¹⁷⁷⁾, analisaram pacientes com OA primária de joelhos, utilizando-se de um kit ELISA do mesmo fabricante dos kits utilizados por nós, porém com maior sensibilidade (Quantikine® - R&D systems), referiram valores médios de 58,6 pg/ml, enquanto nós encontramos médias de 52 a 429 pg/ml. Ressalta-se, que quanto às demais proteínas, a quantidade de dados censurados foi menor (15% para IL22, 44% para TNF α e 47% para sFRP3).

8 Conclusões

Os inibidores da via Wnt sFRP3/Frzb e Dkk1 são constitutivamente expressos por fibroblastos sinoviais de indivíduos com diferentes doenças articulares inflamatórias (artrite reumatoide, artrite psoriásica e espondilite anquilosante).

Os níveis de IL22 e sFRP3/Frzb se correlacionam positivamente no líquido sinovial de pacientes com estas doenças articulares inflamatórias e IL22 induziu um aumento da expressão *in vitro* do inibidor sFRP3/Frzb pelos FLS, o que pode representar alguma função desta citocina na inibição local da via Wnt e determinação de distintos padrões de remodelação articular.

9 Considerações finais

Este trabalho constituiu mais passo para o fortalecimento desta linha de pesquisa ampliando o conhecimento sobre o sinoviócito fibroblasto símile de indivíduos com doenças articulares inflamatórias e também sobre os efeitos de citocinas pró-inflamatórias nesta célula, em especial a IL22, demonstrando-se pela primeira sua relação com a inibição da sinalização Wnt, através de sFRP3/Frzb.

A linha de pesquisa continuará, no curto prazo, com um aumento do tamanho amostral, utilizando-se da inclusão de novos pacientes e da utilização de outras amostras já armazenadas, explorando ainda os efeitos destas citocinas na expressão tanto de agonistas, quanto de inibidores desta via e de possíveis diferenças intrínsecas às doenças. Ainda planejamos estudar a potencialidade celular do FLS, afim de se confirmar ou não sua plasticidade e examinar os possíveis efeitos da sinalização Wnt na determinação de sua diferenciação. É também nossa intenção, investigar a relevância destes achados em desfechos clínicos de interesse mais direto, como a progressão do dano articular, a limitação funcional das pessoas acometidas por estas doenças e a resposta aos tratamentos usados.

Agradecimentos:

Este estudo contou com o apoio do Fundo de Apoio à Pesquisa e ao Ensino da Sociedade Brasileira de Reumatologia (FAPE-SBR) e financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

10 Referências bibliográficas

1. Cardiel MH, Latin American Rheumatology Associations of the Pan-American League of Associations for R, Grupo Latinoamericano de Estudio de Artritis R. First Latin American position paper on the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2006;45 Suppl 2:ii7-ii22.
2. Pinto MRC, Bértolo MB, Kakehasi AM, Carvalho MAP. Artrite reumatoide. In: Carvalho MAP, Lanna CCD, Bértolo MB, Ferreira GA, editors. *Reumatologia diagnóstico e tratamento*. 4 ed. Rio de Janeiro: AC Farmacêutica LTDA.; 2014.
3. van de Sande MG, Baeten DL. Immunopathology of synovitis: from histology to molecular pathways. *Rheumatology*. 2015.
4. Resende GG, Lage RC, Carvalho MAP. Espondiloartrites. In: Carvalho MAP, Lanna CCD, Bértolo MB, Ferreira GA, editors. *Reumatologia diagnóstico e tratamento*. 4 ed. Rio de Janeiro: AC Farmacêutica LTDA.; 2014.
5. Baeten D, Breban M, Lories R, Schett G, Sieper J. Are spondylarthritides related but distinct conditions or a single disease with a heterogeneous phenotype? *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(1):12-20.
6. Said-Nahal R, Miceli-Richard C, D'Agostino MA, Dernis-Labous E, Berthelot JM, Duche A, et al. Phenotypic diversity is not determined by independent genetic factors in familial spondylarthropathy. *Arthritis and rheumatism*. 2001;45(6):478-84.
7. Amor B, Santos RS, Nahal R, Listrat V, Dougados M. Predictive factors for the longterm outcome of spondyloarthropathies. *The Journal of rheumatology*. 1994;21(10):1883-7.
8. Dougados M, Baeten D. Spondyloarthritis. *The Lancet*. 2011;377(9783):2127-37.
9. Bomtempo CAS, Lage RC, Ferreira GA, Carvalho MAP. Avaliação clínica, laboratorial e radiográfica de brasileiros com espondiloartropatias. *Revista brasileira de reumatologia*. 2006;46(4):238-45.
10. Ramalho ES, Freitas GG, Kosminsky S, et al. Espondilite anquilosante: estudo epidemiológico em trinta casos. *Revista brasileira de reumatologia*. 1989;28:1-2. ;28:1-2.
11. Sampaio-Barros PD, Bertolo MB, Kraemer MH, Neto JF, Samara AM. Primary ankylosing spondylitis: patterns of disease in a Brazilian population of 147 patients. *The Journal of rheumatology*. 2001;28(3):560-5.
12. Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 40^a ed: Churchill Livingstone; 2008.
13. Benjamin M, McGonagle D. The anatomical basis for disease localisation in seronegative spondyloarthropathy at entheses and related sites. *J Anat* 2001;199:503–26.
14. McGonagle D, Gibbon W, O'Connor P, Green M, Pease C, Emery P. Characteristic magnetic resonance imaging enthesal changes of knee synovitis in spondylarthropathy. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(4):694-700.
15. Laloux L, Voisin MC, Allain J, Martin N, Kerboull L, Chevalier X, et al. Immunohistological study of entheses in spondyloarthropathies: comparison in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2001;60:316–21.
16. Dernis E, Said-Nahal R, D'Agostino MA, Aegerter P, Dougados M, Breban M. Recurrence of spondylarthropathy among first-degree relatives of patients: a systematic cross-sectional study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2009;68(4):502-7.
17. Brown MA, Kenna T, Wordsworth BP. Genetics of ankylosing spondylitis-insights into pathogenesis. *Nature reviews Rheumatology*. 2016;12(2):81-91.
18. McGonagle D, McDermott M. A Proposed Classification of the Immunological Diseases. *PLoS Med* 2006;3(8):e297.
19. McGonagle D, Benjamin M, Tan AL. The pathogenesis of psoriatic arthritis and associated nail disease: not autoimmune after all? *Current opinion in rheumatology*. 2009;21(4):340-7.
20. Ambarus C, Yeremenko N, Tak PP, Baeten D. Pathogenesis of spondyloarthritis: autoimmune or autoinflammatory? *Current opinion in rheumatology*. 2012;24(4):351-8.
21. Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, Krausz S, Cantaert T, Yeremenko N, et al. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritides, including psoriatic arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(4):966-75.
22. Baeten D, Moller HJ, Delanghe J, Veys EM, Moestrup SK, De Keyser F. Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(5):1611-23.
23. Gracey E, Inman RD. Chlamydia-induced ReA: immune imbalances and persistent pathogens. *Nat Rev Rheumatol*. 2012;8(1):55-9.
24. Mease P, Genovese MC, Gladstein G, Kivitz AJ, Ritchlin C, Tak PP, et al. Abatacept in the treatment of patients with psoriatic arthritis: results of a six-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II trial. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(4):939-48.

25. Wendling D, Dougados M, Berenbaum F, Brocq O, Schaeferbeke T, Mazieres B, et al. Rituximab treatment for spondyloarthritis. A nationwide series: data from the AIR registry of the French Society of Rheumatology. *The Journal of rheumatology*. 2012;39(12):2327-31.
26. Lemos LL, de Oliveira Costa J, Almeida AM, Junior HO, Barbosa MM, Kakehasi AM, et al. Treatment of psoriatic arthritis with anti-TNF agents: a systematic review and meta-analysis of efficacy, effectiveness and safety. *Rheumatology international*. 2014;34(10):1345-60.
27. Siebert S, Tsoukas A, Robertson J, McInnes I. Cytokines as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases. *Pharmacological reviews*. 2015;67(2):280-309.
28. Martin TJ, Gooi JH, Sims NA. Molecular Mechanisms in Coupling of Bone Formation to Resorption. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2009;19(1):73–88.
29. Kular J, Tickner J, Chim SM, Xu J. An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical biochemistry*. 2012;45(12):863-73.
30. Soltanoff CS, Chen W, Yang S, Li Y-P. Signaling Networks that Control the Lineage Commitment and Differentiation of Bone Cells. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2009;19(1):1–46.
31. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(2):229-38.
32. Lories R. The balance of tissue repair and remodeling in chronic arthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2011;7(12):700-7.
33. Walsh NC, Gravalles EM. Bone remodeling in rheumatic disease: a question of balance. *Immunol Rev*. 2010;233:301-12.
34. Schett G. Joint remodelling in inflammatory disease. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66 Suppl 3:iii42-4.
35. Carpenter L, Nikiphorou E, Sharpe R, Norton S, Rennie K, Bunn F, et al. Have radiographic progression rates in early rheumatoid arthritis changed? A systematic review and meta-analysis of long-term cohorts. *Rheumatology*. 2016.
36. Molenaar ET, Voskuyl AE, Dinant HJ, Bezemer PD, Boers M, Dijkmans BA. Progression of radiologic damage in patients with rheumatoid arthritis in clinical remission. *Arthritis and rheumatism*. 2004;50(1):36-42.
37. Cohen G, Gossec L, Dougados M, Cantagrel A, Goupille P, Daures JP, et al. Radiological damage in patients with rheumatoid arthritis on sustained remission. *Annals of the rheumatic diseases*. 2007;66(3):358-63.
38. Mease P, Kivitz AJ, Burch FX, E.L. S, Cohen SB, Ory P, et al. Continued Inhibition of Radiographic Progression in Patients with Psoriatic Arthritis Following 2 Years of Treatment with Etanercept *The Journal of rheumatology*. 2006;33:712-21.
39. Kavanaugh A, Antoni CE, Gladman D, Wassenberg S, Zhou B, Beutler A, et al. The Infliximab Multinational Psoriatic Arthritis Controlled Trial (IMPACT): results of radiographic analyses after 1 year. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65(8):1038-43.
40. van der Heijde D, Kavanaugh A, Gladman DD, Antoni C, Krueger GG, Guzzo C, et al. Infliximab inhibits progression of radiographic damage in patients with active psoriatic arthritis through one year of treatment: Results from the induction and maintenance psoriatic arthritis clinical trial 2. *Arthritis and rheumatism*. 2007;56(8):2698-707.
41. Simon P, Pfoehler C, Bergner R, Schreiber M, Pfreundschuh M, Assmann G. Swollen joint count in psoriatic arthritis is associated with progressive radiological damage in hands and feet. *Clin Exp Rheum*. 2012;30:45-50.
42. Kavanaugh A, McInnes IB, Mease PJ, Krueger GG, Gladman DD, van der Heijde D, et al. Clinical efficacy, radiographic and safety findings through 2 years of golimumab treatment in patients with active psoriatic arthritis: results from a long-term extension of the randomised, placebo-controlled GO-REVEAL study. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012.
43. Baraliakos X, Haibel H, Listing J, Sieper J, Braun J. Continuous long-term anti-TNF therapy does not lead to an increase in the rate of new bone formation over 8 years in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* doi:10.1136/annrheumdis-2012-202698. 2013.
44. Haroon N, Inman R, Learch T, Weisman M, Lee M, Rahbar MH, et al. The Impact of Tumor Necrosis Factor Alfa Inhibitors on Radiographic Progression in Ankylosing Spondylitis. *Arthritis and rheumatism*. 2013;65(10):2645–54.
45. Baraliakos X, Listing J, Brandt J, Haibel H, Rudwaleit M, Sieper J, et al. Radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis after 4 yrs of treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. *Rheumatology*. 2007;46(9):1450-3.
46. van der Heijde D, Landewe R, Baraliakos X, Houben H, van Tubergen A, Williamson P, et al. Radiographic findings following two years of infliximab therapy in patients with ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(10):3063-70.
47. van der Heijde D, Landewe R, Einstein S, Ory P, Vosse D, Ni L, et al. Radiographic progression of ankylosing spondylitis after up to two years of treatment with etanercept. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(5):1324-31.

48. van der Heijde D, Salonen D, Weissman BN, Landewe R, Maksymowych WP, Kupper H, et al. Assessment of radiographic progression in the spines of patients with ankylosing spondylitis treated with adalimumab for up to 2 years. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(4):R127.
49. Finzel S, Kraus S, Schmidt S, Hueber A, Rech J, Engelke K, et al. Bone anabolic changes progress in psoriatic arthritis patients despite treatment with methotrexate or tumour necrosis factor inhibitors. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012.
50. Wanders A, Heijde D, Landewe R, Behier JM, Calin A, Olivieri I, et al. Nonsteroidal antiinflammatory drugs reduce radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis: a randomized clinical trial. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(6):1756-65.
51. Kroon F, Landewe R, Dougados M, van der Heijde D. Continuous NSAID use reverts the effects of inflammation on radiographic progression in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(10):1623-9.
52. Poddubnyy D, Rudwaleit M, Haibel H, Listing J, Marker-Hermann E, Zeidler H, et al. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on radiographic spinal progression in patients with axial spondyloarthritis: results from the German Spondyloarthritis Inception Cohort. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(10):1616-22.
53. Kroon FPB, van der Burg LRA, Ramiro S, Landewé RBM, Buchbinder R, Falzon L, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for axial spondyloarthritis (ankylosing spondylitis and non-radiographic axial spondyloarthritis) (Review). *TheCochrane Library* 2015(7).
54. Sieper J, Listing J, Poddubnyy D, Song IH, Hermann KG, Callhoff J, et al. Effect of continuous versus on-demand treatment of ankylosing spondylitis with diclofenac over 2 years on radiographic progression of the spine: results from a randomised multicentre trial (ENRADAS). *Annals of the rheumatic diseases*. 2015.
55. Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *The Journal of clinical investigation*. 2002;109(11):1405-15.
56. Kitase Y, Barragan L, Qing H, Kondoh S, Jiang JX, Johnson ML, et al. Mechanical induction of PGE2 in osteocytes blocks glucocorticoid-induced apoptosis through both the beta-catenin and PKA pathways. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(12):2657-68.
57. Maksymowych WP, Chiowchanwisawakit P, Clare T, Pedersen SJ, Ostergaard M, Lambert RG. Inflammatory lesions of the spine on magnetic resonance imaging predict the development of new syndesmophytes in ankylosing spondylitis: evidence of a relationship between inflammation and new bone formation. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(1):93-102.
58. Maksymowych W. Evidence in support of the validity of the TNF brake hypothesis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2013;72:e31.
59. Baraliakos X, Braun J. Response to 'Evidence in Support of the Validity of the TNF Brake Hypothesis' by Maksymowych. *Ann Rheum Dis* doi:10.1136/annrheumdis-2012-202698. 2013;72 (12).
60. Moraes S. *Histologia Básica*. Histologia Básica. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
61. Vandooren B, Cantaert T, ter Borg M, Noordenbos T, Kuhlman R, Gerlag D, et al. Tumor necrosis factor alpha drives cadherin 11 expression in rheumatoid inflammation. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(10):3051-62.
62. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological reviews*. 2010;233(1):233-55.
63. Espinoza LR, Espinoza CG, Cuellar ML, Scopelitis E, Silveira LH, Grotendorst GR. Fibroblast function in psoriatic arthritis. II. Increased expression of beta platelet derived growth factor receptors and increased production of growth factor and cytokines. *The Journal of rheumatology*. 1994;21(8):1507-11.
64. Sousa EBd, Casado PL, Neto VM, Duarte MEL, Aguiar DP. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Research & Therapy* 2014;5:112.
65. Buckley CD, Pilling D, Lord JM, Akbar AN, Scheel-Toellner D, Salmon M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol*. 2001;22(4):199-204.
66. Buckley CD, Filer A, Haworth O, Parsonage G, Salmon M. Defining a role for fibroblasts in the persistence of chronic inflammatory joint disease. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004;63 Suppl 2:ii92-ii5.
67. Kontoyiannis D, Kollias G. Fibroblast biology. Synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: leading role or chorus line? *Arthritis Res*. 2000;2(5):342-3.
68. Pap T, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 2000;2(5):361-7.
69. Chan A, Filer A, Parsonage G, Kollnberger S, Gundle R, Buckley CD, et al. Mediation of the proinflammatory cytokine response in rheumatoid arthritis and spondylarthritis by interactions between fibroblast-like synoviocytes and natural killer cells. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(3):707-17.

70. Chang SK, Gu Z, Brenner MB. Fibroblast-like synoviocytes in inflammatory arthritis pathology: the emerging role of cadherin-11. *Immunol Rev.* 2010;233(1):256-66.
71. Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, Noss EH, Watts GFM, Chisaka O, et al. Cadherin-11 in Synovial Lining Formation and Pathology in Arthritis. *Science.* 2007;315:1006-10.
72. Mori G, Cantatore FP, Brunetti G, Oranger A, Colaianni G, Quarta L, et al. Synovial fluid fibroblasts and lymphocytes support the osteoclastogenesis in human psoriatic arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007;1117:159-64.
73. Colucci S, Brunetti G, Cantatore FP, Oranger A, Mori G, Quarta L, et al. Lymphocytes and synovial fluid fibroblasts support osteoclastogenesis through RANKL, TNF α , and IL-7 in an in vitro model derived from human psoriatic arthritis. *The Journal of pathology.* 2007;212(1):47-55.
74. Vandooen B, Cantaert T, Noordenbos T, Tak PP, Baeten D. The abundant synovial expression of the RANK/RANKL/Osteoprotegerin system in peripheral spondylarthritis is partially disconnected from inflammation. *Arthritis and rheumatism.* 2008;58(3):718-29.
75. Armaka M, Apostolaki M, Jacques P, Kontoyiannis DL, Elewaut D, Kollias G. Mesenchymal cell targeting by TNF as a common pathogenic principle in chronic inflammatory joint and intestinal diseases. *The Journal of experimental medicine.* 2008;205(2):331-7.
76. Kontoyiannis D, Pazarakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity.* 1999;10(3):387-98.
77. Taurog JD, Dorris ML, Satumtira N, Tran TM, Sharma R, Dressel R, et al. Spondylarthritis in HLA-B27/human beta2-microglobulin-transgenic rats is not prevented by lack of CD8. *Arthritis and rheumatism.* 2009;60(7):1977-84.
78. May E, Dorris ML, Satumtira N, Iqbal I, Rehman MI, Lightfoot E, et al. CD8 alpha beta T cells are not essential to the pathogenesis of arthritis or colitis in HLA-B27 transgenic rats. *J Immunol.* 2003;170(2):1099-105.
79. Yeremenko N, Noordenbos T, Cantaert T, van Tok M, van de Sande M, Canete JD, et al. Disease-specific and inflammation-independent stromal alterations in spondylarthritis synovitis. *Arthritis and rheumatism.* 2013;65(1):174-85.
80. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. *Arthritis and rheumatism.* 2001;44(8):1928-42.
81. De Bari C. Are mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis the good or bad guys? *Arthritis research & therapy.* 2015;17:113.
82. El-Jawhari JJ, El-Sherbiny YM, Jones EA, McGonagle D. Mesenchymal stem cells, autoimmunity and rheumatoid arthritis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians.* 2014;107(7):505-14.
83. Sabat R, Witte E, Witte K, Wolk K. IL-22 and IL-17: An Overview. In: Quesniaux V, Ryffel B, Padova FD, editors. *IL-17, IL-22 and Their Producing Cells: Role in Inflammation and Autoimmunity.* 2 ed: Springer Basel; 2013.
84. Abbas AK. *Cellular and Molecular Immunology.* 7 ed 2012.
85. Baranovski BM, Freixo-Lima GS, Lewis EC, Rider P. T Helper Subsets, Peripheral Plasticity, and the Acute Phase Protein, alpha1-Antitrypsin. *BioMed research international.* 2015;2015:184574.
86. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews Rheumatology.* 2016;12:49-63.
87. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nature reviews Immunology.* 2015;15(6):362-74.
88. Lee A, Qiao Y, Grigoriev G, Chen J, Park-Min KH, Park SH, et al. Tumor necrosis factor alpha induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism.* 2013;65(4):928-38.
89. Silva I, Branco J. rank/rankl/opg: literature review. *acta reumatol port.* 2011;36:209-18.
90. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature medicine.* 2007;13(2):156-63.
91. Osta B, Roux JP, Lavocat F, Pierre M, Ndongo-Thiam N, Boivin G, et al. Differential Effects of IL-17A and TNF-alpha on Osteoblastic Differentiation of Isolated Synoviocytes and on Bone Explants from Arthritis Patients. *Frontiers in immunology.* 2015;6:151.
92. Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Genovese MC. IL-17 receptor and its functional significance in psoriatic arthritis. *Molecular and cellular biochemistry.* 2012;359(1-2):419-29.
93. Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon Y, Kim WU, et al. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-kappaB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. *Arthritis research & therapy.* 2004;6(2):R120-8.
94. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine.* 2013;64(2):477-85.
95. Appel H, Maier R, Wu P, Scheer R, Hempfing A, Kayser R, et al. Analysis of IL-17(+) cells in facet joints of patients with spondyloarthritis suggests that the innate immune pathway might be of greater relevance than the Th17-mediated adaptive immune response. *Arthritis research & therapy.* 2011;13(3):R95.

96. Noordenbos T, Yeremenko N, Gofita I, van de Sande M, Tak PP, Canete JD, et al. Interleukin-17-positive mast cells contribute to synovial inflammation in spondylarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(1):99-109.
97. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging microbes & infections*. 2013;2(9):e60.
98. Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends in molecular medicine*. 2016.
99. Zhang Q, Wu J, Cao Q, Xiao L, Wang L, He D, et al. A critical role of Cyr61 in interleukin-17-dependent proliferation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(12):3602-12.
100. Saxena A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. Interleukin-17-induced proliferation of fibroblast-like synovial cells is mTOR dependent. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(5):1465-6.
101. Raychaudhuri SK, Saxena A, Raychaudhuri SP. Role of IL-17 in the pathogenesis of psoriatic arthritis and axial spondyloarthritis. *Clinical rheumatology*. 2015;34(6):1019-23.
102. Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Di Padova FE, et al. Blocking of Interleukin-17 during Reactivation of Experimental Arthritis Prevents Joint Inflammation and Bone Erosion by Decreasing RANKL and Interleukin-1. *The American journal of pathology*. 2005;167(1):141-9.
103. Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2001;103(9):1345-52.
104. Fossiez F, Djossou O, Chornarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, et al. T Cell Interleukin-17 Induces Stromal Cells to Produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 1996;183:2593-603.
105. Roşu A, Mărgăritescu C, Stepan A, Muşetescu A, Ene M. IL-17 patterns in synovium, serum and synovial fluid from treatment-naïve, early rheumatoid arthritis patients. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53(1):73–80.
106. Metawi SA, Abbas D, Kamal MM, Ibrahim MK. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. *Clinical rheumatology*. 2011;30(9):1201-7.
107. Zhang L, Li JM, Liu XG, Ma DX, Hu NW, Li YG, et al. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of clinical immunology*. 2011;31(4):606-14.
108. Benham H, Norris P, Goodall J, Wechalekar MD, FitzGerald O, Szentpetery A, et al. Th17 and Th22 cells in psoriatic arthritis and psoriasis. *Arthritis research & therapy*. 2013;15(5):R136.
109. Caetano-Lopes J, Rodrigues A, Lopes A, Vale AC, Pitts-Kiefer MA, Vidal B, et al. Rheumatoid arthritis bone fragility is associated with upregulation of IL17 and DKK1 gene expression. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2014;47(1):38-45.
110. Menon B, Gullick NJ, Walter GJ, Rajasekhar M, Garrood T, Evans HG, et al. Interleukin-17+CD8+ T cells are enriched in the joints of patients with psoriatic arthritis and correlate with disease activity and joint damage progression. *Arthritis & rheumatology*. 2014;66(5):1272-81.
111. Bowness P, Ridley A, Shaw J, Chan AT, Wong-Baeza I, Fleming M, et al. Th17 cells expressing KIR3DL2+ and responsive to HLA-B27 homodimers are increased in ankylosing spondylitis. *Journal of immunology*. 2011;186(4):2672-80.
112. Burton PR, Clayton DG, Cardon LR, Craddock N, Deloukas P, Duncanson A, et al. Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants. *Nature genetics*. 2007;39(11):1329-37.
113. Sherlock JP, Joyce-Shaikh B, Turner SP, Chao CC, Sathe M, Grein J, et al. IL-23 induces spondyloarthropathy by acting on ROR-gamma+ CD3+CD4-CD8- enthesal resident T cells. *Nature medicine*. 2012;18(7):1069-76.
114. Pan HF, Li XP, Zheng SG, Ye DQ. Emerging role of interleukin-22 in autoimmune diseases. *Cytokine & growth factor reviews*. 2013;24(1):51-7.
115. Martin JC, Beriou G, Heslan M, Bossard C, Jarry A, Abidi A, et al. IL-22BP is produced by eosinophils in human gut and blocks IL-22 protective actions during colitis. *Mucosal immunology*. 2015.
116. Martin JC, Beriou G, Heslan M, Chauvin C, Utriainen L, Aumeunier A, et al. Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal immunology*. 2014;7(1):101-13.
117. Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, Schmidt-Weber C. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends in immunology*. 2010;31(9):354-61.
118. Ahlfors H, Morrison PJ, Duarte JH, Li Y, Biro J, Tolaini M, et al. IL-22 fate reporter reveals origin and control of IL-22 production in homeostasis and infection. *Journal of immunology*. 2014;193(9):4602-13.
119. Mitra A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(2):R65.
120. Ren J, Feng Z, Lv Z, Chen X, Li J. Natural killer-22 cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis are an innate source of interleukin 22 and tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of rheumatology*. 2011;38(10):2112-8.

121. Justa S, Zhou X, Sarkar S. Endogenous IL-22 plays a dual role in arthritis: regulation of established arthritis via IFN-gamma responses. *PloS one*. 2014;9(3):e93279.
122. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(4):1037-46.
123. Kim KW, Kim HR, Park JY, Park JS, Oh HJ, Woo YJ, et al. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(4):1015-23.
124. Carrion M, Juarranz Y, Martinez C, Gonzalez-Alvaro I, Pablos JL, Gutierrez-Canas I, et al. IL-22/IL-22R1 axis and S100A8/A9 alarmins in human osteoarthritic and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Rheumatology*. 2013;52(12):2177-86.
125. Marijnissen RJ, Koenders MI, Smeets RL, Stappers MH, Nickerson-Nutter C, Joosten LA, et al. Increased expression of interleukin-22 by synovial Th17 cells during late stages of murine experimental arthritis is controlled by interleukin-1 and enhances bone degradation. *Arthritis and rheumatism*. 2011;63(10):2939-48.
126. Prans E, Kingo K, Traks T, Silm H, Vasar E, Koks S. Copy number variations in IL22 gene are associated with Psoriasis vulgaris. *Human immunology*. 2013;74(6):792-5.
127. Saeki H, Hirota T, Nakagawa H, Tsunemi Y, Kato T, Shibata S, et al. Genetic polymorphisms in the IL22 gene are associated with psoriasis vulgaris in a Japanese population. *Journal of dermatological science*. 2013;71(2):148-50.
128. Lo YH, Torii K, Saito C, Furuhashi T, Maeda A, Morita A. Serum IL-22 correlates with psoriatic severity and serum IL-6 correlates with susceptibility to phototherapy. *Journal of dermatological science*. 2010;58(3):225-7.
129. Lories RJ, McInnes IB. Primed for inflammation: enthesis-resident T cells. *Nature medicine*. 2012;18(7):1018-9.
130. Johnson ML. Wnt Signaling and Bone. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin TJ, editors. *Principles of Bone Biology*. 1. 3rd ed. Burlington, MA: Elsevier Press; 2008. p. 121-37.
131. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*. 2009;433(1-2):1-7.
132. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS biology*. 2006;4(4):e115.
133. Macsai CE, Foster BK, Xian CJ. Roles of Wnt signalling in bone growth, remodelling, skeletal disorders and fracture repair. *Journal of cellular physiology*. 2008;215(3):578-87.
134. Kubota T, Michigami T, Ozono K. Wnt signaling in bone metabolism. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2009;27(3):265-71.
135. Daoussis D, Andonopoulos AP, Liossis SN. Wnt pathway and IL-17: novel regulators of joint remodeling in rheumatic diseases. Looking beyond the RANK-RANKL-OPG axis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2010;39(5):369-83.
136. Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol*. 2001;3(7):683-6.
137. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 13):2627-34.
138. Bodine PV, Komm BS. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2006;7(1-2):33-9.
139. Monroe DG, McGee-Lawrence ME, Oursler MJ, Westendorf JJ. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene*. 2012;492(1):1-18.
140. Boudin E, Fijalkowski I, Piters E, Van Hul W. The role of extracellular modulators of canonical Wnt signaling in bone metabolism and diseases. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2013.
141. Boudin E, Fijalkowski I, Piters E, Van Hul W. The role of extracellular modulators of canonical Wnt signaling in bone metabolism and diseases. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 2013;43(2):220-40.
142. Vincent C, Findlay DM, Welldon KJ, Wijenayaka AR, Zheng TS, Haynes DR, et al. Pro-inflammatory cytokines TNF-related weak inducer of apoptosis (TWEAK) and TNFalpha induce the mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent expression of sclerostin in human osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2009;24(8):1434-49.
143. Appel H, Ruiz-Heiland G, Listing J, Zwerina J, Herrmann M, Mueller R, et al. Altered skeletal expression of sclerostin and its link to radiographic progression in ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism*. 2009;60(11):3257-62.
144. Heiland GR, Zwerina K, Baum W, Kireva T, Distler JH, Grisanti M, et al. Neutralisation of Dkk-1 protects from systemic bone loss during inflammation and reduces sclerostin expression. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(12):2152-9.
145. Genetos DC, Yellowley CE, Loots GG. Prostaglandin E2 signals through PTGER2 to regulate sclerostin expression. *PLoS One*. 2011;6(3):e17772.

146. Hardy R, Juarez M, Naylor A, Tu J, Rabbitt EH, Filer A, et al. Synovial DKK1 expression is regulated by local glucocorticoid metabolism in inflammatory arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(5):R226.
147. Ijiri K, Nagayoshi R, Matsushita N, Tsuruga H, Taniguchi N, Gushi A, et al. Differential expression patterns of secreted frizzled related protein genes in synovial cells from patients with arthritis. *J Rheumatol*. 2002;29(11):2266-70.
148. Uderhardt S, Diarra D, Katzenbeisser J, David JP, Zwerina J, Richards W, et al. Blockade of Dickkopf (DKK)-1 induces fusion of sacroiliac joints. *Annals of the rheumatic diseases*. 2010;69(3):592-7.
149. Kronke G, Uderhardt S, Kim KA, Stock M, Scholtysek C, Zaiss MM, et al. R-spondin 1 protects against inflammatory bone damage during murine arthritis by modulating the Wnt pathway. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(8):2303-12.
150. Haynes KR, Pettit AR, Duan R, Tseng HW, Glant TT, Brown MA, et al. Excessive bone formation in a mouse model of ankylosing spondylitis is associated with decreases in Wnt pathway inhibitors. *Arthritis research & therapy*. 2012;14(6):R253.
151. Daoussis D, Liossis SN, Solomou EE, Tsanakti A, Bounia K, Karampetsou M, et al. Evidence that Dkk-1 is dysfunctional in ankylosing spondylitis. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(1):150-8.
152. Dalbeth N, Pool B, Smith T, Callon KE, Lobo M, Taylor WJ, et al. Circulating mediators of bone remodeling in psoriatic arthritis: implications for disordered osteoclastogenesis and bone erosion. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(4):R164.
153. Saad CG, Ribeiro AC, Moraes JC, Takayama L, Goncalves CR, Rodrigues MB, et al. Low sclerostin levels: a predictive marker of persistent inflammation in ankylosing spondylitis during anti-tumor necrosis factor therapy? *Arthritis research & therapy*. 2012;14(5):R216.
154. Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(6):2791-6.
155. <AmJPathol 2005 Nakamura - perfil de expressão e análise funcional de genes Wnt em artropatias [Wnt7b elevado em AR e OA].pdf>.
156. Imai K, Morikawa M, D'Armiento J, Matsumoto H, Komiya K, Okada Y. Differential expression of WNTs and FRPs in the synovium of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;345(4):1615-20.
157. Yeremenko N, Zwerina K, Rigter G, Pots D, Fonseca JE, Zwerina J, et al. Tumor necrosis factor and interleukin-6 differentially regulate Dkk-1 in the inflamed arthritic joint. *Arthritis & rheumatology*. 2015;67(8):2071-5.
158. Taylor W, Gladman D, Helliwell P, Marchesoni A, Mease P, Mielants H, et al. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis and rheumatism*. 2006;54(8):2665-73.
159. van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis and rheumatism*. 1984;27(4):361-8.
160. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 1988;31(3):315-24.
161. Macedo RBV. Estudo morfofuncional comparativo entre fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatóide e de modelo experimental de artrite. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2013.
162. Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl H, Sack U, et al. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture — primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res* 2001;3(72–76).
163. Neidhart M, Seemayer CA, Hummel KM, Michel BA, Gay RE, Gay S. Functional characterization of adherent synovial fluid cells in rheumatoid arthritis: destructive potential in vitro and in vivo. *Arthritis and rheumatism*. 2003;48(7):1873-80.
164. Ahn JK, Kim H, Lee J, Bae EK, Cha HS, Koh EM. Phenotypic characterization and invasive properties of synovial fluid-derived adherent cells in rheumatoid arthritis. *Inflammation*. 2008;31(6):365-71.
165. Stebulis JA, Rossetti RG, Atez FJ, Zurier RB. Fibroblast-like synovial cells derived from synovial fluid. *The Journal of rheumatology Supplement*. 2005;32:301-6.
166. Scanu A, Oliviero F, Braghetto L, Pozzuoli A, Ramonda R, Punzi L, et al. Synoviocyte cultures from synovial fluid. *Reumatismo*. 2007;59(1):66-70.
167. Neumann E, Riepl B, Knedla A, Lefevre S, Tarnier IH, Grifka J, et al. Cell culture and passaging alters gene expression pattern and proliferation rate in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(3):R83.
168. Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods in molecular medicine*. 2007;135:365-75.

169. Goldminz AM, Suarez-Farinas M, Wang AC, Dumont N, Krueger JG, Gottlieb AB. CCL20 and IL22 Messenger RNA Expression After Adalimumab vs Methotrexate Treatment of Psoriasis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA dermatology*. 2015;151(8):837-46.
170. Caproni M, Antiga E, Melani L, Volpi W, Del Bianco E, Fabbri P. Serum levels of IL-17 and IL-22 are reduced by etanercept, but not by acitretin, in patients with psoriasis: a randomized-controlled trial. *Journal of clinical immunology*. 2009;29(2):210-4.
171. Shimauchi T, Hirakawa S, Suzuki T, Yasuma A, Majima Y, Tatsuno K, et al. Serum interleukin-22 and vascular endothelial growth factor serve as sensitive biomarkers but not as predictors of therapeutic response to biologics in patients with psoriasis. *The Journal of dermatology*. 2013;40(10):805-12.
172. Luan L, Han S, Wang H, Liu X. Down-regulation of the Th1, Th17, and Th22 pathways due to anti-TNF-alpha treatment in psoriasis. *International immunopharmacology*. 2015;29(2):278-84.
173. Heiland GR, Appel H, Poddubnyy D, Zwerina J, Hueber A, Haibel H, et al. High level of functional dickkopf-1 predicts protection from syndesmophyte formation in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2012;71(4):572-4.
174. Wang SY, Liu YY, Ye H, Guo JP, Li R, Liu X, et al. Circulating Dickkopf-1 is correlated with bone erosion and inflammation in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*. 2011;38(5):821-7.
175. Kwon SR, Lim MJ, Suh CH, Park SG, Hong YS, Yoon BY, et al. Dickkopf-1 level is lower in patients with ankylosing spondylitis than in healthy people and is not influenced by anti-tumor necrosis factor therapy. *Rheumatology international*. 2012;32(8):2523-7.
176. Jain M, Attur M, Furer V, Todd J, Ramirez R, Lock M, et al. Increased plasma IL-17F levels in rheumatoid arthritis patients are responsive to methotrexate, anti-TNF, and T cell costimulatory modulation. *Inflammation*. 2015;38(1):180-6.
177. Honsawek S, Tanavalee A, Yuktanandana P, Ngarmukos S, Saetan N, Tantavisut S. Dickkopf-1 (Dkk-1) in plasma and synovial fluid is inversely correlated with radiographic severity of knee osteoarthritis patients. *BMC musculoskeletal disorders*. 2010;11:257.

11 Apêndices

11.1 Termo de consentimento livre e esclarecido

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

Coordenador: Profa. Adriana Maria Kakehasi

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

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

Prezada (o) Sra./Sr.,

Você foi convidada (o) a participar deste estudo porque o seu médico lhe indicou a realização de uma punção articular com ou sem uso de medicação intra-articular. Este procedimento é realizado com a introdução de uma agulha dentro da articulação (junta) que está inflamada, com a finalidade de retirar o líquido sinovial (líquido produzido normalmente pela articulação, mas que em determinados reumatismos pode estar aumentado, causando dor e dificuldade de movimentação) e para administração de medicamento (CORTICOIDE), quando isso estiver indicado. Nosso estudo tem por objetivo estudar as características da Artrite Psoriásica em um grupo de pacientes tratados no ambulatório de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFMG, incluindo as características do líquido sinovial.

Mesmo que o (a) senhor (a) não tenha Artrite Psoriásica, poderá também participar como controle. O controle é a pessoa que não tem a doença que está sendo estudada, e as informações obtidas com a análise do seu líquido sinovial serão comparadas com aquelas das pessoas com Artrite Psoriásica. Neste estudo pessoas com Artrite Reumatoide e com Espondilite Anquilosante poderão participar como grupo controle, quando elas tiverem indicação de punção articular. Caso aceite participar desse estudo será pedido apenas que o (a) senhor (a) doe uma amostra do líquido obtido durante a punção articular. Serão realizadas dosagens de substâncias no líquido sinovial e as células deste líquido serão cultivadas para estudo.

Não se espera que você tenha nenhum risco adicional por participar deste estudo, a não ser o relacionado ao (s) procedimento (s) aos quais o (a) senhor (a) tenha indicação de se submeter, de maneira idêntica ao procedimento habitual. Poderá haver leve sensação de dor no momento da introdução da agulha na articulação e será solicitado que o (a) senhor (a) não faça atividade física nos dois dias seguintes. Não será cobrado nem oferecido nenhum valor em troca de sua participação. As informações obtidas podem não ter relação direta com você, mas poderão servir para compreender melhor como a Artrite Psoriásica afeta nossa população. Seus dados não serão divulgados para outros fins e são confidenciais. A sua participação neste estudo é voluntária e você pode retirar seu consentimento a qualquer momento.

Em caso de dúvidas entrar em contato com Dr. Gustavo ou Profa. Adriana: Ambulatório Bias Fortes no endereço: Al. Álvaro Celso, 175 / 2º andar, Santa Efigênia, BH, MG; fones: (31) 3409-9532 ou celular: (31) 8673-0331 ou e-mail: gustavogomesresende@yahoo.com.br.

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento para ler antes de assiná-lo, que os detalhes do projeto me foram explicados e que mantereí uma cópia deste consentimento comigo.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____ Data: _____

Nome da testemunha: _____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura do pesquisador: _____ Data: _____

11.2 Quadro com informações de coleta dos 25 pacientes analisados

Nº	DIAGNÓSTICO	SEXO	IDADE (ANOS)	DURAÇÃO DOS SINTOMAS (ANOS)	FR	VHS (mm/h)	PCR (mg/dl)	DMARD EM USO	BIOLÓGICO EM USO	DOSE DE PDN EM USO (mg/dia)	DOSE DE AINH EM USO (Score ASAS)	QUANTIDADE DE LÍQUIDO COLETADO	TIPO DE AMOSTRA (Liq e/ou FLS)	DATA
02	AP	F	56	7	NEG	12	0,8	MTX+LFL	-	0,0	1,0	2 ml	FLS	16/12/13
03	EA	F	54	35	NEG	98	47,0	MTX	-	2,5	1,0	3 ml	FLS	17/12/13
04	EA	M	33	12	-	100	116,0	-	-	0,0	1,0	15 ml	FLS	09/01/14
05	EA	M	55	3	-	15	10,1	-	-	0,0	1,0	3 ml	FLS	24/01/14
08	AR	M	49	7	POS	23	48,0	MTX	-	10,0	0,66	80 ml	Liq	24/01/14
09	AP	M	36	0,3	NEG	3	1,5	-	-	0,0	0,5	15 ml	Liq / FLS	24/01/14
10	AR	F	56	2	POS	2	0,7	MTX+HCQ	-	0,0	0,32	1 ml	FLS	25/02/14
12	AR	F	47	7	POS	9	3,2	MTX+LFL	-	5,0	0,0	15 ml	Liq	27/02/14
13	EA	M	28	6	NEG	72	64,2	SSZ	-	5,0	0,0	10 ml	Liq / FLS	27/02/14
14	AR	M	71	58	POS	24	22,7	MTX	-	0	0,0	20ml	Liq / FLS	07/03/14
15	AR	F	36	16	POS	54	38,0	MTX	Etanercepte	0,0	0,29	5ml	Liq / FLS	11/04/14
16	AR	F	48	0,5	POS	73	-	-	-	0,0	0,0	7 ml	Liq	11/04/14
18	AR	F	50	20	POS	21	12,0	LFL	Adalimumabe	0,0	0,0	25 ml	Liq	11/04/14
19	AR	M	63	20	POS	80	130,0	MTX+HCQ	-	5,0	0,0	20 ml	Liq	05/05/14
21	AR	F	70	10	POS	18	6,3	MTX+LFL	-	5,0	0,0	10 ml	Liq	26/05/14
22	AR	F	51	15	POS	20	24,5	MTX	Adalimumabe	15,0	0,0	25 ml	Liq	26/05/14
23	AP	F	55	5	NEG	8	9,1	MTX	-	10,0	1,0	10 ml	Liq	30/06/14
25	AR	F	38	6	POS	10	2,7	-	-	10,0	1,0	8 ml	Liq / FLS	10/07/14
27	AR	M	72	4	POS	-	-	MTX+LFL	-	5,0	0,0	8 ml	Liq / FLS	24/07/14
28	AR	F	49	26	NEG	74	21,5	LFL	-	7,5	0,33	12 ml	Liq	07/08/14
33	AR	F	53	10	POS	23	36,0	-	-	10,0	0,0	7 ml	Liq / FLS	14/04/15
34	AR	F	33	12	NEG	12	25,6	MTX	-	2,5	0,0	10 ml	Liq / FLS	28/05/15
36	AP	F	67	1	NEG	89	79,0	-	-	0,0	0,25	1 ml	FLS	02/06/15
37	AR	F	65	6	POS	8	6,0	LFL	-	0,0	0,0	20 ml	Liq	02/06/15
38	EA	M	42	23	NEG	36	8,8	-	-	0,0	1,0	20 ml	Liq	02/06/15

12 Anexos

12.1 Aprovação pelo COEP



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

Projeto: CAAE – 16196813.3.0000.5149

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 02 de outubro de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "**Expressão *in vitro* em sinoviócitos fibroblasto-símile de indivíduos com artrite psoriásica de moduladores extracelulares da via de sinalização Wnt**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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


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

12.2 Folha de aprovação

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

EXPRESSÃO DE MODULADORES DA VIA WNT POR SINOVIÓCITOS FIBROBLASTO SÍMILE DE PESSOAS COM DOENÇAS ARTICULARES INFLAMATÓRIAS

GUSTAVO GOMES RESENDE

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 27 de abril de 2016, pela banca constituída pelos membros:


 Prof. Marcus Vinicius Melo de Andrade - Orientador
 UFMG


 Prof. Adriana Maria Kakehisi - Coorientadora
 UFMG


 Prof. Cristine Costa Duarte Lanna
 UFMG


 Prof. Marcelo de Medeiros Pinheiro
 UNIFESP

Belo Horizonte, 27 de abril de 2016.