

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FARMACOLOGIA
E TERAPÊUTICA

Dissertação de Mestrado

Natália Garcia dos Santos

NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO ANIMAL DE ARTRITE INDUZIDA POR
COLÁGENO (CIA)

PORTO ALEGRE

2023

Natália Garcia dos Santos

**NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO ANIMAL DE ARTRITE INDUZIDA POR
COLÁGENO (CIA)**

Orientador: Professor Dr. Ricardo Machado Xavier

Co-orientador (a): Professora Dr^a. Iraci L.S. Torres

Dissertação de mestrado apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica.

PORTO ALEGRE

2023

CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Natalia Garcia
NEUROINFLAMAÇÃO EM MODELO ANIMAL DE ARTRITE
INDUZIDA POR COLÁGENO (CIA) / Natalia Garcia dos
Santos. -- 2023.
62 f.
Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Coorientador: Iraci Lucena da Silva Torres.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre,
BR-RS, 2023.

1. Neuroinflamação. 2. Dor. 3. Artrite induzida por
colágeno. 4. Modelo animal. 5. Artrite reumatoide. I.
Xavier, Ricardo Machado, orient. II. Torres, Iraci
Lucena da Silva, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Luciani, sinônimo de força e resiliência, a quem eu serei eternamente grata. Aos meus avós, Waldemar e Rosilda, que com muito amor são o alicerce desta família. Ao Lúcio, meu padrasto, por ser apoio a minha mãe durante o tempo em que estamos distantes. Agradeço principalmente por aguentarem a minha ausência e falta de paciência. Foram as oportunidades oferecidas por vocês que me possibilitaram ir muito além do que eu imaginava. Obrigada por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos, por serem colo e lar. Eu amo muito vocês.

À minha madrinha e primeira professora, Liandra, exemplo de dedicação e amor à profissão. Ao Renato, por ter me acolhido com muito carinho e desempenhado um lindo papel de pai. Ao Jorge, a quem espero poder dividir um pouco de tudo que aprendi com vocês, sobre amor e respeito. Agradeço aos ensinamentos e pelos momentos compartilhados.

À minha irmã de vida, Laura Oliari, que está comigo desde a adolescência, e que mesmo a muitos quilômetros de distância, sempre me ouviu e aconselhou. Obrigada por todas as risadas e longas conversas. Obrigada por ser a melhor amiga do mundo.

Ao Kenzo, pela paciência e amor, mas principalmente pelo apoio. Agradeço por ouvir todas as explicações sobre meus experimentos e tentar compreender um pouco do mundo da pesquisa. Pelos lanches de madrugada e finais de semana de trabalho. Obrigada pela cumplicidade. Agradeço também a família Takeda, por todo carinho de sempre. Obrigada por todos os momentos compartilhados.

À equipe de pesquisadores do Laboratório de Doenças Autoimunes (LabDAI), com quem compartilhei diariamente histórias, risadas e diversas xícaras de café, foram essenciais para a execução deste trabalho. Em especial à mestrandia Maria Luisa, que desde o meu primeiro contato esteve sempre disposta a auxiliar e me confortar com sua calma e paciência. À doutoranda Thaís que foi meu braço direito em todos os experimentos, compartilhando conhecimento e também ótimas receitas. Aos queridos e solícitos Gustavo, Stephanie, Marina e Daniel, que além de companheiros de trabalho, estavam sempre disponíveis para um café ou um suco na redenção durante os intervalos de experimentos. E aos alunos de Iniciação Científica Vinicius e Andressa, que não pouparam esforços nas análises realizadas, saibam que serão grandes profissionais. Grandes amigos, de personalidades inigualáveis, que levarei para a vida.

Ao professor Ricardo Xavier pela orientação durante estes dois anos de trabalho. Grata pela confiança depositada no meu trabalho, pelas ideias, paciência, e reuniões que foram fundamentais para o melhor desempenho do projeto, bem como para o meu desenvolvimento profissional. És referência como profissional e ser humano.

Agradeço imensamente à minha coorientadora professora Iraci Torres por acreditar em mim desde o início. Sempre com pensamento positivo e ótimas ideias, tu foste essencial para o desenvolvimento deste projeto. Obrigada pela parceria e apoio frente os desafios que nos foram apresentados. Agradeço também aos colegas do Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

À toda equipe do Centro de Pesquisa Experimental (CPE), Serviço de Patologia Experimental e Unidade de Experimentação Animal (UEA) do HCPA e aos colegas do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que participaram no desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA) e ao Fundo de Apoio a Pesquisa da Sociedade de Reumatologia do Rio Grande do Sul (SRRS) pelos incentivos financeiros dados a este projeto.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica pela oportunidade, em especial a coordenadora Adriane Rosa, excelente profissional.

“In a dark place we find ourselves, and a little more knowledge lights our way.”

– Master Yoda

RESUMO

Introdução: Artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória, crônica e erosiva. A AR é caracterizada por inflamação da membrana sinovial, que resulta em graves danos à cartilagem e ao osso articulares, bem como, na dor, deformidades e incapacidade física do paciente. Embora o principal acometimento seja articular, a AR também apresenta manifestações extra-articulares como nódulos reumatoides, osteoporose, sarcopenia, lesões cutâneas, manifestações oculares e vasculite, com possibilidade de acometer rins, coração e sistema nervoso central e periférico. Alterações neurológicas centrais e periféricas podem ser consequência de diferentes fatores, como por exemplo, o processo inflamatório sistêmico da própria doença ou influenciado pela dor e processo de sensibilização central. No entanto, não está claro na literatura como as alterações imunoinflamatórias induzidas pela AR influenciam na função microvascular cerebral, especialmente na função da barreira hematoencefálica.

Objetivo: Avaliar resposta nociceptiva e parâmetros neuroinflamatórios de camundongos durante o desenvolvimento da artrite induzida por colágeno.

Métodos: Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal do HCPA (número GPPG/HCPA-22-0453). Camundongos machos DBA1/J (36 animais), com idade entre 8 e 12 semanas, foram randomizados em 4 grupos: grupo controle e CIA 25 dias (CO25 e CIA25) e grupo controle e CIA 50 dias (CO50 e CIA50). O modelo experimental foi induzido por injeção intradérmica de emulsão contendo adjuvante de Freund e colágeno bovino tipo II no dia 0 e reforço no dia 18. Durante todo o período experimental foram avaliados o escore clínico, edema de pata e peso corporal. Após a eutanásia, a articulação tibio-tarsal foi utilizada para confirmação da artrite por análise histopatológica; o encéfalo foi submetido à técnica de imunofluorescência com anticorpos Anti-IgM e Anti-IgG; a expressão de IL-6 por imunohistoquímica; e a existência de neurodegeneração foi analisada (Fluoro Jade C). Os dados foram analisados por Two-way ANOVA, Kruskal-Wallis e correlação de Pearson; $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados: O desenvolvimento de poliartrite nos grupos CIA 25 inicial e CIA 50 estabelecido foi confirmado por altos valores de escore clínico, nocicepção, edema de pata e escore histológico quando comparados aos respectivos controles ($p < 0,0001$; $p = 0,001$; $p = 0,001$, respectivamente). O grupo CIA25 apresentou maiores valores de IgM no encéfalo quando comparado com o grupo CO25 ($p = 0,01$). O grupo CIA50 e CO 50 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. As análises de IgG não apresentaram as diferenças estatisticamente significativas, quando comparados com os controles ($p > 0,05$). A expressão de

IL6 mostrou-se aumentada no grupo CIA50 quando comparado ao controle ($p=0,008$). Foi identificada uma correlação negativa entre a expressão de IL-6 e o limiar de dor no tempo de doença 25 ($r=-0.732$, $p=0.002$) e 50 ($r=-0.604$, $p=0.022$). A quantificação de neurônios degenerados não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), mas há uma tendência de aumento do número de neurônios degenerados em camundongos do grupo CIA50 quando comparados ao CO50 ($p=0,2442$).

Conclusão: Os dados obtidos nesta dissertação demonstram que os escores clínicos, nociceptivos, de edema da pata e histológicos caracterizaram a presença de artrite significativa em 25 e 50 dias. Na fase aguda da doença identificou-se depósitos elevados de IgM encefálico; no entanto, na fase de artrite estabelecida, apenas a expressão de IL-6 mostrou-se aumentada. Uma correlação negativa entre a expressão de IL 6 e o limiar de dor foi vista em ambos os tempos de doença (25 e 50 dias). Esses achados podem ser indicativos da presença de neuroinflamação no modelo de CIA.

Palavras-chave: Artrite reumatoide; Neuroinflamação; CIA;

ABSTRACT

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune, inflammatory, chronic and erosive disease. RA is characterized by inflammation of the synovial membrane, which results in severe damage to joint cartilage and bone, as well as pain, deformities and physical disability of the patient. Although the main involvement is articular, RA also presents extra-articular manifestations such as rheumatoid nodules, osteoporosis, sarcopenia, skin lesions, ocular manifestations and vasculitis, with the possibility of affecting kidneys, heart and central and peripheral nervous system. Central and peripheral neurological alterations may be a consequence of different factors, such as the systemic inflammatory process of the disease itself or influenced by pain and central sensitization process. However, it is not clear in the literature how RA-induced immunoinflammatory changes influence cerebral microvascular function, especially the function of the blood-brain barrier.

Objective: To evaluate the nociceptive response and neuroinflammatory parameters of mice during the development of collagen-induced arthritis model.

Methods: This study was approved by the HCPA Animal Ethics Committee (number GPPG/HCPA-22-0453). Male DBA1/J mice (36 animals), aged between 8 and 12 weeks, were randomized into 4 groups: control group and CIA 25 days (CO25 and CIA25) and control group and CIA 50 days (CO50 and CIA50). The experimental model was induced by intradermal injection of an emulsion containing Freund's adjuvant and type II bovine collagen on day 0 and reinforcement on day 18. During the entire experimental period, clinical score, paw edema and body weight were evaluated. After euthanasia, the tarsal joint was used for confirmation of arthritis by histopathological analysis, the brain was collected and divided by coronal section, later embedded in paraffin for histochemical analysis. To evaluate inflammatory markers, the sections were subjected to the immunofluorescence technique with Anti-IgM and Anti-IgG antibodies, and expression of IL-6 by immunohistochemistry. In addition, it was analyzed the existence of neuron (Anti-NeuN) and neurodegeneration (Fluoro Jade C). Data were analyzed by Two-way ANOVA, Kruskal-Wallis and Pearson correlation; $p < 0.05$ was considered significant.

Results: The development of polyarthritis in the initial CIA 25 and established CIA 50 groups was confirmed by high values of clinical score, nociception, paw edema and histological score when compared to the respective controls ($p < 0.0001$; $p = 0.001$; $p = 0.001$, respectively). The CIA25 group had higher IgM values in the brain when compared to the CO25 group ($p = 0.01$). The CIA50 and CO 50 groups did not show statistically significant differences. IgG

analyses did not show statistically significant differences when compared with controls ($p>0.05$). IL6 expression was increased in the CIA50 group when compared to the control ($p=0.008$). An association was identified between IL 6 expression and pain threshold at disease time 25 ($r=-0.732$, $p=0.002$) and 50 ($r=-0.604$, $p=0.022$). The quantification of degenerated neurons showed no statistically significant difference ($p>0.05$), but there is a tendency towards an increase in the number of degenerated neurons in mice from the CIA50 group when compared to the CO50 group ($p=0.2442$).

Conclusion: Clinical, nociceptive, paw edema and histological scores characterized the presence of significant arthritis at 25 and 50 days, in the acute phase of the disease high IgM deposits were identified in the brain, whereas in the established phase ~~established period~~ only IL-6 expression was increased. A negative correlation between IL 6 expression and pain threshold was seen at both disease times (25 and 50 days). These findings may be indicative of neuroinflammation presence in the CIA model.

Keywords: Rheumatoid arthritis; CIA model; Neuroinflammation; BBB.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DA LITERATURA

- FIGURA 1.** Modelo esquemático da estratégia de busca de informações. *critérios de exclusão dos artigos: tema não relacionado aos objetivos da pesquisa; artigos não disponíveis na íntegra; artigos não disponíveis em inglês e/ou português. 19
- FIGURA 2.** Alterações articulares na ar. (a) articulação saudável; (b) articulação doente. Adaptado de S molen et al (5). 21
- FIGURA 3.** Esquema do protocolo experimental de CIA. CII: colágeno bovino tipo ii; CFA adjuvante completo de freund; IFA: adjuvante incompleto de freund. Fonte: elaborada pela autora. 26

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

FIGURE 1. Mice developed experimental arthritis and high disease severity.....	39
FIGURE 2. CIA group (n=8) showed higher nociception mechanical threshold at 50 days compared to co group (n=8)	39
FIGURE 3. IgM and IgG deposits in the brain of mice with collagen-induced arthritis	40
FIGURE 4. Interleukin-6 expression in the brain of mice with collagen-induced arthritis. ...	41
FIGURE 5. Inflammatory markers correlation with mechanical pain threshold.	42
FIGURE 6. Quantification of degenerated neurons from mice with collagen-induced arthritis.	43

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

TABLE 1. IgM and IgG deposit in the brain.....	40
TABLE 2. Interleukin-6 expression in brain.....	41
TABLE 3. Correlation analysis between inflammatory markers and nociceptive parameters.	41
TABLE 4. Quantification of degenerated neurons.....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

AIA - Artrite induzida por antígeno

AR - Artrite reumatoide

AVC - Acidente vascular cerebral

BHE - barreira hematoencefálica

CIA - Artrite induzida por colágeno (*collagen-induced model*)

CII - Colágeno do tipo II

CFA - Adjuvante completo de Freund (*complete freund's adjuvant*)

HLA - Antígeno leucocitário humano

IFA - Adjuvante incompleto de Freund (*incomplete freund's adjuvant*)

IL-1 - Interleucina 1

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-6 - Interleucina 6

IL-17 - Interleucina 17

mBSA - Albumina bovina sérica metilada (*methylated bovine serum albumin*)

MMPs - Metaloproteinases

PIA - Artrite induzida por pristane (*pristane-induced arthritis*)

RF - Fator-reumatoide

SE - Epíteto compartilhado (*shared epitope*) SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico Th1 - Linfócitos T auxiliares tipo 1

TNF- Fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor - alpha*) Treg - Células T reguladora

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES	19
2.2. ARTRITE REUMATOIDE	20
2.1.1 ETIOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE.....	20
2.1.2 FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE.....	21
2.1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ARTRITE REUMATOIDE.....	22
2.2 ALTERAÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	23
2.3 MODELOS DE ANIMAIS DE ARTRITE.....	25
2.3.1 ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO (CIA).....	25
3. MARCO TEÓRICO.....	28
4. JUSTIFICATIVA	28
5. OBJETIVOS	31
5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO	31
5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	31
REFERÊNCIAS	52
6. ARTIGO CIENTÍFICO.....	32
NEUROINFLAMMATION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ARTHRITIS: A PILOT STUDY 32	
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	51
9. ANEXOS	57
ANEXO 1 - METODOLOGIA EXPANDIDA.....	57
9.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	57
9.2 ANIMAIS	57
9.3 MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO (CIA)	57
9.4 ESCORE CLÍNICO	58
9.5 EDEMA	59
9.6 NOCICEPÇÃO.....	59
9.7 EUTANÁSIA.....	60
9.8 HISTOPATOLOGIA DA ARTICULAÇÃO	60

9.9 ANÁLISE DE IGM E IGG POR TECNICA DE DUPLA COLORAÇÃO	61
9.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE IL-6	61
9.11 ANÁLISE DE NEURONIOS DEGENERADOS.....	62
9.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica, sistêmica e erosiva (1). Acomete principalmente as articulações das mãos e pés, causando severos danos à cartilagem e osso, o que acarreta à incapacidade física dos pacientes (1). A prevalência de AR varia de acordo com as características étnicas da população, no entanto, estima-se que a doença afete cerca de 1% da população mundial adulta (2,3) Considerada como uma doença multifatorial, fatores ambientais, agentes infecciosos e fatores genéticos estão envolvidos com a susceptibilidade e gravidade da AR (1,4). A fisiopatologia da AR é heterogênea, envolve alteração de sistemas celulares, moleculares e epigenéticos, como consequência ocorre a quebra da autotolerância e o estabelecimento da autoimunidade (5). Alterações em componentes do sistema imunológico levam ao desenvolvimento anormal de anticorpos que podem desencadear e mediar processo inflamatório crônico, principalmente nas articulações (1). A AR é marcada, sobretudo pela inflamação da sinóvia, revestimento articular, onde na fase mais agressiva ocorre a expansão do tecido proliferativo, formando assim o *pannus*, tecido que invade e danifica a cartilagem e o tecido ósseo(6).

Ainda que afete primordialmente as articulações há também manifestações extra-articulares, como os nódulos reumatoides, a sarcopenia, lesões cutâneas, manifestações oculares e vasculite, e também a possibilidade de acometimento de rins, coração e sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP) (7–10) Alterações neurológicas centrais e periféricas podem surgir em consequência de diferentes fatores, como por exemplo, pelo processo inflamatório sistêmico da própria doença ou influenciado pelas fármacos utilizados no tratamento (11). Dentre os casos já relatados e associados à AR, encontramos meningite, encefalite, infartos cerebrais múltiplos e alterações na substância branca (12,13)

Os danos cerebrais descritos podem ocorrer em consequência da ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) associada à inflamação crônica causada pela AR (14,15). A BHE atua como uma barreira seletiva para a difusão de citocinas, que são produzidas bilateralmente na barreira (SNC ou órgãos periféricos). Os sistemas de transporte específicos da BHE facilitam a entrada de certas citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF) (16) e quadros inflamatórios aumentam a sua permeabilidade (14,15,17–19). Estudos recentes demonstraram que em algumas doenças que cursam com aumento sistemático dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-1 beta e IL-17 também são relacionadas a aumento central dos níveis destas citocinas (11,20). No entanto, não há estudos que esclareçam a relação entre

as alterações da BHE e a dor inflamatória presente na AR.

Neste contexto, constata-se a necessidade de uma melhor compreensão da relação entre o sistema neuroimune e as doenças autoimunes, como a AR. Os modelos animais, mimetizam a doença humana e apresentam baixo custo, possibilitam realizar estudos pré-clínicos da fisiopatologia, busca de biomarcadores periféricos e centrais e de novos tratamentos de diferentes doenças. Considerando a relevância do tema, este estudo teve como objetivo: (I) avaliar parâmetros neuroinflamatórios no encéfalo de camundongos submetidos ao modelo de artrite induzida por colágeno (CIA), um dos principais modelos experimentais de AR; e (II) se a presença dos marcadores inflamatórios no SNC influencia na nocicepção dos animais já em momento inicial da doença. Portanto, a presente dissertação segue a disposição de: uma revisão da literatura (para apresentação do referencial teórico que suporte a relevância deste estudo) e um artigo original no qual são respondidas as perguntas de pesquisa.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

Esta revisão da literatura é focada em compilar informações sobre achados de neuroinflamação na artrite, especialmente no modelo animal de artrite induzida por colágeno. A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed e Embase. As buscas foram realizadas utilizando descritores em língua inglesa, através dos termos “rheumatoid arthritis”, “blood-brain barrier”, “neuroinflammation”, “animal model”, “collagen-induced arthritis” e suas combinações.

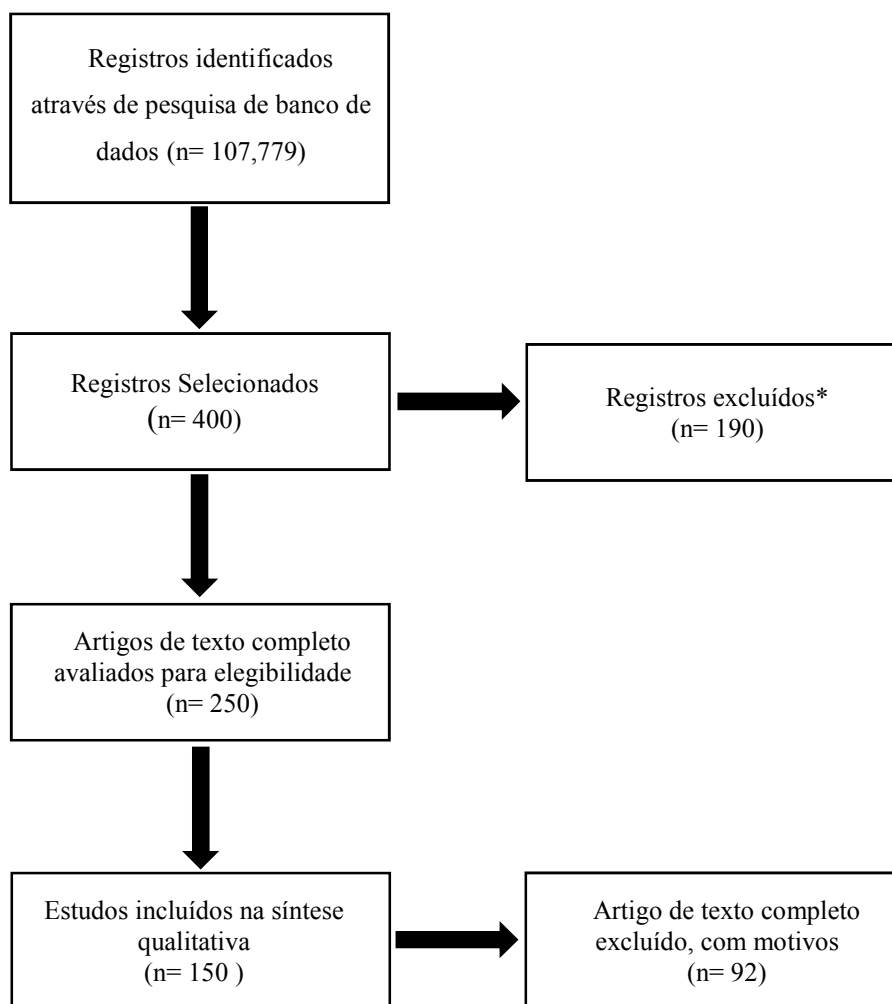


Figura 1. Modelo esquemático da estratégia de busca de informações. *Critérios de exclusão dos artigos: tema não relacionado aos objetivos da pesquisa; artigos não disponíveis na íntegra; artigos não disponíveis em inglês e/ou português.

2.2. ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, crônica, progressiva e erosiva (1). A AR afeta, sobretudo, as articulações diartrodiais das mãos e pés, causando severos danos à cartilagem e osso, acarretando à incapacidade física dos pacientes (1,3,21–23). Esta patologia é caracterizada pela inflamação da sinóvia, revestimento articular onde, na fase mais agressiva, ocorre a expansão do tecido proliferativo, formando assim o “pannus”, tecido que invade e danifica a cartilagem e o tecido ósseo.

Estando entre as doenças autoimunes e inflamatórias crônicas mais predominantes no mundo, a prevalência de AR varia de acordo com as características étnicas da população. Estima-se que a AR atinja cerca de 1% da população mundial adulta (3,24,25) Dados atuais demonstram que, no Brasil, essa prevalência seja de cerca de 0,22% da população (26). Trata-se de uma doença musculoesquelética associada à idade, afetando principalmente indivíduos entre a terceira e quinta década de vida (3). Ainda, a doença atinge três vezes mais a população feminina, sugerindo que fatores hormonais podem ter um papel patogênico (27).

2.1.1 ETIOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE

A AR é considerada uma doença multifatorial. Assim, fatores ambientais, agentes infecciosos e fatores genéticos estão envolvidos com a susceptibilidade, bem como a gravidade da doença (1,4). O tabagismo destaca-se como o principal fator de risco ambiental, aumentando gradativamente o desenvolvimento de AR e reduzindo as taxas de remissão da doença (1,28–30). Estudos realizados nas últimas décadas sugerem uma associação entre agentes infecciosos como parvovírus, vírus da rubéola, vírus Epstein-Barr e a bactéria *Borrelia burgdorferi* com a progressão da AR em um hospedeiro geneticamente suscetível (24,31). Dentre outros fatores relacionados ao desenvolvimento da AR, estão a poluição atmosférica, exposição à sílica, deficiência de vitamina D, obesidade, alterações na microbiota intestinal, doença periodontal e influência hormonal (estrogênio) (1,24,31).

Sabe-se que há uma relação de cerca de 65% entre a herança genética e a AR soropositiva (quando há presença de anticorpos contra auto antígenos selecionados) e em aproximadamente 20% na doença soronegativa (32). A predisposição genética desempenha um papel importante na patogênese da AR (1,33,34). A associação de predisposição mais bem estabelecida é com os alelos do antígeno leucocitário humano de classe II (HLA), com destaque para os alelos HLA-DRB1 que codificam para o epíteto compartilhado (SE, do inglês *shared epitope*) conferindo, assim maior risco para o progresso e gravidade da doença (32,35–37). Estudos sobre a

associação do HLA com a AR, realizados com gêmeos homozigotos, sugerem que cerca de 50% da contribuição genética para a AR esteja ligada a estes alelos (35,38). Indivíduos com artrite apresentam maior morbidade e mortalidade quando comparados com a população saudável, estimando-se uma redução de dez anos na expectativa de vida (7,20). Dentre as principais causas dos óbitos descritos para os pacientes artríticos estão infecções, doença cardiovascular e cerebrovascular, doenças linfoproliferativas e complicações gastrointestinais. Dentre os fatores preditivos de mortalidade, estão incluídos idade avançada, fator reumatoide (FR) positivo, incapacidade funcional, número de articulações acometidas, nódulos reumatoides e velocidade de sedimentação globular elevada (20,39–42)

2.1.2 FISIOPATOLOGIA DA ARTRITE REUMATOIDE

A AR é resultante de um conjunto de processos imunológicos que, por sua vez, implicam na proliferação de células sinoviais e fibrose, formação de membrana vascular, cartilagem e erosão óssea (5). Sabe-se que linfócitos T, linfócitos B, macrófagos, neutrófilos e fibroblastos sinoviais colaboram para o desenvolvimento de uma resposta autoimune robusta contra os componentes articulares (1,5)(Figura 1).

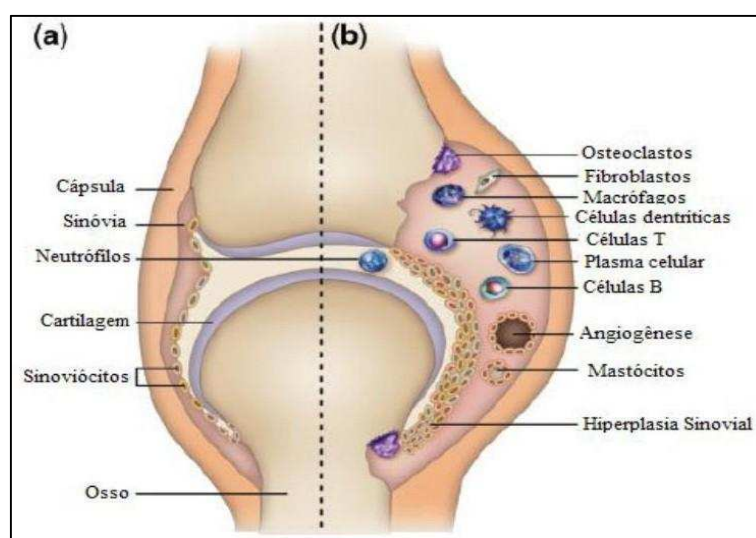


Figura 2. Alterações articulares na AR. (a) Articulação saudável; (b) Articulação doente. Adaptado de Smolen et al (5).

A ação conjunta dos linfócitos T e B autorreativos levam à sinovite, infiltração celular e a um processo desorganizado de destruição e remodelação óssea (3,43). Os linfócitos T reguladores (Treg), também conhecido como células T reguladoras, são fundamentais na manutenção da tolerância imunológica e na prevenção da autoimunidade (44). A perda ou deficiência funcional destas células, acarreta na autoimunidade e dano aos órgãos, observados

em doenças como a AR (45,46). Já os linfócitos B, são precursores dos plasmócitos que secretam anticorpos e processam antígenos que promovem a ativação das células T e, assim, secretam citocinas pró-inflamatórias, como, por exemplo, interleucinas 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (47).

Os macrófagos, importantes células do sistema imunológico, envolvidas na imunidade inata, possuem capacidades pró-inflamatórias, destrutivas e de remodelação, além de influenciarem a inflamação e destruição articular, tanto nas fases aguda quanto crônica da AR (50). Essas células liberam citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, TNF- α , IL-1 β , IL-6, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio e metaloproteinasas (MMPs), além de realizarem fagocitose e apresentação de antígenos (48,49). Os neutrófilos fazem parte da imunidade inata, participam da inflamação da membrana sinovial por meio da síntese de prostaglandinas, proteases e EROs, e também estão envolvidas na secreção do TNF- α (50).

A membrana sinovial, por sua vez, é a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias e proteases (1). A membrana em conjunto com osteoclastos e condrócitos, fomenta a destruição articular (1). Em indivíduos saudáveis, as articulações são revestidas por uma fina membrana sinovial, que produz o líquido sinovial proporcionando manutenção da nutrição e da lubrificação da cartilagem e dos ossos (3,5). Na AR, a presença de inflamação crônica induz à formação de um tecido proliferativo na membrana, com infiltração de diferentes células inflamatórias que, por sua vez, levam ao dano articular (5). Essas projeções de tecido proliferativo penetram na cavidade articular e formam o *pannus*, tecido característico da artrite que invade a cartilagem e o tecido ósseo (1,7).

2.1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ARTRITE REUMATOIDE

A AR é referida como uma patologia inflamatória, crônica, progressiva e marcada pela presença de sinovite nas articulações (1). Comumente, a AR afeta as articulações sinoviais periféricas, como metacarpo e metatarso, tornozelos e punhos, contudo, pode haver também o comprometimento de joelhos, ombros, cotovelos e quadris (39,51). Os pacientes com AR podem apresentar dor e edema nas articulações como os principais sintomas, bem como, rigidez matinal e disfunção muscular (1). Esta patologia pode resultar danos progressivos e irreversíveis às articulações quando há inflamação persistente, ocasionando a perda de espaço articular, ósseo e de função, como também, deformidade articular como em casos de *boutonnière* ou em "pescoço de cisne" (7,52). Embora afete principalmente as articulações há também manifestações extra-articulares (EAMs) como os nódulos reumatoides, a sarcopenia,

lesões cutâneas, manifestações oculares e vasculite, e também a possibilidade de acometimento de rins, coração e sistema nervoso central e periférico (7–10).

Complicações no sistema nervoso periférico são amplamente observadas na AR, entretanto, ainda há poucos relatos de casos de alterações no sistema nervoso central (SNC) associados à doença descritos na literatura (11,53,54). Alterações neurológicas centrais e periféricas podem surgir em consequência a diferentes fatores, como por exemplo, os danos estruturais causados pela AR nas articulações diartrodiais. Estes danos estruturais podem ocorrer pelo processo inflamatório sistêmico da própria doença ou influenciado pelas drogas utilizadas no tratamento (11). Relatos de danos no SNC em pacientes com AR são escassos. Entre os casos já descritos e associados à AR, encontramos meningite, encefalite, sintomas neurológicos focais, múltiplos infartos cerebrais, anomalias da substância branca, acidente vascular cerebral (AVC) e síndromes neurodegenerativas e desmielinizantes (12,13,55,56). Além disso, manifestações neuropsiquiátricas estão presentes na AR, incluindo depressão, disfunção cognitiva, alterações de comportamento, compressão da medula espinhal e envolvimento de nervos periféricos (57). A inflamação sistêmica presente na AR também pode influenciar na patogênese de doenças neurodegenerativas (58), bem como no comprometimento cognitivo (59).

2.2 ALTERAÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Relatos de alterações no SNC associados à AR são limitados, entretanto, danos cerebrais descritos como meningite, encefalite, sintomas neurológicos focais, múltiplos infartos cerebrais e alterações na substância branca, podem estar relacionado a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) associada à inflamação crônica causada pela AR (3,60). A BHE é encontrada no cérebro e na medula espinhal, composta de células endoteliais capilares com poucas vesículas e revestidas por uma membrana basal contínua unida por junções apertadas (60). Essas características estruturais permitem que a BHE se comporte como uma barreira seletiva para a difusão de citocinas (polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares) que podem ser produzidas em ambos os lados da barreira (SNC ou órgãos periféricos)(60).

A BHE pode comportar-se de diferentes maneiras perante a inflamação sistêmica (61). Alterações na constituição celular da barreira ou uma ruptura em suas junções podem causar um aumento de permeabilidade, o que por sua vez, resulta na ação de moléculas pró-inflamatórias, células e autoanticorpos que afetam a função do SNC e levam a um dano neuronal (61,62). Em condições de doença, a BHE pode não ter a mesma resposta à inflamação em

relação a um SNC saudável (62). Não está claro como o processo inflamatório sistêmico e crônico da AR afeta a BHE, contudo, a permeabilidade desta, mostrou-se aumentada em pacientes artríticos (17–19,63–65) e em ratos submetidos ao modelo de CIA (66).

Estudos sugerem que na presença de dano cerebral e doenças neurodegenerativas crônicas, a ativação astrocitária intensiva leva ao aumento na síntese e secreção de proteínas pelos astrócitos, como a família S100 (67,68). Estas proteínas são de ligação ao cálcio e estão envolvidas em diversas atividades regulatórias biológicas, como em células inflamatórias, neurônios, astrócitos, microglia e células endoteliais e epiteliais (69). O envolvimento de alterações na BHE tem sido relatado em doença neuro inflamatória (61). Doenças como Alzheimer (70), esclerose múltipla (EM) (71) e lúpus neuropsiquiátrico (NPSLE) (72) são exemplos de condições neurodegenerativas e neuro inflamatórias relacionadas às alterações na BHE. Adicionalmente, o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias circulantes como a IL-1, IL-6 e TNF- α tem sido associado a alterações persistentes em sistemas de neurotransmissores levando ao desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos e, principalmente, depressão (73,74).

Os pacientes com AR apresentam dor inflamatória como um dos sintomas com maior impacto na qualidade de vida, (1) e tem sido sugerida uma relação entre a dor e o risco para a hiperpermeabilidade da BHE (75). No entanto, não está claro se as alterações da BHE são causa ou efeito do processo de cronificação da dor, sendo plausível que haja uma interação entre os fatores atuando de forma independente, contribuindo para a progressão da doença (76). Alterações em componentes do sistema imunológico levam ao desenvolvimento anormal de autoanticorpos que, por sua vez, desencadeiam e medeiam um processo inflamatório crônico, especialmente nas articulações (1). As citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1beta, IL-6 e IL-17 também atuam como mediadores da dor, agindo diretamente no processo (77).

Uma das citocinas consideradas fundamentais na fisiopatologia da AR é o TNF- α (47). Esta citocina está relacionada à disfunção da BHE (78). O TNF- α é secretado por macrófagos, linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1) e muitas células parenquimatosas em situações fisiopatológicas, e no SNC é liberado por neurônios e células gliais atuando em diferentes condições fisiopatológicas (60). Ele possui ação pleiotrópica, sendo que no SNC é essencial na regulação neuroendócrina e modula respostas inflamatórias, degenerativas, vasculares e traumáticas (65,79)

A produção de TNF α estimula a produção de IL-6 crucial para a imunidade inata e adaptativa (80). Já a produção excessiva e desregulada desta citocina está envolvida em diversas

doenças e influência em uma inflamação persistente (81). Na AR, a IL-6 está envolvida em diferentes processos fisiológicos como resposta imune, inflamação e metabolismo ósseo (82). A presença de IL-6 no sistema nervoso central foi associada à progressão da doença e gravidade dos sintomas da doença de Alzheimer (83).

2.3 MODELOS DE ANIMAIS DE ARTRITE

Os modelos animais são ferramentas importantes na pesquisa pré-clínica para a compreensão dos mecanismos biológicos de doenças (84). Dentre as suas aplicações estão a verificação e validação de novas vias moleculares e alvos envolvidos na patogênese, bem como, para o rastreo e avaliação de potenciais agentes preventivos e terapêuticos (84–86).

Diferentes modelos animais para artrite são conhecidos, cada um caracteriza um subtipo da doença, e vários deles foram utilizados com sucesso em pesquisas para a descoberta de novos alvos terapêuticos e na avaliação de compostos para abordagens terapêuticas inovadoras (87). Portanto, é necessário que alguns fatores sejam levados em consideração para a escolha de um modelo ideal a ser aplicado em um determinado projeto, dentre eles a capacidade de mimetizar a patologia humana, a facilidade de realização do modelo e também o tempo de duração do protocolo experimental (87,88). Os modelos mais citados na literatura, destacam-se principalmente os modelos induzidos por injeções de colágeno do tipo II (artrite induzida por colágeno (CIA) (89); por injeção de antígenos, geralmente a albumina bovina sérica metilada (mBSA) (artrite induzida por antígeno (AIA) (84); por injeção com adjuvante completo de Freund (artrite induzida por adjuvante (CFA) (90); e o pristane (artrite induzida por pristane (PIA) (91).

2.3.1 ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO (CIA)

O modelo experimental de artrite induzida por colágeno (CIA) é considerado um modelo *in vivo* padrão ouro para o estudo da AR em razão de desenvolver características como a violação da tolerância e geração de autoanticorpos e o colágeno. A metodologia do modelo baseia-se na injeção de cepas geneticamente suscetíveis em animais com colágeno do tipo II (CII) diluído em adjuvante completo de Freund, o que induz a artrite com presença de sinovite e erosões semelhante a AR (89,92). A escolha deste modelo justifica-se devido a sua fácil reprodutibilidade e por apresentar-se como um modelo abrangente em opções de animais geneticamente suscetíveis para o desenvolvimento (87).

Na literatura é possível encontrar diferentes protocolos para indução do modelo CIA em

camundongos, sendo o modelo mais utilizado a imunização ativa por inoculação com colágeno heterólogo tipo II, mas também pode ser utilizado o colágeno de galinha tipo II (84,89,92). A CIA induzida por colágeno bovino em camundongo compartilha várias características tanto clínicas, como histopatológicas e imunológicas com a AR humana, como por exemplo, o desenvolvimento de eritema e edema, sinovite, formação de *pannus*, erosão da cartilagem e osso (84)

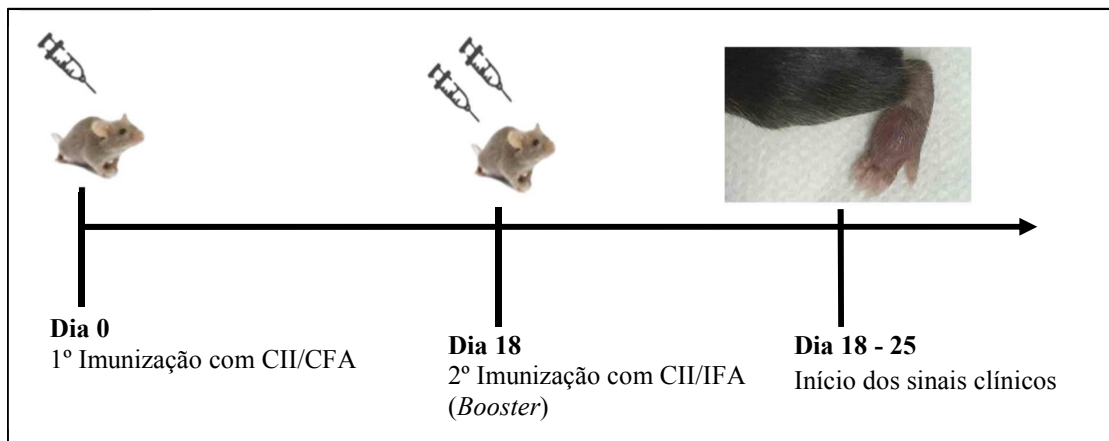


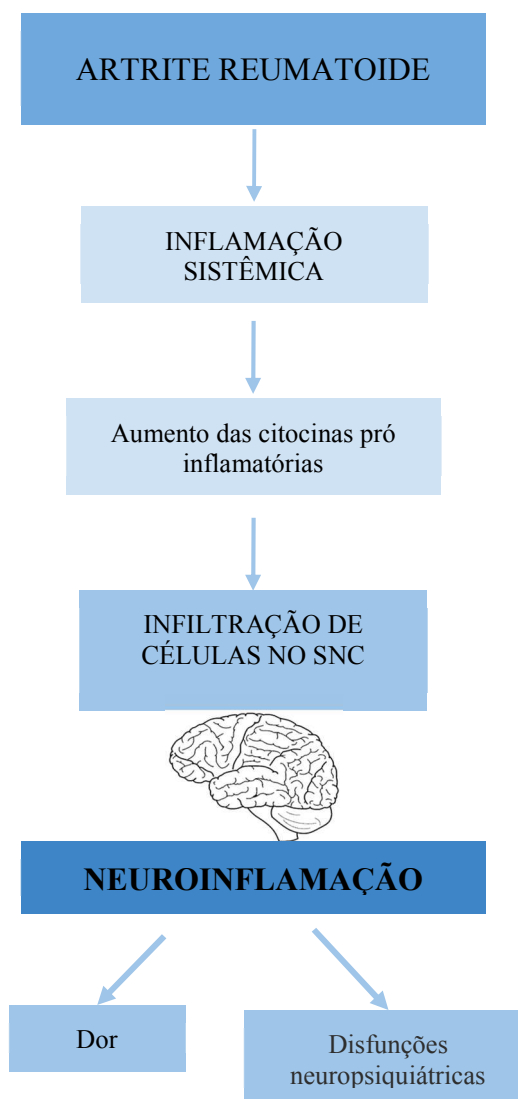
Figura 3. Esquema do protocolo experimental de CIA. CII: Colágeno bovino tipo II; CFA: Adjuvante completo de Freund; IFA: adjuvante incompleto de Freund. Fonte: Elaborada pela autora.

O acometimento da doença ocorre em 80-100% dos animais submetidos ao modelo de indução por colágeno, entretanto, as diferentes linhagens suscetíveis a esse modelo podem apresentar-se de forma desigual, necessitando assim, de adequações no protocolo, como no tipo de colágeno e a concentração de *M. tuberculosis* (89,93). Os camundongos da linhagem DBA/1 J costumam ser mais suscetíveis ao protocolo de imunização com CII e desenvolvem doença com uma concentração de 1 mg/ml de *M. tuberculosis*. Por sua vez, camundongos C57BL/6J são resistentes à artrite induzida pelo colágeno bovino tipo II, entretanto, costumam desenvolver artrite quando imunizados com colágeno de galinha tipo II e necessitam de 3-4 mg/ml de *M. tuberculosis*. Vale ressaltar também que a artrite em geral desenvolve-se mais lentamente em camundongos C57BL/6J, bem como, os casos são mais leves quando comparados aos camundongos DBA/1J (89).

Pesquisas com foco sobre o impacto da inflamação sistêmica no SNC em diferentes doenças vêm ganhando espaço, principalmente utilizando modelos animais (66). Embora extremamente relevantes, achados sobre neuroinflamação na AR são escassos, tanto em pesquisas utilizando animais, quanto em estudos clínicos. A utilização de um modelo que mimetiza a doença humana torna-se relevante para a compreensão dos mecanismos de

comunicação entre o sistema imunológico periférico e central, assim como podem proporcionar novas perspectivas na busca por estratégias eficazes a fim de neutralizar as consequências nos pacientes.

3. MARCO TEÓRICO



A base teórica acima descrita na presente dissertação demonstra que a inflamação crônica e persistente encontrada nos casos de artrite reumatoide é complexa e envolve diversas vias patogênicas. A produção de autoanticorpos leva a inflamação crônica, principalmente nas articulações, podendo afetar outros órgãos e sistemas do corpo. Quando no SNC, as células do sistema imune, como linfócitos T e B, citocinas e autoanticorpos interagem com a BHE, e podem causar a ruptura de suas junções. Conseqüentemente há o comprometimento das funções do SNC, e o surgimento de sintomas, como disfunções cognitivas, convulsões, distúrbios de humor, depressão e outros. Embora a relação entre o sistema autoimune e a BHE seja conhecida, pouco se sabe como esta interação acontece na AR. Desta forma, o estudo desta relação em modelos animais de artrite reumatoide pode avançar nosso conhecimento sobre o impacto da AR no SNC e refletir em benefícios para o diagnóstico, tratamento da doença, suas

comorbidades e agravantes.

4. JUSTIFICATIVA

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória crônica que leva à deformidade e incapacidade progressivas das articulações. A AR tem demonstrado aumentar a morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares e cerebrovasculares. Relatos de alterações no sistema nervoso central (SNC) associados à AR são limitados, entretanto, danos cerebrais descritos como meningite, encefalite, sintomas neurológicos focais, múltiplos infartos cerebrais e alterações na substância branca, podem estar relacionado a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) associada à inflamação crônica causada pela AR (21,60)

Ainda, não está claro como as alterações do sistema imunológico na AR influenciam na função microvascular cerebral, especialmente na função da BHE. Tendo em vista a necessidade de compreensão sobre as alterações no sistema imunológico e sua influência neurológica em doenças autoimunes, como a AR, estudos pré-clínicos utilizando modelos animais que mimetizam a doença humana são necessários. Modelos animais são uma excelente fonte para melhor compreensão de mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças. Há diversos modelos animais que mimetizam os sinais e sintomas da AR, dentre eles, o modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) se destaca por ser considerado padrão ouro. Nos últimos anos este modelo vem sendo explorado em diversas áreas. Ainda são escassas as informações sobre neuroinflamação neste modelo animal, bem como, a relação desta com a dor crônica que acomete muitos pacientes com AR. Diante do exposto, faz-se necessária a busca de novos parâmetros neuro inflamatórios no modelo CIA, a fim de auxiliar na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos com a dor crônica, presente na AR.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO PRIMÁRIO

Avaliar a resposta nociceptiva e parâmetros neuro inflamatórios de camundongos durante o desenvolvimento de um modelo de artrite induzida por colágeno.

5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Avaliar a nocicepção de camundongos durante o desenvolvimento de um modelo de artrite induzida por colágeno;

- Avaliar parâmetros neuro inflamatórios (IgM, IgG e IL-6;) em encéfalo de camundongos durante o desenvolvimento de um modelo de artrite induzida por colágeno;

- Analisar degeneração neuronal no encéfalo de camundongos durante o desenvolvimento de um modelo de artrite induzida por colágeno.

ARTIGO CIENTÍFICO

O manuscrito a partir da pesquisa original deste trabalho é intitulado: Neuroinflammation in an experimental model of arthritis: a pilot study.

Periódico: Clinical Rheumatology (fator de impacto 3,650, Qualis CAPES A4)

Submissão de manuscrito: em elaboração.

NEUROINFLAMMATION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ARTHRITIS: A PILOT STUDY

Natália Garcia dos Santos^{1,3,4,5}, Thaís Evelyn Karnopp^{2,3,4}, Rafaela Cavalheiro do Espírito Santo^{2,3,4}, Vinícius da Silva Freitas^{3,4}, Gustavo Flores Chapacais^{2,3,4}, Maria Luisa Gasparini^{2,3,4}, Stephanie Pilotti^{2,3,4}, Bárbara Jonson Bartikoski^{3,4}, Thales Hein da Rosa^{3,4}, Mirian Farinon^{3,4}, Iraci L.S. Torres^{1,2,5}, Ricardo Machado Xavier^{1,2,3,4}

1 Post-Graduate Program in Biological Sciences: Pharmacology and Therapeutics, Department of Pharmacology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

2 Post-Graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

3 Laboratory of Autoimmune Diseases, Division of Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;

4 Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

5 Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Pre-clinical Investigations, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence: Rua Ramiro Barcelos, 2350, Centro de Pesquisas Experimentais, sala 12109, Porto Alegre 90035-003, Brasil.

Corresponding Author:

Dr. Ricardo Machado Xavier, Hospital de Clínicas de Porto Alegre Laboratory of Autoimmune Diseases, Rua Ramiro Barcelos, 2350 Zip code 90035-003- Porto Alegre-Brasil

Telephone: +55-51-3308-8837 E-mail: rxavier10@gmail.com.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos achados apresentados nesta dissertação, pode-se constatar que o modelo experimental de artrite induzida por colágeno (CIA) apresentase-se como um modelo capaz de mimetizar com precisão os sintomas nociceptivos encontrados em pacientes com artrite reumatoide. O modelo também demonstrou ser capaz de influenciar na resposta neuroimune. Até onde temos conhecimento, nosso estudo foi o primeiro a avaliar os parâmetros neuroinflamatórios no encefalo de camundongos submetidos ao modelo de CIA, bem como a verificar as associações entre estes parâmetros neuroinflamatórios com parâmetros nociceptivos apresentados por esses animais.

Como esperado, os animais do grupo CIA apresentaram altos índices de escores clínico, edema, histopatologia da articulação e nocicepção a partir do momento definido como CIA inicial, que demonstram a eficácia da indução do modelo. Embora os escores caracterizem a presença de AR tanto no CIA25 quanto no CIA50, apenas a fase inicial (CIA25) do processo inflamatório demonstra níveis elevados de IgM, o que é indicativo de uma neuroinflamação aguda da AR. Níveis elevados de IL-6 foram identificados no período estabelecido da doença (50 dias), ainda que tenha a presença desta proteína tenha sido vista já no período inicial da doença. Em relação a quantificação de neuronios, verificamos uma tendência numérica de aumento no grupo CIA50, que demonstra que o modelo pode ser capaz de interagir com as junções da BHE e influenciar no processo de declínio dos neurônios.

Para melhor entendermos sobre as implicações do modelo experimental na permeabilidade da BHE, assim como nas manifestações neurofisiológicas, novos estudos devem ser realizados com uma nova metodologia de coleta, análise e armazenamento de amostras. Outra proposta seria um maior tempo experimental e a análise de marcadores inflamatórios periféricos que indicam a gravidade da doença.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo foi pioneiro em relação a primeiro a avaliar os parâmetros neuroinflamatórios em CIA e a demonstrar a presença de depósitos de IgM, IgG e IL-6 no encefalo destes animais.

Na continuidade deste trabalho, pretendemos aprofundar as investigações a cerca das implicações do modelo de CIA e neuroinflamação, explorando com as manifestações clínicas, bem como as alterações morfológicas, comportamentais moleculares e celulares no cérebro destes animais. Dentre as perspectivas futuras do grupo de pesquisa, estão a análise de outros marcadores inflamatórios como Interleucina-1, Interleucina-17 e TNF- α , e a análise de marcadores de ativação microglial como IBA-1 e F4/80.

REFERÊNCIAS

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. Vol. 388, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2016. p. 2023–38.
2. Alamanos Y, Voulgari P V., Drosos AA. Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review. *Semin Arthritis Rheum*. 2006;36(3):182–8.
3. Kumar LD, Karthik R, Gayathri N, Sivasudha T. Advancement in contemporary diagnostic and therapeutic approaches for rheumatoid arthritis. Vol. 79, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2016. p. 52–61.
4. Stolt P, Bengtsson C, Nordmark B, Lindblad S, Lundberg I, Klareskog L, et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: Results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann Rheum Dis*. 2003;62(9):835–41.
5. Smolen JS, Steiner G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. Vol. 2, *Nature Reviews Drug Discovery*. 2003. p. 473–88.
6. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Vol. 423, *Nature*. 2003. p. 356–61.
7. Goeldner I, Skare TL, De Messias Reason IT, Da Rosa Utiyama SR. Rheumatoid arthritis: A current view. Vol. 47, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2011. p. 495–503.
8. Khurana R, Berney SM. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 2005;12(3).
9. Giles JT. Extra-articular Manifestations and Comorbidity in Rheumatoid Arthritis: Potential Impact of Pre-Rheumatoid Arthritis Prevention. *Clin Ther*. 2019;41(7):1246–55.
10. Sayah A, English JC. Rheumatoid arthritis: A review of the cutaneous manifestations. Vol. 53, *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2005. p. 191–209.
11. Ramos-Remus C, Duran-Barragan S, Castillo-Ortiz JD. Beyond the joints: Neurological involvement in rheumatoid arthritis. Vol. 31, *Clinical Rheumatology*. 2012. p. 1–12.
12. Chowdhry V, Kumar N, Lachance DH, Salomao DR, Luthra HS. An unusual presentation of rheumatoid meningitis. *Journal of Neuroimaging*. 2005;15(3):286–8.
13. Caballol Pons N, Montalà N, Valverde J, Brell M, Ferrer I, Martínez-Yélamos S. Isolated cerebral vasculitis associated with rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine*. 2010;77(4):361–3.
14. Nishioku T, Furusho K, Tomita A, Ohishi H, Dohgu S, Shuto H, et al. Potential role for S100A4 in the disruption of the blood-brain barrier in collagen-induced arthritic mice, an animal model of rheumatoid arthritis. *Neuroscience*. 2011;189:286–92.
15. Pan W, Kastin AJ. TNF α transport across the blood-brain barrier is abolished in receptor knockout mice. *Exp Neurol*. 2002;174(2):193–200.
16. Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ. Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *J Neuroimmunol*. 1993;47(2):169–76.
17. Ambartsumian N, Klingelhöfer J, Grigorian M, Christensen C, Kriaievska M, Tulchinsky E, et al. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene*. 2001;20(34):4685–95.
18. Nishioku T, Yamauchi A, Takata F, Watanabe T, Furusho K, Shuto H, et al. Disruption of the blood-brain barrier in collagen-induced arthritic mice. *Neurosci Lett*. 2010;482(3):208–11.
19. Nishioku T, Dohgu S, Takata F, Eto T, Ishikawa N, Kodama KB, et al. Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29(3):309–16.
20. Pincus T, Brooks RH, Callahan LF. Prediction of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaire and joint count measures. *Ann Intern Med*. 1994;120(1).
21. Sharif K, Sharif A, Jumah F, Oskouian R, Tubbs RS. Rheumatoid arthritis in review: Clinical,

- anatomical, cellular and molecular points of view. *Clinical Anatomy*. 2018;31(2):216–23.
22. Suresh E. Recent advances in rheumatoid arthritis. Vol. 86, *Postgraduate Medical Journal*. 2010. p. 243–50.
 23. Marsal S, Juliá A. Rheumatoid arthritis pharmacogenomics. Vol. 11, *Pharmacogenomics*. 2010. p. 617–9.
 24. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. Vol. 4, *Autoimmunity Reviews*. 2005. p. 130–6.
 25. Studenic P, Radner H, Smolen JS, Aletaha D. Discrepancies between patients and physicians in their perceptions of rheumatoid arthritis disease activity. *Arthritis Rheum*. 2012;64(9):2814–23.
 26. Germano JL, Reis-Pardal J, Tonin FS, Pontarolo R, Melchioris AC, Fernandez-Llimos F. Prevalence of rheumatoid arthritis in south america: A systematic review and meta-analysis. Vol. 26, *Ciencia e Saude Coletiva*. 2021. p. 5371–82.
 27. Symmons D, Turner G, Webb R, Asten P, Barrett E, Lunt M, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: New estimates for a new century. *Rheumatology*. 2002;41(7):793–800.
 28. Svendsen AJ, Gervin K, Lyle R, Christiansen L, Kyvik K, Junker P, et al. Differentially methylated DNA regions in monozygotic twin pairs discordant for rheumatoid arthritis: An epigenome-wide study. *Front Immunol*. 2016;7(NOV):510.
 29. Nyhäll-Wählin BM, Petersson IF, Nilsson JÅ, Jacobsson LTH, Turesson C, Ahlmén M, et al. High disease activity disability burden and smoking predict severe extra-articular manifestations in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2009;48(4):416–20.
 30. Sokolove J, Wagner CA, Lahey LJ, Sayles H, Duryee MJ, Reimold AM, et al. Increased inflammation and disease activity among current cigarette smokers with rheumatoid arthritis: A cross-sectional analysis of US veterans. *Rheumatology (United Kingdom)*. 2016;55(11):1969–77.
 31. Liao KP, Alfredsson L, Karlson EW. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. Vol. 21, *Current Opinion in Rheumatology*. 2009. p. 279–83.
 32. Kurkó J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of rheumatoid arthritis - A comprehensive review. Vol. 45, *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 2013. p. 170–9.
 33. Scherer HU, Häupl T, Burmester GR. The etiology of rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2020 Jun;110:102–400.
 34. Van Der Woude D, Houwing-Duistermaat JJ, Toes REM, Huizinga TWJ, Thomson W, Worthington J, et al. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2009;60(4):916–23.
 35. Thomson W, Harrison B, Ollier B, Wiles N, Payton T, Barrett J, et al. Quantifying the exact role of HLA-DRB1 alleles in susceptibility to inflammatory polyarthritis: Results from a large, population-based study. *Arthritis Rheum*. 1999;42(4):757–62.
 36. Fries JF, Wolfe F, Apple R, Erlich H, Bugawan T, Holmes T, et al. HLA-DRB1 genotype associations in 793 white patients from a rheumatoid arthritis inception cohort: Frequency, severity, and treatment bias. *Arthritis Rheum*. 2002;46(9):2320–9.
 37. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. In: *The Lancet*. Elsevier B.V.; 2010. p. 1094–108.
 38. Jawaheer D, Thomson W, Macgregor AJ, Carthy D, Davidson J, Dyer PA, et al. “Homozygosity” for the HLA-DR shared epitope contributes the highest risk for rheumatoid arthritis concordance in identical twins. *Arthritis Rheum*. 1994;37(5):681–6.
 39. Radu AF, Bungau SG. Management of rheumatoid arthritis: An overview. Vol. 10, *Cells*. 2021. p. 2857.

40. Navarro-Cano G, Del Rincón I, Pogosian S, Roldán JF, Escalante A. Association of mortality with disease severity in rheumatoid arthritis, independent of comorbidity. *Arthritis Rheum.* 2003;48(9).
41. Prior P, Symmons DPM, Scott DL, Brown R, Hawkins CF. Cause of death in rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* 1984;23(2).
42. Symmons DPM, Jones MA, Scott DL, Prior P. Longterm mortality outcome in patients with rheumatoid arthritis: Early presenters continue to do well. *Journal of Rheumatology.* 1998;25(6).
43. Feldmann M, Brennan FM. *Rheumatoid Arthritis Review.* Vol. 85, Cell. 1996.
44. Miao J, Zhu P. Functional Defects of Treg Cells: New Targets in Rheumatic Diseases, Including Ankylosing Spondylitis. Vol. 20, *Current Rheumatology Reports.* 2018. p. 30.
45. Kolios AGA, Tsokos GC, Klatzmann D. Interleukin-2 and regulatory T cells in rheumatic diseases. Vol. 17, *Nature Reviews Rheumatology.* 2021. p. 749–66.
46. Jiang H, Jiang D, Shao J, Sun X. Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles based electrochemical sensor for the measurement of Gram-negative bacterial quorum signaling molecules (N-acyl-homoserine-lactones). *Biosens Bioelectron.* 2016 Jan;75:411–9.
47. Martinez-Gamboa L, Brezinschek HP, Burmester GR, Dörner T. Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: Rationale of B cell-directed therapy. Vol. 5, *Autoimmunity Reviews.* 2006. p. 437–42.
48. Kinne RW, Bräuer R, Stuhlmüller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. Vol. 2, *Arthritis Research.* 2000. p. 189–202.
49. McInnes IB, Schett G. *The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis.* 2011.
50. Cascão R, Rosário HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. Vol. 9, *Autoimmunity Reviews.* 2010. p. 531–5.
51. Wasserman AM. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician.* 2011;84(11):1245–52.
52. Grassi W, De Angelis R, Lamanna G, Cervini C. The clinical features of rheumatoid arthritis. In: *European Journal of Radiology.* 1998. p. S18-24.
53. Bathon JM, Moreland LW, DiBartolomeo AG. Inflammatory central nervous system involvement in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum.* 1989;18(4):258–66.
54. Atzeni F, Talotta R, Masala IF, Gerardi MC, Casale R, Sarzi-Puttini P. Central nervous system involvement in rheumatoid arthritis patients and the potential implications of using biological agents. Vol. 32, *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology.* 2018. p. 500–10.
55. Kim RC, Collins GH. The neuropathology of rheumatoid disease. *Hum Pathol.* 1981;12(1):5–15.
56. Lee Ching C, Kenyon L, Berk M, Park C. Rheumatoid meningitis sine arthritis. *J Neuroimmunol.* 2019;328:73–5.
57. Joaquim AF, Appenzeller S. Neuropsychiatric manifestations in rheumatoid arthritis. Vol. 14, *Autoimmunity Reviews.* 2015. p. 1116–22.
58. Perry VH, Cunningham C, Holmes C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. Vol. 7, *Nature Reviews Immunology.* 2007. p. 161–7.
59. Gorelick PB. Role of inflammation in cognitive impairment: Results of observational epidemiological studies and clinical trials. Vol. 1207, *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2010. p. 155–62.
60. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. Vol. 57, *Pharmacological Reviews.* 2005. p. 173–85.
61. Varatharaj A, Galea I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. Vol. 60, *Brain, Behavior, and Immunity.* 2017. p. 1–12.
62. Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: Permeability changes in neuroinflammation. Vol. 68, *Progress in Neurobiology.* 2002. p. 311–23.

63. Banks WA, Robinson SM. Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. *Brain Behav Immun*. 2010;24(1):102–9.
64. Hamed SA, Selim ZI, Elattar AM, Elserogy YM, Ahmed EA, Mohamed HO. Assessment of biocorrelates for brain involvement in female patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2012;31(1):123–32.
65. Pan W, Zadina JE, Harlan RE, Weber JT, Banks WA, Kastin AJ. Tumor necrosis factor- α : A neuromodulator in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997;21(5).
66. Lai PH, Wang TH, Zhang NY, Wu KC, Yao CCJ, Lin CJ. Changes of blood-brain-barrier function and transfer of amyloid beta in rats with collagen-induced arthritis. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):35.
67. Heizmann CW. Ca²⁺-binding S100 proteins in the central nervous system. *Neurochem Res*. 1999;24(9):1097–10100.
68. Gonçalves CA, Concli Leite M, Nardin P. Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. Vol. 41, *Clinical Biochemistry*. 2008. p. :755-763.
69. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech*. 2003;60(6):540–51.
70. Erickson MA, Banks WA. Blood-brain barrier dysfunction as a cause and consequence of Alzheimer's disease. Vol. 33, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013. p. 1965.
71. Fabis MJ, Scott GS, Kean RB, Koprowski H, Hooper DC. Loss of blood-brain barrier integrity in the spinal cord is common to experimental allergic encephalomyelitis in knockout mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(13):5656–61.
72. Schenatto CB, Xavier RM, Bredemeier M, Portela LVC, Tort ABL, Dedavid E Silva TL, et al. Raised serum S100B protein levels in neuropsychiatric lupus. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(6).
73. Felger JC, Lotrich FE. Inflammatory cytokines in depression: Neurobiological mechanisms and therapeutic implications. Vol. 246, *Neuroscience*. 2013. p. 199–229.
74. Dowlati Y, Herrmann N, Swardfager W, Liu H, Sham L, Reim EK, et al. A Meta-Analysis of Cytokines in Major Depression. *Biol Psychiatry*. 2010;67(5):446–57.
75. Brooks TA, Hawkins BT, Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Chronic inflammatory pain leads to increased blood-brain barrier permeability and tight junction protein alterations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:738–43.
76. Gelb S, Stock AD, Anzi S, Putterman C, Ben-Zvi A. Mechanisms of neuropsychiatric lupus: The relative roles of the blood-cerebrospinal fluid barrier versus blood-brain barrier. *J Autoimmun*. 2018;91:34–44.
77. Schaible HG. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. Vol. 16, *Arthritis Research and Therapy*. 2014. p. 470.
78. Chen AQ, Fang Z, Chen XL, Yang S, Zhou YF, Mao L, et al. Microglia-derived TNF- α mediates endothelial necroptosis aggravating blood brain-barrier disruption after ischemic stroke. *Cell Death Dis*. 2019;10(7):487.
79. ARVIN B, NEVILLE LF, BARONE FC, FEUERSTEIN GZ. Brain Injury and Inflammation. A Putative Role of TNF α . *Ann N Y Acad Sci*. 1995;765(1):765–762.
80. Narazaki M, Kishimoto T. The two-faced cytokine IL-6 in host defense and diseases. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. 2018.
81. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6(10):a016295.
82. Pandolfi F, Franza L, Carusi V, Altamura S, Andriollo G, Nucera E. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. p. 5238.
83. Zhang J, Wu J, Liu F, Tong L, Chen Z, Chen J, et al. Neuroprotective effects of anthocyanins and its major component cyanidin-3-O-glucoside (C3G) in the central nervous system: An outlined review. Vol. 858, *European Journal of Pharmacology*. 2019. p. 172500.

84. Hegen M, Keith JC, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. Vol. 67, *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2008. p. 1505–15.
85. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervordeldonk MJ, Holmdahl R, Baumans V, et al. Animal models for arthritis: Innovative tools for prevention and treatment. Vol. 70, *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2011. p. 1357–62.
86. Vincent TL, Williams RO, Maciewicz R, Silman A, Garside P, Bevan S, et al. Mapping pathogenesis of arthritis through small animal mode. Vol. 51, *Rheumatology (United Kingdom)*. Oxford University Press; 2012. p. 1931–41.
87. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*. 2009 Aug;39(8):2040–4.
88. Miyoshi M, Liu S. Collagen-induced arthritis models. In: *Methods in Molecular Biology*. 2018. p. 3–7.
89. Pietrosimone K, Jin M, Poston B, Liu P. Collagen-induced Arthritis: A Model for Murine Autoimmune Arthritis. *Bio Protoc*. 2015;5(20):1626.
90. Chillingworth NL, Donaldson LF. Characterisation of a Freund's complete adjuvant-induced model of chronic arthritis in mice. *J Neurosci Methods*. 2003;128(1–2):45–52.
91. Cuzzocrea S. Characterization of a novel and spontaneous mouse model of inflammatory arthritis. Vol. 13, *Arthritis Research and Therapy*. 2011. p. 126.
92. Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice [13]. Vol. 283, *Nature*. 1980. p. 666–8.
93. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH. Minireview: Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. Vol. 61, *Life Sciences*. 1997. p. 131–6.
94. Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, Meurer L, Brenol JCT, Roesler R, et al. Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(10).
95. Billiau A, Matthys P. Collagen-induced arthritis and related animal models: How much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(5–6):339–44.
96. Oliveira-Freitas VL, Thomaz LDGR, Simoneti LEL, Malfitano C, De Angelis K, Ulbrich JM, et al. RC-3095, a selective gastrin-releasing peptide receptor antagonist, does not protect the lungs in an experimental model of lung ischemia-reperfusion injury. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
97. Cunha TM, Verri WA, Vivancos GG, Moreira IF, Reis S, Parada CA, et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2004;37(3):401–7.
98. de Oliveira Nunes Teixeira V, Filippin LI, Viacava PR, de Oliveira PG, Xavier RM. Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Exp Biol Med*. 2013;238(12):1421–30.
99. Nguyen D, Nguyen D. Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. *Protoc Exch*. 2013;
100. Filippin LI, Teixeira VN, Viacava PR, Lora PS, Xavier LL, Xavier RM. Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013;4(3):231–8.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Metodologia expandida

9.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Trata-se de um projeto experimental comparativo, com utilização de material biológico (encéfalos de camundongos), do projeto CEUA – HCPA sob número 2018-0367, armazenadas em blocos de parafina (corte anterior e posterior).

9.2 ANIMAIS

Para diminuir o número de animais utilizados pelo grupo de pesquisa, os tecidos utilizados neste projeto foram coletados de animais incluídos em um projeto anterior do grupo de pesquisa aprovado no CEUA – HCPA sob número 2018-0367. No referido projeto, foram utilizados 32 camundongos machos DBA1/J. de 8-12 semanas de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas com água e comida *ad libitum* no biotério climatizado da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz controlado (12/12-claro/escuro). A manipulação animal, coleta de dados, desenvolvimento experimental e eutanásia foram realizados na Unidade de Experimentação Animal (CP-HCPA) no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) durante todo o projeto. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Doenças Autoimunes (LABDAI) e as amostras serão analisadas na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do HCPA.

9.3 MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO (CIA)

A indução do modelo de CIA foi feita utilizando colágeno bovino tipo II (CII) dissolvido em 0,1 M de ácido acético a 4°C por 12h (2 mg/ml). O adjuvante completo de Freund (CFA, Sigma, St Louis, MO, USA) será misturado com 2 mg *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria inativada) (strain H37Ra, Difco, Detroit, MI, USA). No adjuvante completo de Freund, cada mL contém 1 mg de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, ATCC 25.177), a qual foi inativada pelo calor; 0,85 mL óleo de parafina; 0,15 mL monoleato de manide. São misturados em volumes iguais de CII (2 mg/ml) e CFA (2 mg/ml) para formar a emulsão. A doença foi induzida através da injeção de 50 µl da emulsão, no dia zero, com imunização intradérmica na base da

cauda (TEIXEIRA et al. 2013). Freund, cada mL contém 0,85 mL óleo de parafina e 0,15 mL monooleato mannide. Para as imunizações, os animais foram anestesiados e mantidos com isoflurano (4-5% e 1-2%, respectivamente) diluído em oxigênio a 100% (fluxo de O₂ de 0,5 L/min) e fornecido via cone nasal. Os animais CO foram anestesiados no dia da indução e, posteriormente, no booster a fim do grupo CO ter o mesmo estresse do grupo CIA. Faz-se necessário a utilização de camundongos da linhagem DBA/1J pois esta linhagem é suscetível ao desenvolvimento da artrite experimental através de indução por CIA (6).

Grupos experimentais:

Os animais foram randomizados aleatoriamente em 5 grupos. Sendo CO - grupo controle saudável sem intervenção e CIA - camundongos submetidos ao modelo de artrite induzida por colágeno;

- CO 25 dias (8 animais);
- CO 50 dias (8 animais);
- CIA 25 dias (8 animais);
- CIA 50 dias(8 animais).

Os animais alocados no grupo CIA, receberam a indução da doença no dia zero e um booster no dia 18. Para avaliar os níveis na doença inicial e na doença estabelecida, o experimento foi realizado em três blocos. No primeiro bloco, 5 animais sem indução, foram eutanasiados no dia zero. No segundo bloco, 8 animais do grupo CIA e 8 animais do grupo CO foram eutanasiados no dia 25 após a indução. No terceiro bloco, 8 animais do grupo CIA e 8 animais do grupo CO e foram eutanasiados no dia 50 após a indução.

9.4 ESCORE CLÍNICO

Os animais foram monitorados diariamente durante todo o período experimental por examinadores cegados. A gravidade da artrite foi determinada clinicamente em cada membro, no dia zero, 18 (dia do booster) e três vezes por semana durante todo o experimento, de acordo com a seguinte escala, que varia de 0 a 4:

- 0 – Sem sinais de eritema ou edema;
- 1- eritema e edema leve restrito ao meio do pé/mão (tarso/carpo) ou à articulação do tornozelo/punho;
- 2 - eritema e edema leve se estendendo do tornozelo/punho até o meio do pé/mão;
- 3- eritema e edema moderado se estendendo do tornozelo/punho até as articulações metatarsais/metacarpais.

4- eritema e edema grave se estendendo do tornozelo/punho aos dedos do pé/mão (ou anquilose do membro).

O escore total do animal será considerado a somatória dos escores de cada pata, sendo um máximo de 16, ou seja, escore máximo de 4 nas quatro patas somando no total 16 (94,95). A gravidade máxima que um camundongo pode atingir neste modelo é 4 com a presença de anquilose do membro pélvico, ou seja, há presença da doença severa no animal. Ao final dos 50 dias de experimentação os animais apresentarão o escore máximo com atrofia, 4, de acordo com trabalhos anteriores do grupo, porém, não é descartado o viés de que alguns animais possam ter escores menores do que o máximo (94).

9.5 EDEMA

O edema da pata foi medido três vezes por semana até o fim do período experimental através de pletismômetro (Insight Ltda, Ribeirão Preto, Brasil), o qual mensura com exatidão o volume dos membros pélvicos dos camundongos. O animal foi imobilizado por aproximadamente 3 minutos, tempo de duração do experimento, em uma posição que facilite o manuseio e medida, sendo assim, sua pata posterior foi esticada e inserida até a linha anatômica de uma solução no equipamento (94). O volume dos membros pélvicos foi considerado de acordo com o volume de deslocamento desse líquido (expresso em ml). Esse acompanhamento foi feito a partir do dia zero, antes da primeira imunização, sendo este considerado o volume inicial. Ao longo do período experimental a análise do edema foi realizada três vezes por semana durante todo o experimento.

9.6 NOCICEPÇÃO

A nocicepção dos membros pélvicos e torácicos foi avaliada no dia zero, no booster (dia 18) e nos dias 25 e 50 após a indução em uma sala silenciosa, onde os camundongos foram dispostos em caixas acrílicas (12x10x17 cm), as quais são apoiadas sobre uma grade de ferro por 15 minutos para a ambientação. A estimulação ocorre quando os animais estiverem parados, sem apresentarem movimentos exploratórios ou defecação. Para esse experimento foi utilizado um medidor de pressão eletrônico (Analgesímetro Digital, Insight Equipamentos Ltda), consistindo de uma haste acoplada a um transdutor de força contendo uma microponteira de polipropileno adaptada (4,15mm² de área de contato; IITC Inc., Life Science Instruments, Woodland Hills, CA, USA) em uma extremidade. Após a ambientação, será aplicada sob a área central da pata traseira do animal uma força crescente perpendicular para induzir a flexão

seguida pela retirada da pata. A força aplicada foi reproduzida automaticamente no analgesímetro quando a pata for retirada. O procedimento demora aproximadamente 3 minutos por camundongo. O peso necessário para flexão elucidada foi expresso em gramas e o teste será realizado em triplicata (96,97).

9.7 EUTANÁSIA

Nos dias 25 e 50 após a indução da doença, os blocos de animais dos grupos CO e CIA foram eutanasiados. Ambos os grupos foram submetidos à anestesia inalatória por isoflurano (5% vaporizado em 100% O₂ 0,5l/min) e foram eutanasiados por meio de punção cardíaca com os animais em plano profundo de anestesia. A articulação do tornozelo foi coletada para confirmação da indução da doença através de análise histopatológica. O cérebro foi coletado e dividido por corte coronal em duas partes (anterior e posterior), que foram acondicionados em Formol tamponado (10%) e emblocado em parafina após 24 horas, para análise por imunofluorescência de IgM e IgG, imuno-histoquímica para análise de IL-6 e contagem de neurônios degenerados.

9.8 HISTOPATOLOGIA DA ARTICULAÇÃO

Após a dissecação anatômica das articulações, elas foram depositadas separadamente em recipientes contendo formol 10% tamponado e permaneceram por um período de 5 a 7 dias. Após esse período, o formol será retirado e as articulações serão imersas em ácido ítrico 10% por 24 horas para descalcificação da estrutura em combinação com a unidade de patologia experimental. As articulações serão cortadas em secções e coradas com hematoxilina eosina (HE) para a análise realizada por um patologista cegado. Para inflamação sinovial foi usado o sistema de acordo com de Oliveira Nunes et. al. (2013) no qual 5 campos de ampliação de alto-poder (HPFs) foram analisados, sendo a média da contagem usada para as análises (98). Foram analisados:

- 1) Infiltrado mononuclear inflamatório, classificado como 0 - ausente, 1 - leve (1-10%), 2 - moderado (11-50%), e 3 - severo (51-100%);
- 2) Hiperplasia sinovial através de sistema de contagem descrito por Douni et. al.(44): 0- ausente, 1 - leve (5-10 camadas), 2 - moderado (11-20 camadas), e 3 - severo (20 camadas);
- 3) Extensão da formação de pannus, baseado na impressão do leitor, classificado como: 0 – ausente, 1 - leve, 2 - moderado, e 3 – severo;

- 4) Fibrose sinovial classificado como 0 - ausente, 1 - leve (1-10%), 2 – moderado (11-50%), e 3 - severo (51-100%);
- 5) Erosão da cartilagem, avaliada conforme sistema de contagem descrito por Douni et. al. (44) que avalia a porcentagem da superfície de cartilagem que é afetada: 0 – nenhum, 1 - leve (1-10%), 2 - moderado (11-50%), e 3 - severo (51-100%);
- 6) Erosão Óssea marcada como: 0 - ausente, 1 - leve (erosão 5HPF), 2 – moderado (erosão aumento), 3 - severo (erosão transcortical que invade medula óssea, neoformação óssea cortical).

9.9 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA

A avaliação de IgM e IgG foram examinadas por imunofluorescência direta usando a técnica de dupla coloração. Para a coloração de IgM, foi utilizado anticorpo policlonal IgM de cabra (diluição 1:100; Abcam - ab150123, EUA). Para coloração foi utilizado o anticorpo policlonal de cabra anti-IgG-FITC (diluição 1:50; Abcam – ab97022, EUA). Os blocos de parafina contendo parte anterior e posterior cérebro foram cortados em seções com 3µm de espessura. As seções foram submetidas à desparafinização em estufa a 75oC por 40 minutos. Após, as seções foram imersas em três xilóis por 5 minutos cada, depois em quatro álcoois a 99% elavadas em água destilada. Para recuperação do antígeno, todas as seções foram incubadas com tampão citrato 10mM pH 6,0 por 35 min e aquecidas em banho-maria a 94oC por 10 min. Para o bloqueio de proteínas, as seções foram incubadas com BSA a 3% em PBS-Tween 20 a 0,05% por 1 hora. Todos os anticorpos foram incubados com PBS-Tween 20 contendo BSA a 2% em uma incubadora úmida por 4oC overnight. As seções foram lavadas três vezes por 5 min usando PBS-Tween 20 e 50µl de DAPI foram adicionados a cada seção de tecido, após 20 minutos a lâmina foi montada. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 com uma ampliação final de 400x. Cinco fotos foram capturadas por animal. A intensidade da fluorescência foi digitalizada e quantificada pelo software ImageJ. As análises histopatológicas serão realizadas na Unidade de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas Experimentais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Todas as amostras serão analisadas por um patologista cegado.

9.10 IMUNOHISTOQUÍMICA

A expressão da IL-6 no cérebro foi examinada pela técnica de imuno-histoquímica usando o anticorpo monoclonal anti-IL6 de coelho (diluição 1:25; Abcam - ab290735, EUA). Os

tecidos cerebrais foram cortados em seções de 4 µm de espessura e desparafinizados com xileno e reidratados com etanol. A recuperação antigênica enzimática foi realizada com proteinase K (0,4 mg/mL). Uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% foi então usada para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Os cortes foram incubados com o anticorpo por 50 minutos em temperatura ambiente. Após as seções terem sido lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato, elas foram incubadas com reagente de detecção por 30 minutos em temperatura ambiente. Por fim, os cortes foram incubados com diaminobenzidina (DAB) por 10 minutos e contracolorados com hematoxilina por 2 minutos. Cinco imagens por animal foram capturadas usando um microscópio de fluorescência BX51 com uma ampliação final de 400x. A intensidade de IL-6 foi quantificada usando a pontuação de densidade óptica (OD) de IHC de acordo com o método de Nguyen et al (2013) usando o plug-in de criador de perfil IHC de código aberto no software ImageJ (99).

9.11 TÉCNICA DE COLORAÇÃO FLUORO JADE

Os neurônios degenerados no encéfalo foram examinados por meio da técnica de coloração com Fluoro Jade, considerada “padrão ouro” para detectar esse tipo de dano via fluorescência (32), sendo que o fluorocromo C é o que apresenta maior afinidade por neurônios em degeneração (33). Para isso, serão feitas lâminas com cortes histológicos de 10µm de espessura do encéfalo dos camundongos testados. O protocolo aqui adotado foi adaptado de Schmued e colaboradores (33). Brevemente, para a coloração, são necessárias três soluções: álcool absoluto básico (20mL de NaOH + 80mL de álcool absoluto); permanganato de potássio (180mg de KMnO₄ + 300mL de dH₂O); solução de Fluoro Jade C – solução *stock* (5mg de Fluoro Jade C + 50mL de dH₂O) e solução de marcação (6mL de solução *stock* de FJC + 294mL de ácido acético). Todo o procedimento de coloração das lâminas será feito à temperatura ambiente e começará com a imersão das lâminas em álcool absoluto por 5 minutos, depois em álcool 70% por 2 minutos e então as lâminas serão enxaguadas em água destilada. Após, as lâminas serão secadas em estufa a 40°C por 10 minutos e o esfriamento será feito de volta à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas serão imersas por 10 minutos em um recipiente contendo a solução de 0,06% de KMnO₄. Para que a solução banhe igualmente todas as lâminas e o tecido uniformemente, o recipiente será colocado em um *shaker*. Passa-se, então, a mais duas lavagens, de 1 minuto cada, com água destilada. Os próximos passos do protocolo exigirão que sejam realizados no escuro, iniciando com a imersão das lâminas na solução de Fluoro Jade C por 20 minutos, seguida de três enxagues em água destilada (1 minuto cada). A secagem será feita *overnight*, no escuro e à temperatura ambiente, sobre papel

toalha. Finalmente, no dia seguinte as lâminas serão mergulhadas em xilol 3 vezes, por 1 minuto cada vez, e será adicionada a lamínula, permitindo a visualização em microscópio confocal.

Após prontas, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 com uma ampliação final de 400x, onde foram capturadas 5 fotos por animal. As contagens de neurônios Fluoro Jade positivos foram realizadas em duplicada por investigadores cegos.

9.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A fim de diminuir o número de animais utilizados pelo grupo de pesquisa, este estudo piloto, utilizou amostras biológicas de um estudo anterior do grupo de pesquisa aprovado no CEUA – HCPA sob número 2018-0367. No referido projeto, foram utilizados 37 camundongos machos DBA1/J de 8-12 semanas de idade, o tamanho da amostra no estudo foi baseado em pesquisas anteriores do nosso grupo, em que o desfecho principal foi a atrofia muscular acessada pela área de secção transversa da miofibrila (100) .

Os dados sem distribuição Gaussiana pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov são descritos como medianas e intervalo interquartil. Edema da pata traseira, escore da doença, nocicepção, análise histopatológica e marcadores inflamatórios cerebrais (IgM e IgG) foram realizados usando ANOVA two-way seguido pelo teste de Bonferroni e é apresentado como média \pm erro padrão da média (SEM). A associação entre imunoglobulina e interleucina com parâmetros nociceptivos foi avaliada pela correlação de Pearson ou correlação de Spearman quando apropriado. Os resultados foram inseridos em programa específico de análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), versão 18.0. Para todos os testes, foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.