

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO DA  
*FASCIOLA HEPATICA* EM FIBROBLASTOS SINOVIAIS DE PACIENTES COM  
ARTRITE REUMATOIDE**

Suelen Pizzolatto Dalmolin

Porto Alegre  
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO EXTRATO DA  
*FASCIOLA HEPATICA* EM FIBROBLASTOS SINOVIAIS DE PACIENTES COM  
ARTRITE REUMATOIDE**

Suelen Pizzolatto Dalmolin

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier  
Coorientadora: Dra. Fabiany da Costa Gonçalves

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para obtenção do título de Mestre  
em Medicina: Ciências Médicas, da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, Programa de Pós Graduação em  
Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre  
2019

O formato da dissertação segue o modelo recomendado pelo PPG em Medicina:  
Ciências Médicas: Epidemiologia, UFRGS, sendo apresentada na forma de um artigo  
de revisão sobre o tema, seguido de um artigo original contendo os resultados finais.

**BANCA EXAMINADORA**

*Odirlei André Monticelo*

*Lucia Mariano da Rocha Silla*

*Ana Helena Paz*

*Marcelo Dutra Arbo*

***Epígrafe:***

*“Crescer significa mudar e mudar envolve riscos: uma passagem do conhecido para o desconhecido”. A Cabana*

## **Agradecimentos**

A minha família: Meus pais, pelo amor e apoio incondicional às minhas escolhas, sempre. Por vocês, repito o que disse na minha graduação: Essa vitória é NOSSA. Meu namorado, por compreender cada momento e dividir a cerveja nas sextas à noite, enquanto eu trabalhava.

Ao Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier, meu orientador, exemplo profissional. Pela oportunidade de desenvolver o mestrado e por estar sempre presente no laboratório e ser acessível às nossas inquietações.

À minha coorientadora Dra. Fabiany da Costa Gonçalves, pelos ensinamentos e principalmente pela confiança depositada em mim, que despertou e alimentou minha capacidade. Obrigada por estar tão presente mesmo tão distante.

Ao Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas. Em especial ao Prof. Dr. Rafael Mendonça da Silva Chakr e ao Prof. Dr. Charles Lubianca Kohem, pela ajuda no desenvolvimento das aulas do Estágio Docente. Ao Prof. Dr. Claiton Viegas Brenol, por não medir esforços em conseguir incentivos para nossos trabalhos em Congressos. Também, à secretária Gabriela, por ser tão solícita.

Aos residentes do Ambulatório de Reumatologia do Hospital de Clínicas, que participaram das coletas de líquido sinovial. Em especial, a Dra. Vanessa Hax, que demonstrou envolvimento e empenho à cada coleta.

Aos meus queridos amigos, muito mais que colegas, do Laboratório de Doenças Autoimunes do Hospital de Clínicas. O incentivo, compreensão e apoio de todos foram fundamentais para a conclusão dessa etapa.

A Rê, que me ensinou a ser mais IC que mestranda e esteve ao meu lado do início ao fim. A Miri, que confiou à mim o ensinamento de técnicas. A Jo, por dedicar seu tempo no ELISA. A Rafa, pelo envolvimento e preocupações diárias.

A Manu e a Thaís, minhas amigas mestrandas, que andaram lado a lado comigo nessa linda caminhada e que sempre vou levar no coração. PS: Manu, aparentemente, SIM, operamos milagres.

Ao Eduardo Fillipi Chiella, por estar sempre à disposição para ajudar com as técnicas do Citômetro de Fluxo e da análise do DAPI, sempre nos incentivando a aprender.

Ao Martin, e a equipe do Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia da UFRGS que esteve direta e indiretamente envolvida no processamento do extrato da *Fasciola hepática*, tornando possível o desenvolvimento desse projeto.

A Prof. Dra. Ana Helena Paz, do Laboratório de Doenças Inflamatórias Intestinais, por ter se colocado à disposição quando precisei.

A Michelli, do DII, pela troca de experiências e reagentes, e a Carol, pelo mesmo e por ir pra casa de T7 na chuva comigo.

As minhas amadas amigas e professoras da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Onde tudo começou. Os quais me apoiaram e incentivaram e estiveram ao meu lado me acompanhando. Em especial a Prof. Dra. Eliane Dallegrave, que confiou em mim desde o início. E também a Dany, pelas noites na PUC, na UFCSPA e por ter me ensinado a “mesclar” (risos).

À Camilla Ribeiro Lima Machado, de Belo Horizonte, pela atenção e envio das alíquotas de células dos seus pacientes, o que contribuiu para a agilidade dos testes.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas pela oportunidade de qualificação.

Aos pacientes do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre que despretensiosamente aceitaram participar deste projeto, contribuindo para a possibilidade de se gerar mais conhecimento.

## RESUMO

**Introdução:** A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica autoimune que afeta principalmente as articulações. Os fibroblastos sinoviais (FLS) são as principais células estromais da sinóvia articular, e apresentam estão envolvidos na degradação da cartilagem e na erosão óssea. Não há cura médica ou cirúrgica conhecida para a AR e as opções terapêuticas atuais não são efetivas na manutenção e indução da remissão da doença. Por essa razão, moléculas com ação anti-inflamatória e imunomoduladora estão sendo estudadas a partir de extratos de helmintos. A *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) é um helminto que libera produtos excretores-secretores através de seu tegumento que contêm componentes imunomoduladores capazes de suprimir a resposta imune Th1 e a produção de citocinas inflamatórias. **Objetivo:** Avaliar *in vitro* o potencial terapêutico do extrato de *F. hepatica* em FLS de pacientes com AR. **Materiais e métodos:** Primeiramente, os FLS foram isolados do líquido sinovial de pacientes com AR, cultivados, e caracterizados para os marcadores fenotípicos CD55, CD90 e CD68. Após, os FLS foram expostos a diferentes concentrações do extrato de *F. hepatica* (60 µg/ml, 80 µg/ml e 100 µg/ml) e analisados após 24 h, 48 h e 72 h pelo ensaio de proliferação celular (MTT). O efeito do extrato também foi avaliado através do índice de morfometria nuclear (NMI), ensaio de apoptose, aderência celular, invasão e migração e produção de TNF- $\alpha$ . As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA ou teste T e  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. **Resultados:** O extrato de *F. hepatica* reduziu a proliferação celular dos FLS na concentração de 100 µg/ml após 48 h (83,8 %  $\pm$  5,0 extrato vs 100,0 %  $\pm$  00 controle;  $p < 0,05$ ), e nas concentrações de 80 µg/mL (88,4 %  $\pm$  3,0 extrato vs 100,0 %  $\pm$  0,0 controle;  $p < 0,05$ ) e 100 µg/ml (89,8 %  $\pm$  3,8 extrato vs 100,0 %  $\pm$  0,0 controle;  $p < 0,05$ ) após 72 h, quando comparado ao grupo controle sem tratamento. Baseado nesses resultados, a dose de 100 µg/ml no tempo de 48 h foi escolhida para os testes seguintes. O tratamento com o extrato de *F. hepatica* não afetou parâmetros de NMI nem induziu apoptose ou morte celular nos FLS. Por outro lado, o extrato demonstrou redução da capacidade de aderência dos FLS (92,0 células  $\pm$  5,8 extrato vs 116,3 células  $\pm$  7,9 controle;  $p < 0,05$ ), do potencial migratório (69,5 %  $\pm$  17,6 extrato vs 100,0 % controle;  $p < 0,05$ ) e da invasão celular (80,3 %  $\pm$  3,9 extrato vs 100,0 % controle;  $p < 0,05$ ). Além disso, houve uma tendência na redução dos níveis de TNF- $\alpha$  após o tratamento com o extrato. **Conclusão:** Em conjunto, nossos resultados apontam o extrato de *F. hepatica* como uma potencial estratégia terapêutica para AR, devido à sua capacidade de reduzir o perfil agressivo e invasivo dos FLS, sem induzir apoptose ou morte celular. Análises adicionais *in vitro* e estudos *in vivo* em modelos experimentais de artrite são necessárias para uma melhor compreensão dos mecanismos do efeito do extrato da *F. hepatica* e de seus diferentes componentes nos FLS.



## ABSTRACT

**Introduction:** Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease that mainly affects the joints. Fibroblast-like synoviocytes (FLS) are the main stromal cells of the joint synovium, and are involved in cartilage degradation and bone erosion. There is no known medical or surgical cure for RA and current therapeutic options are not effective in maintenance and induction of disease remission. For this reason, molecules with anti-inflammatory and immunomodulatory action are being studied from helminth extracts. *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) is a helminth that releases excretory-secretory products through its tegument which contains immunomodulatory components capable of suppressing the Th1 immune response and the production of inflammatory cytokines. **Objective:** To evaluate the therapeutic potential of *F. hepatica* extract in FLS from patients with RA. **Materials and methods:** First, the FLS were isolated from synovial fluid of RA patients, cultured and characterized for the phenotypic markers CD55, CD90 and CD68. After, the FLS were exposed to different concentrations of *F. hepatica* extract (60 µg/ml, 80 µg/ml and 100 µg/ml) and analyzed after 24 h, 48 h and 72 h by the cell viability assay (MTT). The effect of the extract was also evaluated by nuclear morphometry index (NMI), apoptosis assay, cell adherence, invasion and migration tests, and TNF-α production. Statistical analyzes were performed by ANOVA or T test and  $p < 0.05$  was considered statistically significant. **Results:** *F. hepatica* extract decreased the cell viability of FLS at concentration of 100 µg/ml after 48 h (83.8 % ± 5.0 extract vs 100.0 % ± 0.0 control;  $p < 0.05$ ), and at concentrations of 80 µg/ml (88.4 % ± 3.0 extract vs 100.0 % ± 0.0 control;  $p < 0.05$ ) and 100 µg/ml (89.8 % extract ± 3.8 extract vs 100.0% ± 0.0 control;  $p < 0.05$ ) after 72 h, when compared with control group without treatment. Based on these results, the dose of 100 µg/ml after 48 h was chosen for the following tests. The treatment with *F. hepatica* extract does not affect NMI parameters or induce apoptosis or cell death on FLS. On the other hand, the extract showed a decreased of FLS adherence (92.0 cells ± 5.8 extract vs 116.3 cells ± 7.9 control;  $p < 0.05$ ), migratory potential (69.5 % ± 17.6 extract vs 100.0 % control;  $p < 0.05$ ) and cell invasion (80.3 % ± 3.9 extract vs 100.0 % control;  $p < 0.05$ ). Moreover, there was a trend of decreased TNF levels after extract treatment. **Conclusions:** Taken together, our results point out *F. hepatica* extract as a potential strategy for AR due to their ability to reduce the aggressive and invasive profile of FLS without inducing apoptosis and cell death. However, further analyses in vitro and in vivo are needed for a better understanding the mechanisms of the effect of *F. hepatica* extract on FLS and its different components on FLS.

## LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Figura 1</b> – Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	17
<b>Figura 2</b> – Alterações articulares na Artrite Reumatoide.....	22
<b>Figura 3</b> - Cultura de FLS.....	25
<b>Figura 4</b> - Morfologia dos FLS.....	26
<b>Figura 5</b> – Marco conceitual da Artrite Reumatoide.....	31
<b>Figura 5</b> – Aspectos envolvidos na modificação da resposta imune.....	32

## LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

<b>Figure 1</b> - <i>Characterization of FLS cultures.....</i>	49
<b>Figure 2</b> - <i>F. hepatica extract decreased the FLS viability.....</i>	50
<b>Figure 3</b> - <i>F. hepatica extract did not alter parameters of nuclear and shape morphometry, apoptosis and necrosis of FLS.....</i>	51
<b>Figure 4</b> - <i>F. hepatica extract reduced the adherence efficiency, the migratory and invasion potentials of FLS.....</i>	53
<b>Figure 5</b> - <i>F. hepatica extract demonstrated a tendency to decrease the release of TNF-<math>\alpha</math> by FLS.....</i>	54

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

<b>Table 1</b> - <i>Clinical characteristics of the patients at the time of disease</i> .....	48
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Artrite Reumatoide
CD	Células dendríticas
DMARDs	<i>Disease Modifying Antirheumatic Drugs</i> Drogas modificadoras do curso da doença
ESPs	<i>Excretory-secretory products-</i> Produtos excretores-secretores
FLS	<i>Fibroblast-like synoviocytes</i> Fibroblastos sinoviais
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-9	Interleucina-9
IL-13	Interleucina-13
IL-17	Interleucina-17
MMPs	Metaloproteinases
Th1	Células T <i>helper</i> 1
Th2	Células T <i>helper</i> 2
TLRs	<i>Toll Like Receptors</i> Receptores <i>Toll-Like</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor alfa</i> Fator de necrose tumoral alfa
TGF $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i> Fator de transformação do crescimento
Treg	Linfócito T regulatório

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.2 Estratégias para localizar e selecionar as informações	16
2.3 Artrite Reumatoide	18
2.4 Epidemiologia	19
2.5 Fibroblastos sinoviais (FLS) na AR	20
2.7 Tratamentos disponíveis	26
2.8 Helmintos	27
3. MARCO CONCEITUAL	32
4. JUSTIFICATIVA	33
5. OBJETIVOS	34
5.1 Objetivo geral	34
5.2 Objetivos específicos	34
ARTIGO	44
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	64
8. ANEXOS E/OU APÊNDICES	65
Anexo I. Termo de consentimento livre e esclarecido	65
Anexo II. Termo de confidencialidade para uso de dados	67
STROBE Statement	68

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças reumáticas atingem pelo menos 10% da população mundial e estão entre as mais antigas e incapacitantes doenças na prática clínica (SANGHA, 2000; SYMMONS, 1998), as quais são geralmente progressivas e associadas à dor (WHO, 2018). A artrite reumatoide (AR) é uma doença reumática, autoimune e crônica que afeta aproximadamente 1% da população mundial (LEE; WEINBLATT, 2001; SENNA; FERRAZ, M B, 2004). A doença é patologicamente e clinicamente heterogênea e está associada a sintomas que envolvem inflamação, danos articulares e aumento da mortalidade (NICE, 2018).

A imunidade adaptativa desregulada pode preceder a manifestação clínica da doença articular por muitos anos, sendo provável que a ativação repetida da imunidade inata possa contribuir para a quebra da tolerância (MELO CRUVINEL, DE *et al.*, 2008) e conseqüentemente para o desenvolvimento da AR. Embora seja considerada uma doença mediada por células T *helper* 1 (Th1), as células T *helper* 17 (Th17) também são importantes no processo de destruição articular. Essas células são responsáveis pela ativação de condrócitos e fibroblastos sinoviais (FLS), os quais possuem fenótipo proliferativo, proinflamatório e de invasão tecidual na AR (HUBER *et al.*, 2006a; MCINNES; SCHETT, 2011).

Os FLS são os principais constituintes do *pannus*, um tecido proliferativo e invasivo, bem como na produção local de citocinas, mediadores moleculares da inflamação e enzimas proteolíticas. Esses componentes, quando exacerbados na resposta inflamatória, promovem a degradação da matriz extracelular, levando à destruição da cartilagem e contribuindo para o ambiente inflamatório intra-articular (BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; LARK *et al.*, 1997).

Visando ao controle dos efeitos causados nas articulações pela ativação dos FLS, a introdução de novas terapias biológicas em meados da década de 1990 contribuiu para resultados clínicos mais satisfatórios na AR (SMOLEN, ALETAHA, MCINNES, 2016). Apesar disso, as opções terapêuticas ainda objetivam suprimir a inflamação e aliviar os sintomas da doença (ARTHRITIS FOUNDATION, 2017), sendo apenas parcialmente eficazes para a indução e manutenção da remissão, mas não para a cura da doença. Além disso, os tratamentos atuais apresentam alto custo e baixa eficácia em grande parcela dos pacientes, causando, muitas vezes, efeitos colaterais (TANAKA, 2016).

Dessa forma, novas estratégias terapêuticas para AR são necessárias para pacientes não responsivos aos tratamentos atuais. Nesse contexto, estudos

demonstram que moléculas conhecidas como produtos excretos-secretos (ESPs) liberados por helmintos possuem propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras (WANG, S. et al., 2016). Alguns estudos têm demonstrado que helmintos como o *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) atuam através da secreção dessas moléculas, sendo capazes de induzir a polarização de macrófagos para um perfil antiinflamatório em modelo experimental de AR (Yang, 2014), bem como na redução de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas IL-6, IL-17 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (LIU, F. et al., 2016).

A *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*), um helminto trematódeo, secreta componentes com as mesmas propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras do *S. mansoni*, e utiliza estratégias para regular a resposta imune de seus hospedeiros através da supressão da resposta imune via Th1 e da produção de citocinas pró-inflamatórias (CANCELA et al., 2017; DONNELLY, S. et al., 2008; KLOTZ et al., 2011). Entretanto, apesar de suas propriedades terapêuticas, os ESPs da *F. hepatica* ainda são pouco estudados, especialmente no contexto da AR. Portanto, torna-se importante o estudo *in vitro* do extrato de *F. hepatica* em FLS de pacientes com AR, visando elucidar seu potencial efeito, ou de seus componentes, como estratégia terapêutica na AR.

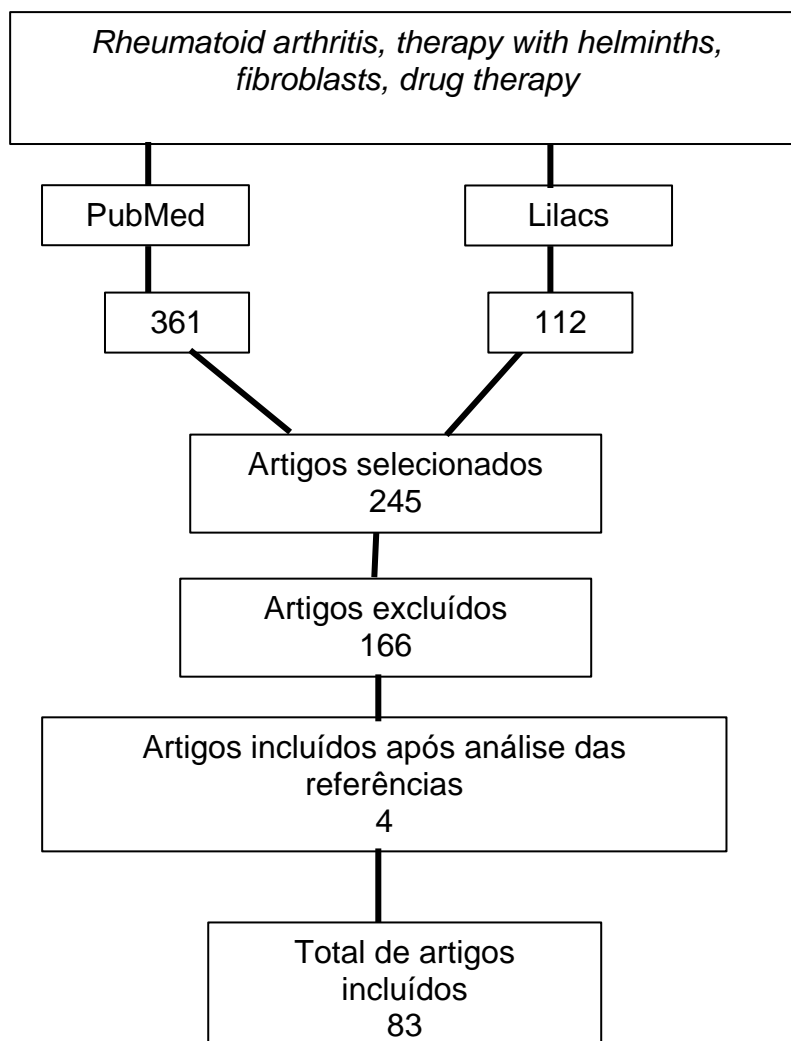
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.2 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão de literatura está focada em compilar informações epidemiológicas e sintomatológicas pertinentes à AR e principalmente aos FLS e à *F. hepatica*. Ainda, objetiva identificar os tratamentos existentes atualmente, a fim de propor uma droga inovadora que possa ser utilizada futuramente para minimizar os efeitos desta doença. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: *PubMed* e *Lilacs*. As buscas foram realizadas utilizando descritores em língua inglesa envolvendo os termos, sozinhos ou cruzados entre si: ("Therapy with Helminths"[Mesh]) OR ("Arthritis, Rheumatoid"[Mesh] AND "Fibroblasts"[Mesh] AND "Drug Therapy"[Mesh]). Foram lidos os resumos dos artigos encontrados, com posterior seleção baseada nos seguintes critérios de inclusão: abordagem de conceitos da AR, FLS e tratamentos.

Os artigos que não se incluíam nesses critérios foram excluídos. Outras fontes como os sites do Ministério da Saúde, Organização Mundial da Saúde, IBGE e Diretrizes da Sociedade Brasileira de Reumatologia também foram consultadas, com o objetivo de padronizar o conceito e demonstrar dados concretos de um panorama geral que afeta milhares de pessoas em todo o mundo. Os resultados da pesquisa estão apresentados na Figura 1.





**Figura 1.** Estratégias de busca de referências bibliográficas, através das bases de dados que fundamentam os objetivos deste projeto.

## 2.3 Artrite Reumatoide

As doenças reumáticas estão entre as mais antigas e incapacitantes na prática clínica (SANGHA, 2000; SYMMONS, 1998) e sua alta prevalência representa uma significativa causa de morbidade em países desenvolvidos, visto que há estimativas de que pelo menos 10% da população mundial seja afetada de alguma forma (FERRAZ, M B, 1995). Atualmente sabe-se que condições reumáticas ou musculoesqueléticas compreendem mais de 150 doenças e síndromes, as quais são geralmente progressivas e associadas à dor (WHO, 2018).

Entre as doenças reumáticas está a AR. A AR apresenta-se patológica e clinicamente heterogênea e é caracterizada como de caráter autoimune, crônica, sistêmica, prevalente (WHO, 2018) e incapacitante (ARTHRITIS FOUNDATION, 2017). Suas manifestações são simétricas e geralmente afetam pequenas articulações, podendo também ser poliarticular (NICE, 2018), bem como afetar tecidos conjuntivos como músculos, tendões e tecido fibroso (WHO, 2018).

Na articulação artrítica, ocorre a exacerbação da infiltração de células inflamatórias como células T CD4+, células B, macrófagos e principalmente os FLS, que possuem um papel importante no desenvolvimento da doença. Em um contexto imunológico, a AR é caracterizada pela produção e expressão de mediadores locais que ativam principalmente a via clássica de macrófagos M1 (macrófagos pró-inflamatórios), promovendo uma resposta Th1 com alta produção de citocinas pró-inflamatórias (MEI *et al.*, 2014). Como consequência dessa reação inflamatória, ocorre a hiperplasia local da membrana sinovial que reveste internamente as articulações (OKAMOTO *et al.*, 2008) e produção e ativação de enzimas degradadoras da matriz tecidual, como as metaloproteinases (MMPs) (CAWSTON, 1998). Como resultado tem-se a degradação da cartilagem e formação de erosões ósseas, levando ao dano e deformidades articulares que podem afetar até 80% dos pacientes em 1 ano de diagnóstico (GIBOFSKY, 2012).

Embora a AR seja considerada uma doença mediada por células Th1, as células Th17 também possuem papel importante na evolução da doença. Essas células agem no processo de destruição articular, na produção de IL 17 e na superexpressão do TNF- $\alpha$  que, sinergicamente, promovem a ativação de condrócitos e FLS (MCINNES; SCHETT, 2011). Esse processo de exacerbação contribui para a agressividade da doença, pois estimula a produção excessiva de osteoclastos, células que reabsorvem o osso e promovem a erosão óssea subcondral (HAYER *et al.*, 2016).

Em função dessas características, os sintomas da doença frequentemente

incluem dor, edema e rigidez nas articulações, desenvolvimento de deformidades, incapacitação física, perda de qualidade de vida e diminuição da sobrevida (ARTHRITIS FOUNDATION, 2017). Isso ocorre devido ao acometimento da sinóvia (sinovite) (LARK *et al.*, 1997).

## 2.4 Epidemiologia

Apesar dos avanços e progressos para a compreensão da fisiopatogenia da AR, sua etiologia ainda não está completamente esclarecida (KINNE *et al.*, 2000). Contudo, sabe-se que fatores genéticos (PICCOLI *et al.*, 2011), ambientais (WHO, 2018) e sistêmicos (RODRIGUES SENNA *et al.*, 2004), bem como infecções virais e bacterianas (GIBOFISKY, 2012), aspectos hormonais e tabagismo (GABRIEL, 2001) contribuem para o processo de quebra da autotolerância e o desenvolvimento de uma resposta inflamatória exacerbada e persistente (FLORES *et al.*, 2010). Esse cenário contribui para o aparecimento, desenvolvimento ou agravamento dos sintomas da AR (ARTHRITIS FOUNDATION, 2017; SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2017; SOKOLOVE, 2018; WHO, 2018).

Dados recentes indicam que a incidência anual de AR é aproximadamente 40 a cada 100.000 pessoas (SHERINE E GABRIEL, 2018) e a prevalência mundial em torno de 1% (WHO, 2018), atingindo 0,46% da população brasileira (RODRIGUES SENNA *et al.*, 2004). A AR afeta duas a três vezes mais mulheres que homens (OKROJ *et al.*, 2007) e pode se manifestar em qualquer idade, sendo o pico da doença entre 50 e 75 anos, e com piora durante o envelhecimento (SHERINE E GABRIEL, 2018). A AR é comum em pessoas que apresentam outras condições crônicas, como doenças cardíacas e diabetes (ARTHRITIS FOUNDATION, 2017).

Todas essas características associadas tornam a AR uma doença com significativo impacto econômico (ARTHRITIS FOUNDATION, 2017), incapacitando cerca de 50% dos pacientes em países desenvolvidos de manter um emprego em tempo integral dentro de 10 anos após o início da doença (WHO, 2018). Além disso, o impacto social devido à sua elevada taxa de morbimortalidade quando comparados à população em geral (MOTA, Licia Maria Henrique Da; LAURINDO; SANTOS NETO, 2010; GONZALEZ *et al.*, 2008) impacta diretamente na qualidade de vida dos pacientes afetados pela doença.

## 2.5 Fibroblastos sinoviais (FLS) na AR

Nas doenças reumáticas, como a AR, tem sido reconhecido que as células do sistema imunológico e o estroma apresentam influência na patogênese da doença. Nesse contexto, FLS são as principais células estromais da sinóvia articular, tendo um papel importante na fisiopatologia da AR (OSPELT, 2017).

A sinóvia articular está presente nas articulações sinoviais e possui o papel de revestir as cápsulas articulares e produzir o líquido sinovial (GIBOFISKY, 2012). O revestimento articular normalmente consiste de uma membrana sinovial delicada dividida em dois compartimentos anatômicos e funcionais, denominados camada íntima e camada sub-íntima. A camada íntima consiste de 1 a 3 camadas de células e é composta por dois tipos celulares em proporções relativamente iguais: tipo A ou sinoviócitos do tipo macrófagos, e tipo B, ou FLS. A sub-íntima é composta de tecido conjuntivo frouxo, irregular com ocasionais fibroblastos, macrófagos e células adiposas (BARTOK; FIRESTEIN, 2010).

Em articulações saudáveis, os FLS são responsáveis por produzir componentes de matriz extracelular, fornecer proteínas nutritivas à cavidade articular e aos tecidos circundantes e auxiliar na lubrificação articular (OSPELT, 2017). Além disso, agem no remodelamento fisiológico contínuo da matriz extracelular, através da secreção de colágenos, fibronectina e laminina, e de enzimas que degradam a matriz, como MMPs e seus inibidores (BARTOK; FIRESTEIN, 2010).

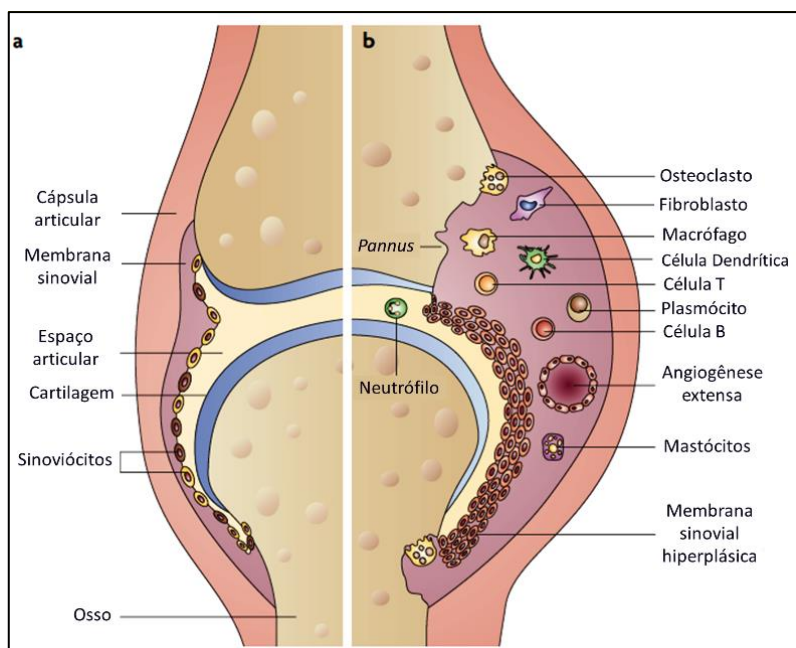
Durante o processo de adoecimento das articulações, a sinóvia é a primeira estrutura afetada (GIBOFISKY, 2012). Como característica marcante da AR, ocorre a modificação do perfil dos FLS, e a sinóvia reumatóide passa a abrigar uma população de FLS com característica agressiva, invasiva e morfológica modificada (PAP, Thomas *et al.*, 2000). Sabe-se que esse perfil está relacionado com as interações célula-matriz extracelular (AGARWAL; BRENNER, M. B., 2006), bem como com fatores solúveis, como o TGF- $\beta$  e fatores de crescimento derivado de plaquetas, que durante o processo de invasão e agressão, representam mediadores centrais da AR e contribuem para ativação, proliferação e migração dos FLS (LEFÈVRE *et al.*, 2017). Apesar desses aspectos, ainda não está claro se essas características são inerentes aos FLS presentes na AR ou se, de alguma forma, os FLS modificam seu perfil devido à exposição às citocinas no ambiente articular doente (BARTOK; FIRESTEIN, 2010). A capacidade de invadir e promover a destruição da cartilagem destaca-se como uma das principais características descritas dos FLS em pacientes com AR. Dessa forma,

tornam-se um dos principais componentes teciduais envolvidos na iniciação e perpetuação da AR, bem como do processo inflamatório destrutivo das articulações, (OSPELT, 2017; BARTOK; FIRESTEIN, 2010) a distinguindo de outras desordens inflamatórias das articulações (HUBER *et al.*, 2006).

Uma consequência crucial da ativação dos FLS é a expressão e regulação positiva de diversas moléculas de adesão que medeiam a aderência dessas células à cartilagem (PAP, Thomas *et al.*, 2000) e facilitam a fixação da sinóvia hiperplásica à superfície da cartilagem. Por sua vez, moléculas de adesão, como integrinas e caderinas, funcionam como receptores de sinalização, levando ao aumento da expressão de citocinas e MMPs na articulação (FIGURA 2) (AGARWAL; BRENNER, M. B., 2006; LEFEVRE *et al.*, 2015; LEFÈVRE *et al.*, 2009).

Esse ambiente promove a alteração de citocinas presentes na membrana sinovial, que irá apresentar altos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  (CASNICI *et al.*, 2014). Dentre essas citocinas, o TNF- $\alpha$  é a principal citocina pró-inflamatória que regula a formação de outros mediadores inflamatórios no tecido sinovial (BRZUSTEWICZ; BRYL, 2015). Destaca-se devido à suas propriedades pró-inflamatórias e imunorregulatórias, sugerindo seu envolvimento direto na patogênese da AR tanto em estudos com animais quanto em humanos (DANIŁOWICZ-LUEBERT *et al.*, 2011).

Matsuno e colaboradores (2002) demonstraram em modelo experimental de AR que a redução dos níveis de TNF- $\alpha$  está diretamente relacionada com alterações do quadro inflamatório e melhora do dano articular e ósseo em camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti TNF- $\alpha$  (MATSUNO *et al.*, 2002). Além disso, Matten e colaboradores (2017) verificaram que a produção de citocinas pró-inflamatórias diminuiu após neutralizar TNF- $\alpha$  em culturas de células sinoviais (MATEEN *et al.*, 2017). Da mesma forma, ensaios clínicos com pacientes que utilizaram terapias com anti-TNF demonstraram que sua administração diminui a inflamação da AR (NAVARRO-MILLAN, CURTIS, 2013).



**Figura 2:** Alterações articulares na Artrite Reumatoide.  
a) Articulação saudável; b) Articulação doente (Adaptado de *Smolen and Steiner, 2003*).

O influxo e a proliferação de células inflamatórias e componentes presentes na sinóvia reumatoide tem como consequência um desequilíbrio entre a proliferação, a sobrevivência e a morte das células presentes na sinóvia reumatóide. Esse desequilíbrio faz com que as células sinoviais na AR sejam caracterizadas por uma resistência à apoptose. Um dos possíveis mecanismos responsáveis por essa resistência é a presença de fatores antiapoptóticos no líquido sinovial, o que contribui para seu acúmulo no local da inflamação (CASNICI *et al.*, 2014). Com base nesse contexto, sabe-se que a modulação do sistema imune pelo mecanismo de apoptose pode ser terapêuticamente benéfica em modelos experimentais de sinovite crônica (POPE, 2002). Dessa forma, a indução de apoptose na articulação acometida pela AR poderia ser usada para obter vantagem terapêutica na doença (RABINOVICH, 2000).

Entretanto, a aplicação terapêutica da apoptose mediada por ligante Fas (molécula envolvida na regulação de morte celular) na AR tem sido limitada por sua toxicidade letal para o fígado (ICHIKAWA, *et al.*, 2003). Ainda, considerando que apoptose atua na preservação da homeostase de células T, regulando o tempo e a duração das respostas imunes, a morte de uma população de células inflamatórias poderia ocasionar em um desbalanço da resposta imune (RABINOVICH, 2000). Portanto, é importante considerar que ausência de especificidade de algumas drogas e a eliminação seletiva de uma subpopulação de células como os FLS poderia afetar outras células da sinóvia e também acarretar o aparecimento de outras doenças

(GREEN, KROEMER, 2005).

Como consequência da inflamação, a espessura da membrana sinovial aumenta para 10-15 camadas de células (BARTOK; FIRESTEIN, 2010). Esse desbalanço contribui para progressão da doença, evidenciando hiperplasia sinovial e a formação do *pannus*, um tecido invasivo da cartilagem e do osso subcondral que promove a degradação articular (BOTTINI; FIRESTEIN, 2013; LARK *et al.*, 1997; LEFEVRE *et al.*, 2015).

Portanto, pode-se afirmar que os FLS estão envolvidos em vias relevantes do processo da AR e são um dos principais contribuintes para o processo de degradação articular. Devido a isso, seu papel funcional na modulação das respostas inflamatórias e autoimunes nas articulações artríticas deve ser mais explorado (KONTOYIANNIS; KOLLIAS, 2000). A cultura de FLS *in vitro* se apresenta como uma ferramenta eficaz para elucidar esse processo. Sabe-se que o fenótipo dos FLS é mantido quando cultivado *in vitro* e se correlaciona com o dano histológico da articulação em ratos (LARAGIONE *et al.*, 2008) e com a destruição radiológica da articulação de pacientes com AR (TOLBOOM *et al.*, 2005). Dessa forma, constituem um alvo importante para novas abordagens terapêuticas que objetivem inibir a destruição da cartilagem e do osso na AR (HUBER *et al.*, 2006b).

### **2.5.1 Interação dos FLS da AR com outros tipos celulares**

Além da presença dos FLS, a membrana sinovial apresenta outros tipos celulares, exercendo efeitos específicos sobre elas e contribuindo assim para o processo de desencadeamento da doença (FRANZ *et al.*, 1998). Dentre os tipos celulares existentes no tecido sinovial, os macrófagos sinoviais (sinoviócitos tipo A) residentes, por exemplo, interagem intimamente com os FLS nesse processo (OSPELT, 2017). Os monócitos são encontrados no revestimento íntimo e sub-íntimo dos tecidos sinoviais sob condições saudáveis (BARTOK, 2017; (KIENER *et al.*, 2010). Após a ativação dos tecidos sinoviais durante a inflamação, a angiogênese e o recrutamento de quimiocinas ativam o influxo de monócitos periféricos para a sinóvia, que são recrutados da circulação, tornando-se macrófagos derivados de monócitos (OSPELT, 2017; YOSHITOMI, 2019).

Os FLS também interagem com células T auxiliares CD4 +, pois agem na diferenciação de células T através da produção de citocinas, como por exemplo, da família TGF- $\beta$ . Outro aspecto importante relacionado, é que embora os FLS não sejam

células imunes primárias, expressam genes relacionados à imunidade, incluindo o HLA Classe II, necessário para apresentar antígenos às células T CD4 + auxiliaadoras durante o desenvolvimento da AR (YOSHITOMI, 2019).

Quanto ao envolvimento de células da resposta imune adaptada, além das células T CD4 +, sabe-se que células B também interagem com os FLS (SCHELLEKENS et al., 2000), destacando aqui que a comunicação entre os FLS presentes na membrana e células imunes hematopoiéticas está relacionada com a produção local de autoanticorpos na sinóvia da AR (YOSHITOMI, 2019). A presença e a relevância clínica de autoanticorpos característicos da AR, como o fator reumatoide e anticorpos anti-peptídeos citrulinados, indicam o envolvimento de células B nesse processo (SCHELLEKENS et al., 2000). A produção desses autoanticorpos pode ocorrer na sinóvia (DOORENSPLEET et al., 2014), o que indica que o ambiente sinovial local é o principal contribuinte para o desenvolvimento e maturação das células B produtoras de autoanticorpos (YOSHITOMI, 2019).

### **2.5.2 Morfologia e Fenótipo dos FLS *in vitro***

Apesar da presença de diferentes tipos celulares, na sinóvia são encontradas majoritariamente populações de macrófagos e FLS. Entretanto, as populações de FLS são heterogêneas, pois existem diferentes subtipos dessa célula (OSPELT, 2017). Sabe-se que FLS em diferentes culturas *in vitro* apresentam um fenótipo distinto em relação a diversos aspectos, principalmente quanto à morfologia, estrutura, e proteínas de superfície (ROSENGREN; BOYLE; FIRESTEIN, 2007), que também estão relacionados ao local de onde são isolados (OSPELT, 2017).

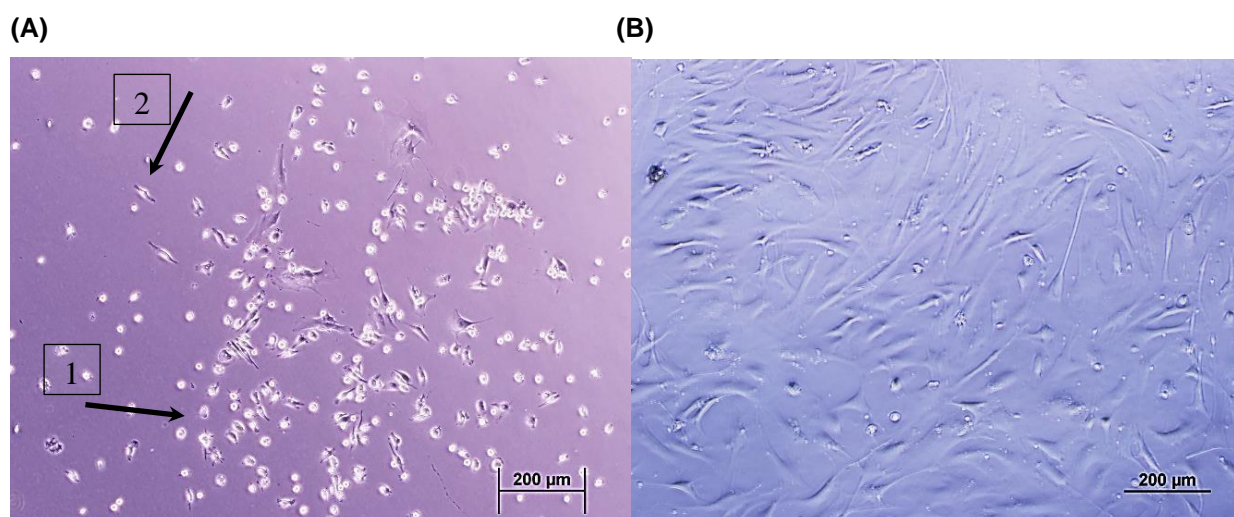
Em relação aos fenótipos de superfície, sabe-se que CD55 (*Decay-accelerating factor*) é expresso por FLS na camada de revestimento íntima da sinóvia, e o CD90 (*Thy-1 membrane glycoprotein*) é altamente expresso na camada sub-íntima, sendo estes de primordial importância na manutenção e ampliação da inflamação sinovial que ocorre na AR (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; DENNIS et al., 2014). Uma caracterização adicional dos diferentes subtipos de FLS pode esclarecer sobre qual tipo de FLS conduz à destruição e seu sítio anatômico (OSPELT, 2017). Considerando a heterogeneidade celular da sinóvia, associado à esses marcadores de FLS, o tecido sinovial também apresenta expressão de CD68 (marcador de macrófagos); entretanto, sua presença deve ser identificada em baixas concentrações nas culturas, após a 5ª. passagem (MANFERDINI et al., 2016).

Quanto às diferenças morfológicas, os FLS da camada íntima diferem



substancialmente dos FLS da camada sub-íntima quando acometidos pela doença, e ambos diferem dos FLS presentes no tecido sinovial normal. Essas diferenças são vistas tanto biologicamente quanto a nível morfológico, apresentando formato mais arredondado, núcleo grande e pálido com nucléolos proeminentes, caracterizando assim, o fenótipo agressivo e invasivo dos FLS na AR (PAP, Thomas *et al.*, 2000).

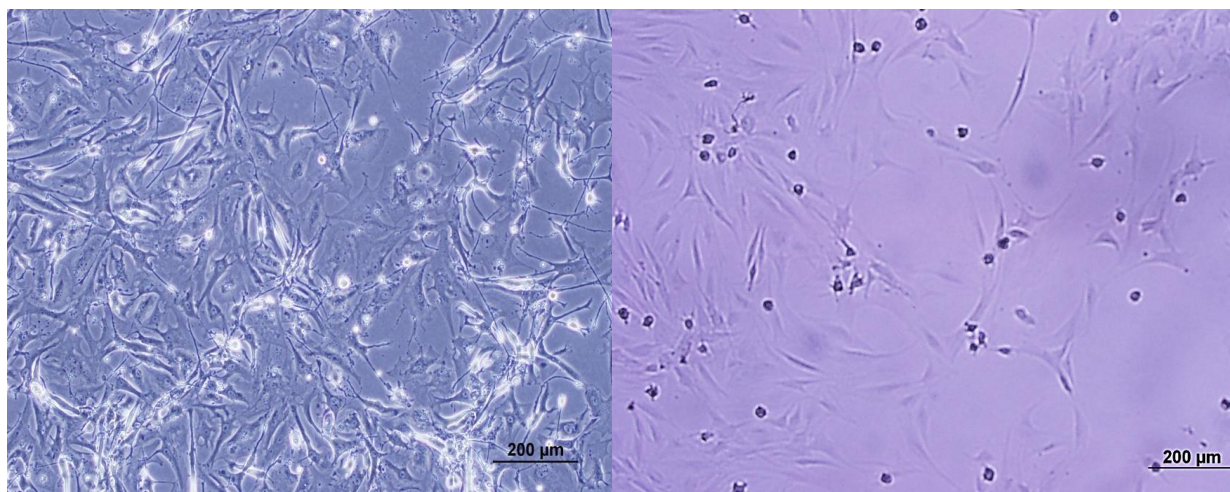
No início do processo de isolamento das células do líquido sinovial, em cultura celular *in vitro*, é possível observar duas populações celulares: FLS e macrófagos (FIGURA 3A). Os FLS podem ser isolados do tecido sinovial e cultivados em cultura por longos períodos de tempo, enquanto os macrófagos sinoviais são diferenciados e raramente sobrevivem mais do que algumas semanas em cultura (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; ZHAO *et al.*, 2016). Ao decorrer das passagens, é possível observar apenas a presença de FLS (FIGURA 3B), que apresentam sob microscopia óptica formato fusiforme característico da morfologia da célula.



**Figura 3: Cultura de FLS. (A)** Estágio inicial do isolamento (passagem 0) de FLS do líquido sinovial de pacientes com AR. Seta 1: células de formato arredondado sugerem população de macrófagos. Seta 2: células de formato alongado sugerem população de FLS (10x). **(B)** Cultura de FLS após 5 passagens (10x): População de FLS mais confluenta e ausência de macrófagos. Foto: Autor

(A)

(B)



**Figura 4: Morfologia dos FLS.** As imagens A e B representam culturas de FLS de pacientes diferentes na mesma passagem da cultura (P5). É possível perceber a heterogeneidade entre a morfologia e a confluência dos FLS.

## 2.7 Tratamentos disponíveis

Visto que atualmente não há cura para a AR, os tratamentos disponíveis têm o objetivo de suprimir a inflamação e aliviar os sintomas provocados, prevenindo o dano articular, melhorando a função articular e reduzindo complicações a longo prazo (ARTHRITIS FOUNDATION, 2017). A terapia medicamentosa, aliada às terapias complementares com abordagem multiprofissional, também é evidenciada no manejo dos pacientes com AR (HAZZ, 2008; NCCIH, 2016; NICE, 2018).

Entre as opções medicamentosas existentes, destacam-se as drogas modificadoras do curso da AR (DMARDs) consideradas bases do tratamento, incluindo o Metotrexato (um dos medicamentos mais comuns utilizados no tratamento da AR), Leflunomida, Sulfasalazina e Hidroxicloroquina (NATIONAL RHEUMATOID ARTHRITIS SOCIETY, 2010). Além destes, anti-inflamatórios esteroides (corticosteroides) e não esteroides, como inibidores da ciclo-oxigenase também têm papel adjuvante na terapia da AR (NATIONAL RHEUMATOID ARTHRITIS SOCIETY, 2010; SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA, 2017).

A introdução de novas terapias biológicas nos anos 90 que agem na inibição de citocinas próinflamatórias, como o TNF, IL-6 e IL-1, passaram a compor as opções terapêuticas das DMARDs (ARTHRITIS FOUNDATION, 2017; NATIONAL RHEUMATOID ARTHRITIS SOCIETY, 2010). Esses novos fármacos, muitas vezes utilizados em associação com DMARDs (“Rheumatoid arthritis - Treatment - NHS”, 2018) promoveram uma melhora nos resultados clínicos de pacientes com AR. Entretanto, a redução da inflamação e a destruição da cartilagem ainda são vistas em

apenas metade dos pacientes tratados (FIRESTEIN, 2003).

Apesar dos avanços farmacológicos, as opções terapêuticas ainda visam suprimir a inflamação e aliviar os sintomas sendo eficazes para a indução e manutenção da remissão (TANAKA, 2016), mas não na recidiva ou reativação da doença. Outros aspectos como a eficácia limitada e os efeitos colaterais adversos destacam a necessidade de tratamentos alternativos para AR (MATISZ *et al.*, 2011). Assim, têm surgido novas percepções terapêuticas, com o intuito de tentar esclarecer o aspecto da cronicidade da sinovite provocada pela AR (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

Nesse sentido, proteínas secretadas por parasitas surgem como uma nova abordagem terapêutica e têm sido estudadas atualmente como terapia para doenças inflamatórias e autoimunes por apresentarem um potencial imunomodulatório e antiinflamatório (LANGDON *et al.*, 2019). Portanto, o estudo e a caracterização de novas moléculas imunomoduladoras encontradas em produtos liberados por helmintos e seu uso como potencial terapia para doenças inflamatórias e autoimunes são abordagens interessantes e relevantes para a busca de novos tratamentos para AR.

## 2.8 Helmintos

Os helmintos são organismos multicelulares que podem ser de vida livre ou parasitária (COOKE *et al.*, 2017). Dados epidemiológicos demonstram que a supressão desse contato devido à melhora da higiene ao longo dos anos se relaciona com a aumento de doenças autoimunes e alérgicas (JACKSON *et al.*, 2009). Ainda, é possível observar um aumento constante na incidência de distúrbios imunorregulatórios em diversos países (BACH, 2002), o que está diretamente relacionado com a “hipótese da higiene” (*hygiene hypothesis*), mais recentemente conhecida como “hipótese dos velhos amigos” (*old friends hypothesis*). A hipótese original sugere que havia uma ligação entre a diminuição da carga patogênica e o desenvolvimento de distúrbios imunorregulatórios (BACH, 2002). Isso confirma a relação da ausência do papel imunomodulatório que os helmintos têm quando parasitam o organismo (JACKSON *et al.*, 2009), capaz de modular a resposta imune do hospedeiro, induzindo tolerância imunológica (SIPAHI; BAPTISTA, 2017) e gerando uma resposta imune Th2 com a secreção de citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (COOKE *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas, dados sobre o papel regulatório do sistema imune por

parasitas foram evidenciados em doenças autoimunes, como a AR (OLIVEIRA *et al.*, 2017; PAULA MONTEIRO GOMIDES *et al.*, 2017; SIPAHI; BAPTISTA, 2017), a esclerose múltipla (CORREALE; FAREZ, 2007), em doenças inflamatórias intestinais como doença de Crohn (SUMMERS, R W *et al.*, 2005; MARUSZEWSKA-CHERUIYOT; DONSKOW-ŁYSONIEWSKA; DOLIGALSKA, 2018) e colite ulcerativa (SUMMERS, Robert W *et al.*, 2005), doença celíaca (SIPAHI; BAPTISTA, 2017), diabetes tipo 1 (SAUNDERS *et al.*, 2007) e alergias (HELMBY, 2015).

O papel antiinflamatório e terapêutico de produtos excretores-secretóres (ESPs) dos helmintos tem sido evidenciado em modelos experimentais de colite (WANG, S. *et al.*, 2016), sepse (LI, H. *et al.*, 2017) e artrite induzida por colágeno (CIA) (LIU, F. *et al.*, 2016), através do helminto *Schistosoma japonicum* (*S. japonicum*). Yang e colaboradores demonstraram a capacidade das cistatinas presentes nesses produtos promoverem a polarização de macrófagos M1 (pro-inflamatórios) para o perfil M2 (antiinflamatório) em modelos de doenças inflamatórias. O mesmo ocorreu no estudo Liu e colaboradores, no qual evidenciaram que a administração profilática dessas cistatinas foi capaz de atenuar o escore clínico e histopatológico da artrite experimental, prevenindo a destruição da cartilagem e a inflamação das articulações, bem como a diminuição das citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-17 e TNF- $\alpha$ .

Visto as propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias de ESPs por helmintos, atualmente a *F. Hepatica* tem recebido atenção como nova terapia alternativa para o tratamento de diversas doenças. Entretanto, até o momento, há poucos estudos na literatura que avaliem sua ação *in vitro* e *in vivo*, principalmente em para o tratamento da AR.

## **2.9 Fasciola hepatica**

Dentre os helmintos com propriedades imunomodulatórias, destaca-se a *F. Hepatica*, um parasita trematódeo (TALAMINI *et al.*, 2014) agente causador da fasciolose, considerada pela Organização Mundial da Saúde uma doença emergente (WHO, 2018) de alta prevalência e de alto impacto na agricultura e economia. Entretanto, apesar desse impacto, a *F. hepatica* possui qualidades terapêuticas do ponto de vista imunológico.

O tegumento que recobre esse parasita é formado por uma camada rica em inclusões secretoras e limitado externamente por uma membrana plasmática com glicocálix denso (ABATH; WERKHAUSER, 1996; HAMILTON *et al.*, 2009). A interação com as células do sistema imune do hospedeiro ocorre a partir da liberação constante do tegumento (KHAZNADJI *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2011), sendo esse a principal

interface entre os parasitas e seus hospedeiros (CROMPTON, 2000) e essencial para a sua sobrevivência (SMALLWOOD *et al.*, 2017). A partir do tegumento, a *F. hepatica* secreta uma combinação abundante de proteínas, carboidratos e lipídios, conhecidos como produtos excretores-secretorios (ESPs) (LIGHTOWLERS; RICKARD, 1988) (HAMILTON *et al.*, 2009; WANG, S. *et al.*, 2016; HELMBY, 2015). Entre esses produtos secretados estão moléculas com propriedades imunomoduladoras como as cistatinas. Estas estão envolvidas em processos imunológicos e desempenham um papel importante na modulação da resposta imune do hospedeiro (MEI *et al.*, 2014), como a capacidade de apresentar antígenos e regular citocinas inflamatórias (KLOTZ *et al.*, 2011; VRAY; HARTMANN, S; HOEBEKE, 2002) o que leva a uma redução da resposta de células T (HARTMANN, S; LUCIUS, 2003). Além disso, as cistatinas são inibidoras de cisteíno-proteases. As cisteíno-proteases, especialmente as catepsinas, são os principais componentes dos ESPs (COLLINS *et al.*, 2004; O'NEILL, S M; MILLS; DALTON, J P, 2001) e são imprescindíveis na geração de resposta inflamatória (NATIONAL RHEUMATOID ARTHRITIS SOCIETY, 2010), bem como no desenvolvimento e progressão da destruição articular nos pacientes com AR (PAP, Thomas *et al.*, 2000; POŽGAN *et al.*, 2010). Estudos apontam a catepsina B e L como fortemente expressas em FLS, evidenciando sua capacidade de regular seu perfil de migração e invasão (MULLER-LADNER, Ulf *et al.*, 1996; TONG *et al.*, 2014). Ainda, as catepsinas contribuem para o que o FLS mantenha seu fenótipo invasivo independente da presença de células T, corroborando com as afirmações de que essas vias possuem um papel significativo na destruição articular (HUBER *et al.*, 2006a; MÜLLER-LADNER, U *et al.*, 1996).

A presença dos componentes imunomodulatórios do tegumento explica o papel da *F. hepatica* na regulação da resposta imune do hospedeiro, manipulando-a a seu favor (KLOTZ *et al.*, 2011). Isso permite que os parasitas sejam capazes de modificar e adaptar seu ciclo biológico para evadir ao ataque do sistema imunológico, garantir sua sobrevivência e permanecer no hospedeiro (CANCELA *et al.*, 2017) (FIGURA 5).

A maioria das doenças autoimunes, como a AR, envolve a hiperreatividade dos tipos celulares Th1 e Th17 (MCSORLEY; HEWITSON; MAIZELS, 2013). Logo, a supressão dessas vias é um aspecto importante envolvido no estudo dessas moléculas. Os antígenos presentes no tegumento da *F. hepatica* já demonstraram efetividade na supressão da via Th17 (MCSORLEY; HEWITSON; MAIZELS, 2013) e da via Th1 em estudos *in vivo* e *in vitro* por inibir a capacidade dos mastócitos em desencadear a resposta imune Th1 e por suprimir citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e

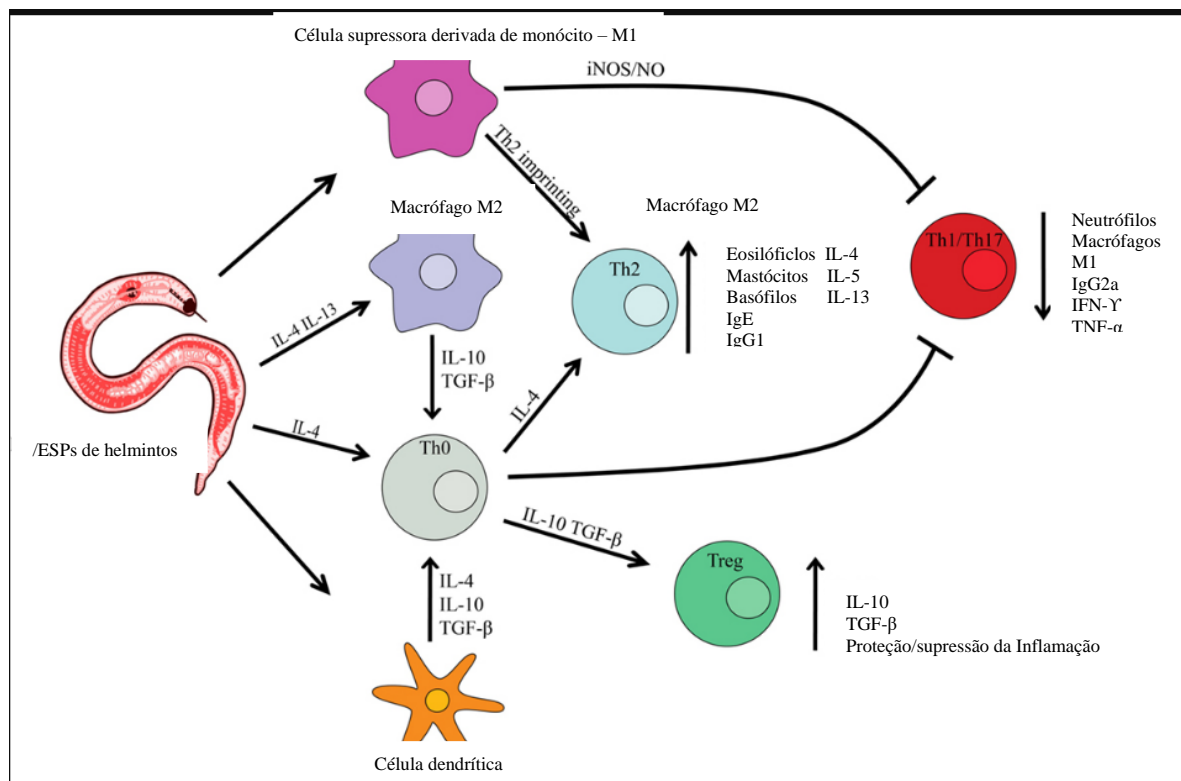
IFN- $\gamma$  (MAURER et al., 2013). A mesma redução dos níveis de citocinas foi citada em outro estudo com modelo experimental de choque séptico através da administração da preparação de antígenos presentes tegumento da *F. hepatica* (HAMILTON et al., 2009). Outro aspecto importante durante as infecções por helmintos é a modulação do fenótipo de resposta imune Th2/Treg que inclui a ativação alternativa de macrófagos (BAŞKA et al., 2017). Essa via é fundamental para promover a resposta Th2 na tentativa de suprimir os efeitos causados por doenças inflamatórias ativadas pela via Th1, como é o caso da AR (DONNELLY, S. et al., 2008). Nesse contexto, estudos *in vitro* sugerem que as respostas Th2 induzidas pela *F. hepatica* são mediadas pela secreção das moléculas do tegumento, o que aparentemente induz o recrutamento da ativação alternativa dessa via de macrófagos (DONNELLY, S. et al., 2005).

Devido à sua ação imunomoduladora, o extrato da *F. hepatica* também apresenta o potencial de inibir a ativação de células dendríticas (CD) induzida por receptores *Toll-like* (TLRs), os quais parecem ser a chave de reconhecimento do sistema imune inato no estágio inicial de ativação sinovial (HUBER, 2006). O bloqueio da capacidade de CD iniciarem a resposta Th1, tornando-as hiporresponsivas à ativação de TLR, promove a supressão de citocinas inflamatórias e moléculas coestimulatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  e IL-10, importantes na condução de respostas imunes adaptativas (RAVIDÀ et al., 2016) (MAURER et al., 2013). Isso resulta na incapacidade da célula apresentadora de antígeno ativar células T CD4 e desencadear resposta imune (MEI et al., 2014). Além disso, Guasconi e colaboradores demonstraram que a *F. hepatica* foi capaz de induzir apoptose *in vitro* de eosinófilos e macrófagos, células importantes na resposta imune desenvolvida durante as infecções por helmintos.

Apesar dos estudos encontrados na literatura evidenciarem o uso da *F. hepatica* e suas cistatinas em modelos experimentais e *in vitro*, ainda há pouca informação sobre o efeito dos produtos liberados por esse helminto em células do sistema imunológico. Ainda, para nosso conhecimento, não há nenhum estudo na literatura que aborde o efeito das propriedades do extrato de *F. hepatica* em cultura primária de FLS de pacientes com AR.

O extrato da *F. hepatica* é produzido através da homogeneização dos parasitas com PBS em um moedor, sonicador e, após centrifugação, o sobrenadante é armazenado a -80 ° C até o uso (CANCELA et al., 2004). Dessa forma, o extrato do helminto possui todos os componentes dos ESPs, e a ação desses sobre os FLS poderia contribuir para diminuição do seu fenótipo invasivo e agressivo *in vitro*. Portanto, o potencial imunomodulatório do extrato de *F. hepatica* e suas moléculas

imunossupressoras pode representar novas possibilidades terapêuticas para doenças imunoinflamatórias crônicas, como a AR (LANGDON *et al.*, 2019).



**Figura 5:** Mecanismos envolvidos na modificação da resposta imune pelos helmintos. (Adaptada de Smallwood *et al.*, 2017).

### 3. MARCO CONCEITUAL

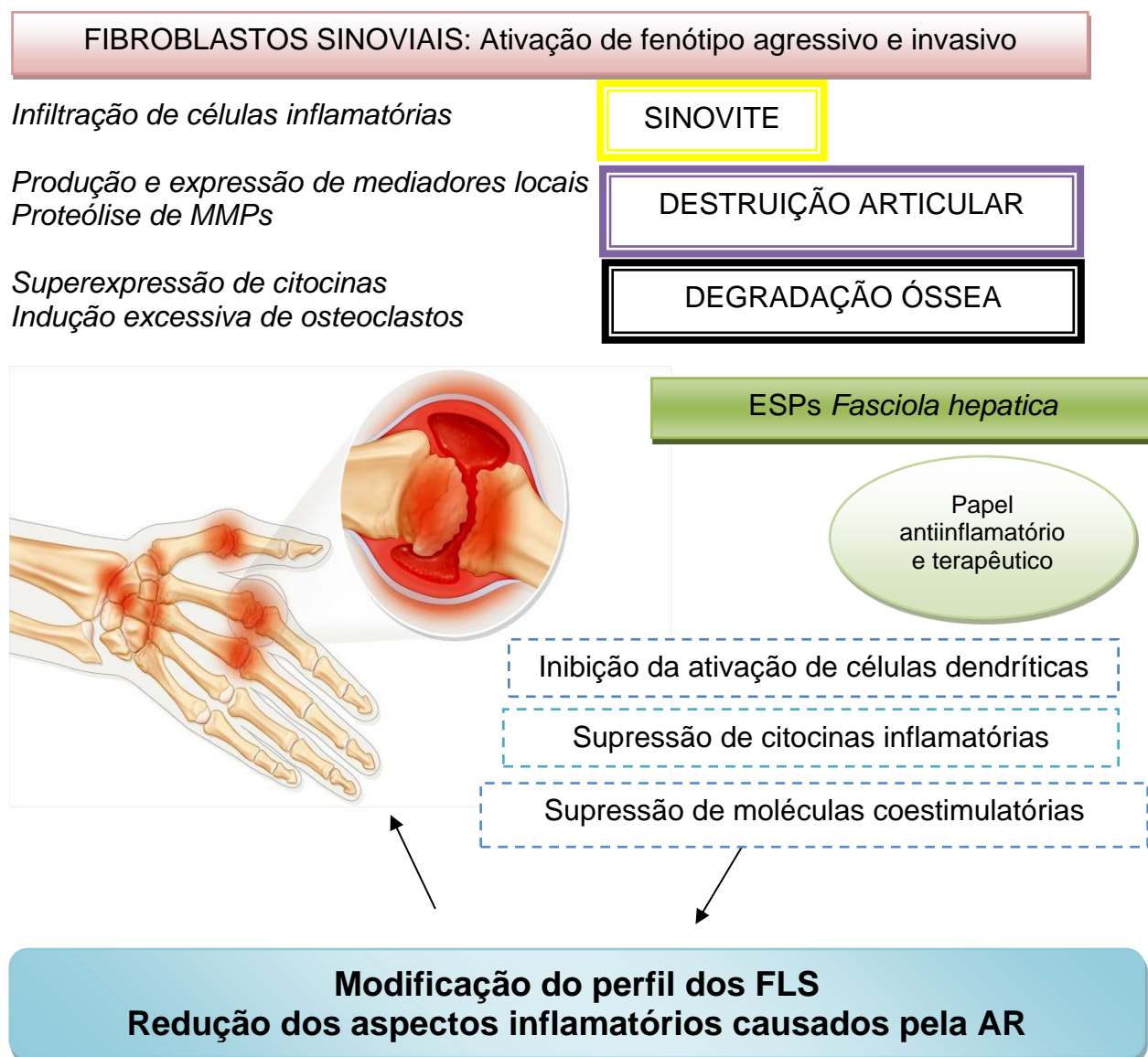


Figura 6: Marco conceitual da Artrite Reumatoide



#### 4. JUSTIFICATIVA

Atualmente, não existe cura para a AR e os tratamentos medicamentosos ainda não determinam uma melhora clínica em grande parcela dos pacientes, além de estarem associados a efeitos colaterais e altos custos. Considerando que a AR é uma doença crônica, com deterioração progressiva da capacidade física e que impacta negativamente na qualidade de vida dos pacientes, é imprescindível a busca de novos tratamentos que visam à remissão ou prevenção da evolução da doença. A *Fasciola hepatica* é um helminto que libera produtos excretorios-secretorios através de seu tegumento, o qual possui componentes com propriedades imunomoduladoras capazes de suprimir a resposta imune Th1 e a produção de citocinas inflamatórias. O potencial imunomodulatório do extrato desse helminto e de suas moléculas imunossupressoras poderiam agir no mecanismo da patologia da AR, possibilitando, assim, o desenvolvimento de novas terapias. Somado a isso, os fibroblastos sinoviais (FLS) são as principais células estromais da sinóvia articular e apresentam um perfil agressivo e invasivo em pacientes com AR e por essa razão constituem um alvo importante para o estudo de novas abordagens terapêuticas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* o efeito do extrato da *Fasciola hepatica* em fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide.

### 5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfolologicamente e imunofenotipicamente as culturas de fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide;
- Avaliar *in vitro* o efeito do extrato de *Fasciola hepatica* em fibroblastos sinoviais através dos ensaios de:
  - Viabilidade celular (MTT)
  - Morfologia nuclear (Image J- *Nuclear morphology index* - NMI)
  - Apoptose/Necrose (Anexina V- Iodeto de Propídio)
  - Aderência celular
  - Migração (*Wound Healing*)
  - Invasão celular (*Chambers*)
  - TNF $\alpha$  (ELISA)

## Referências

BACH, J. F. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *New England Journal of Medicine*.

BRZUSTEWICZ, E.; BRYL, E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis - Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy, Academic Press, 2015.

CANCELA, M. *et al.* Purification, characterization, and immunolocalization of paramyosin from the adult stage of *Fasciola hepatica*. *Parasitology research*, abr. 2004. v. 92, n. 6, p. 441–8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963769>>. Acesso em: 17 set. 2019.

CASNICI, C. *et al.* Optimized “in vitro” culture conditions for human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mediators of inflammation*, 4 nov. 2014. v. 2014, p. 702057. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25548436>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

COLLINS, P. R. *et al.* Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke (*Fasciola hepatica*) virulence: Propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gastrodermal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 23 abr. 2004. v. 279, n. 17, p. 17038–17046.

COOKE, A. *et al.* Helminth immunomodulation in Autoimmune Disease. Article, 2017. v. 8, p. 1. Disponível em: <[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)>.

CROMPTON, D. W. The public health importance of hookworm disease. *Parasitology*, 2000. v. 121 Suppl, p. S39-50. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11386690>>. Acesso em: 25 ago. 2019.

DANIŁOWICZ-LUEBERT, E. *et al.* Modulation of specific and allergy-related immune responses by helminths. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

DENNIS, G. *et al.* Synovial phenotypes in rheumatoid arthritis correlate with response to biologic therapeutics. *Arthritis Research and Therapy*, [s. l.], v. 16, n. 2, 2014.

DONNELLY, S. *et al.* Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *The FASEB Journal*, nov. 2008. v. 22, n. 11, p. 4022–4032. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708590>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

DOORENSPLEET, M. E. *et al.* Rheumatoid arthritis synovial tissue harbours dominant B-cell and plasma-cell clones associated with autoreactivity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 756–762, 2014.

FLORES, D. G. *et al.* Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. *Brain research bulletin*, 29 abr. 2010. v. 82, n. 1–2, p. 95–8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211708>>. Acesso em: 7 ago. 2019.

FRANZ, J. K. *et al.* T cell-independent joint destruction. In: *T Cells in Arthritis*. [s.l.] : Birkhäuser Basel, 1998. p. 55–74.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: Clinical applications in sight?, 2005.

GABRIEL, S. E. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 2001.

GIBOFSKY, A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *The American journal of managed care*, dez. 2012. v. 18, n. 13 Suppl, p. S295-302. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23327517>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

GONZALEZ, A. *et al.* Mortality trends in rheumatoid arthritis: the role of rheumatoid factor. *The Journal of rheumatology*, jun. 2008. v. 35, n. 6, p. 1009–14. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18412312>>. Acesso em: 18 ago. 2019.

GUASCONI, L.; SERRADELL, M. C.; MASI, D. T. Fasciola hepatica products induce apoptosis of peritoneal macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, ago. 2012. v. 148, n. 3–4, p. 359–363.

HELMBY, H. Human helminth therapy to treat inflammatory disorders- where do we stand? *BMC Immunology*.

LANGDON, K. *et al.* Helminth-based therapies for rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *International Immunopharmacology*.

LEFÈVRE, S. *et al.* Disease-Specific Effects of Matrix and Growth Factors on Adhesion and Migration of Rheumatoid Synovial Fibroblasts. *The Journal of Immunology*, 15 jun. 2017. v. 198, n. 12, p. 4588–4595.

LI, H. *et al.* Therapeutic effect of *Schistosoma japonicum* cystatin on bacterial sepsis in mice. *Parasites & vectors*, 8 maio. 2017. v. 10, n. 1, p. 222. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28482922>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

MARUSZEWSKA-CHERUIYOT, M.; DONSKOW-ŁYSONIEWSKA, K.; DOLIGALSKA, M. Review Helminth therapy: Advances in the use of parasitic worms against Inflammatory Bowel Diseases and its challenges. *HELMINTHOLOGIA*, 2018. v. 55, p. 1–11.

MATISZ, C. E. *et al.* Helminth parasites and the modulation of joint inflammation. *Journal of Parasitology Research*.

MCSORLEY, H. J.; HEWITSON, J. P.; MAIZELS, R. M. Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *International Journal for Parasitology*, 1 mar. 2013. v. 43, n. 3–4, p. 301–310. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751912003165>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

MELO CRUVINEL, W. DE *et al.* Células T Regulatórias Naturais (T REGS) em Doenças Reumáticas Natural Regulatory T cells in Rheumatic Diseases. [S.l.]: [s.n.], 2008.

NICE. Rheumatoid arthritis in adults: management | Guidance and guidelines | NICE. 2018. Disponível em: <<https://www.nice.org.uk/guidance/cg79/chapter/Recommendations#pharmacological-management>>. Acesso em: 2 mar. 2018.

O'NEILL, S M; MILLS, K. H.; DALTON, J P. Fasciola hepatica cathepsin L cysteine proteinase suppresses Bordetella pertussis-specific interferon-gamma production in

vivo. *Parasite immunology*, out. 2001. v. 23, n. 10, p. 541–7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696165>>. Acesso em: 20 ago. 2019.

OSPELT, C. Synovial fibroblasts in 2017. *RMD Open*.

RAVIDÀ, A. *et al.* Fasciola hepatica Surface Tegument: Glycoproteins at the Interface of Parasite and Host. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2016. v. 15, n. 10, p. 3139–3153.

Rheumatoid arthritis - Treatment - NHS. [S.l.], 2018. Disponível em: <<https://www.nhs.uk/conditions/rheumatoid-arthritis/treatment/>>. Acesso em: 25 ago. 2019.

SIPAHI, A. M.; BAPTISTA, D. M. Helminths as an alternative therapy for intestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited.

SMALLWOOD, T. B. *et al.* Helminth immunomodulation in autoimmune disease. *Frontiers in Immunology*. Frontiers Research Foundation.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, 22 out. 2016. v. 388, n. 10055, p. 2023–2038. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616301738>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

ZHAO, J. *et al.* A protocol for the culture and isolation of Murine synovial fibroblasts. *Biomedical Reports*, 1 ago. 2016. v. 5, n. 2, p. 171–175.

ABATH, F. G. C.; WERKHAUSER, R. C. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite Immunology*, Jan. 1996. v. 18, n. 1, p. 15–20. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-6.x>>. Acesso em: 3rd mar. 2018.

AGARWAL, S. K.; BRENNER, M. B. Role of adhesion molecules in synovial inflammation. *Current Opinion in Rheumatology*, May. 2006. v. 18, n. 3, p. 268–276. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16582691>>. Acesso em: 22nd feb. 2019.

ARTHRITIS FOUNDATION. What Is Arthritis? [S.l.], 2017. Disponível em: <<https://www.arthritis.org/about-arthritis/understanding-arthritis/what-is-arthritis.php>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunological Reviews*, Jan. 2010. v. 233, n. 1, p. 233–255. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20193003>>. Acesso em: 15th mar. 2018.

BAŞKA, P. *et al.* Excretory/secretory products from two *Fasciola hepatica* isolates induce different transcriptional changes and IL-10 release in LPS-activated bovine “BOMA” macrophages. *Parasitology Research*, 19 Oct. 2017. v. 116, n. 10, p. 2775–2782. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00436-017-5588-6>>. Acesso em: 19th feb. 2019.

BOTTINI, N.; FIRESTEIN, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nature reviews. Rheumatology*, Jan. 2013. v. 9, n. 1, p. 24–33. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23147896>>.

Acesso em: 15th mar. 2018.

CANCELA, M. *et al.* Functional characterization of single-domain cystatin-like cysteine proteinase inhibitors expressed by the trematode *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, Nov. 2017. v. 144, n. 13, p. 1695–1707.

CASNICI, C. *et al.* Optimized “in vitro” culture conditions for human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mediators of inflammation*, 4 Nov. 2014. v. 2014, p. 702057. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25548436>>. Acesso em: 19th feb. 2019.

CAWSTON, T. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Molecular medicine today*, Mar. 1998. v. 4, n. 3, p. 130–7. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9575496>>. Acesso em: 12th jul. 2018.

CORREALE, J.; FAREZ, M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, Feb. 2007. v. 61, n. 2, p. 97–108. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.21067>>. Acesso em: 7th jul. 2018.

DALTON, J. P. *et al.* *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International journal for parasitology*, 30 Sep. 2003. v. 33, n. 11, p. 1173–81. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678633>>. Acesso em: 19th feb. 2019.

DONNELLY, S. *et al.* Thioredoxin Peroxidase Secreted by *Fasciola hepatica* Induces the Alternative Activation of Macrophages. *Infection and Immunity*, 1 Jan. 2005. v. 73, n. 1, p. 166–173. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15618151>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

DONNELLY, S. *et al.* Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *The FASEB Journal*, Nov. 2008. v. 22, n. 11, p. 4022–4032. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18708590>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

FERRAZ, M. B. Tropical rheumatology. *Epidemiology and community studies: Latin America*. Bailliere’s clinical rheumatology, Feb. 1995. v. 9, n. 1, p. 1–9. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7728872>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 15 May. 2003. v. 423, n. 6937, p. 356–361. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12748655>>. Acesso em: 7th jul. 2018.

HAMILTON, C. M. *et al.* The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infection and immunity*, Jun. 2009. v. 77, n. 6, p. 2488–98.

HARTMANN, S.; LUCIUS, R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *International journal for parasitology*, 30 Sep. 2003. v. 33, n. 11, p. 1291–302. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13678644>>. Acesso em: 19th feb. 2019.

HAYER, S. *et al.* Cartilage damage and bone erosion are more prominent determinants of functional impairment in longstanding experimental arthritis than synovial inflammation. *Disease models & mechanisms*, 2016. v. 9, n. 11, p. 1329–1338. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27638666>>. Acesso em:

12th jul. 2018.

HAZZ, S. Rheumatoid Arthritis : Complementary and Alternative Medicine Options. [S.l.], 2008. Disponível em: <<https://www.hopkinsarthritis.org/patient-corner/disease-management/ra-complementary-alternative-medicine/>>. Acesso em: 12th jul. 2018.

HUBER, L. C. *et al.* Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 1 Jun. 2006a. v. 45, n. 6, p. 669–675. Disponível em: <<http://academic.oup.com/rheumatology/article/45/6/669/1785125/Synovial-fibroblasts-key-players-in-rheumatoid>>. Acesso em: 19th feb. 2019.

ICHIKAWA, K. *et al.* TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2003 Jul 15;171(2):1061-9.

JACKSON, J. A. *et al.* Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology*, Jan. 2009. v. 126, n. 1, p. 18–27. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120495>>. Acesso em: 7th jul. 2018.

KHAZNADJI, E. *et al.* A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*. *International Journal for Parasitology*, 1 Sep. 2005. v. 35, n. 10, p. 1115–1125. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751905001670?via%3Dihub>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

KINNE, R. W. *et al.* Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis research*, 2000. v. 2, n. 3, p. 189–202. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11094428>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

KIENER, H. P. *et al.* Synovial fibroblasts self-direct multicellular lining architecture and synthetic function in three-dimensional organ culture. *Arthritis and Rheumatism*, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 742–752, 2010.

KLOTZ, C. *et al.* Cystatins of Parasitic Organisms. [S.l.]: Springer, Boston, MA, 2011, p. 208–221.

KONTOYIANNIS, D.; KOLLIAS, G. Fibroblast biology. Synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis: leading role or chorus line? *Arthritis research*, 2000. v. 2, n. 5, p. 342–3. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11094445>>. Acesso em: 12th jul. 2018.

LARAGIONE, T. *et al.* The arthritis severity locus *Cia5d* is a novel genetic regulator of the invasive properties of synovial fibroblasts. *Arthritis & Rheumatism*, Aug. 2008. v. 58, n. 8, p. 2296–2306. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18668563>>. Acesso em: 15th mar. 2018.

LARK, M. W. *et al.* Aggrecan degradation in human cartilage. Evidence for both matrix metalloproteinase and aggrecanase activity in normal, osteoarthritic, and rheumatoid joints. *Journal of Clinical Investigation*, 1 Jul. 1997. v. 100, n. 1, p. 93–106. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9202061>>. Acesso em: 12th jul. 2018.

LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. *Lancet* (London, England), 15 Sep. 2001. v. 358, n. 9285, p. 903–11. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567728>>. Acesso em: 22nd feb. 2019.

- LEFEVRE, S. *et al.* Role of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Current pharmaceutical design*, 2015. v. 21, n. 2, p. 130–41. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25163744>>. Acesso em: 12th jul. 2018.
- LEFÈVRE, S. *et al.* Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nature Medicine*, 8 Dec. 2009. v. 15, n. 12, p. 1414–1420. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898488>>. Acesso em: 22nd feb. 2019.
- LIGHTOWLERS, M. W.; RICKARD, M. D. Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology*, 1988. v. 96 Suppl, p. S123-66. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3287288>>. Acesso em: 19th feb. 2019.
- LIU, F. *et al.* *Schistosoma japonicum* cystatin attenuates murine collagen-induced arthritis. *Parasitology Research*, 8 Oct. 2016. v. 115, n. 10, p. 3795–3806. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27393379>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.
- MANFERDINI, C. *et al.* From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells. *Arthritis Research & Therapy*, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 83, 2016. Disponível em: <<http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13075-016-0983-4>>. Acesso em: 2 nov. 2019.
- MATEEN, S. *et al.* Level of inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis patients: Correlation with 25-hydroxy vitamin D and reactive oxygen species. *PLoS ONE*, [s. l.], v. 12, n. 6, 2017.
- MATSUNO, H. *et al.* The role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology*, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 329–337, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/41.3.329>>. Acesso em: 10 nov. 2019.
- MAURER, S. M. *et al.* Responses Mast Cells' Ability To Drive Th1 Immune Tegumental Coat Impairs *Fasciola hepatica*. 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/early/2013/02/15/jimmunol>>. Acesso em: 19th feb. 2019.
- MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, 8 Dec. 2011. v. 365, n. 23, p. 2205–2219. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22150039>>. Acesso em: 15th mar. 2018.
- MCSORLEY, H. J.; HEWITSON, J. P.; MAIZELS, R. M. Immunomodulation by helminth parasites: Defining mechanisms and mediators. *International Journal for Parasitology*, 1 Mar. 2013. v. 43, n. 3–4, p. 301–310. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751912003165>>. Acesso em: 19th feb. 2019.
- MEI, G. *et al.* Structural basis for the immunomodulatory function of cysteine protease inhibitor from human roundworm *Ascaris lumbricoides*. *PloS one*, 2014. v. 9, n. 4, p. e96069. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24781326>>. Acesso em: 19th feb. 2019.
- MOTA, L. M. H. Da; LAURINDO, I. M. M.; SANTOS NETO, L. L. Dos S. N. Artrite reumatoide inicial: conceitos. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 2010. v. 56, n.



2, p. 227–229. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-42302010000200024&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-42302010000200024&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

MULLER-LADNER, U. *et al.* Synovial Fibroblasts of Patients with Rheumatoid Arthritis Attach to and Invade Normal Human Cartilage when Engrafted into SCID Mice.

American journal of Pathology. [S.l.]: [s.n.], 1996. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1865262/pdf/amjpathol00035-0178.pdf>>. Acesso em: 22nd feb. 2019.

MÜLLER-LADNER, U. *et al.* Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. The American journal of pathology, Nov. 1996. v. 149, n. 5, p. 1607–15.

NAVARRO-MILLÁN I, CURTIS JR. Newest clinical trial results with antitumor necrosis factor and nonantitumor necrosis factor biologics for rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol. 2013;25(3):384–390. doi:10.1097/BOR.0b013e32835fc62e

NATIONAL RHEUMATOID ARTHRITIS SOCIETY. NRAS - National Rheumatoid Arthritis Society. [S.l.], 2010. Disponível em: <<https://www.nras.org.uk/dmards>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

NCCIH. Rheumatoid Arthritis: In Depth. [S.l.], 2016. Disponível em:

<<https://nccih.nih.gov/health/RA/getthefacts.htm#about>>. Acesso em: 12th jul. 2018.

NICE. Rheumatoid arthritis in adults: management | Guidance and guidelines | NICE. 2018. Disponível em:

<<https://www.nice.org.uk/guidance/cg79/chapter/Recommendations#pharmacological-management>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

OKAMOTO, H. *et al.* Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of transcription factors. FEBS Journal, Sep. 2008. v. 275, n. 18, p. 4463–4470. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2008.06582.x>>. Acesso em: 12th jul. 2018.

OKROJ, M. *et al.* Rheumatoid arthritis and the complement system. Annals of Medicine, 8 Jan. 2007. v. 39, n. 7, p. 517–530. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17852027>>. Acesso em: 12th jul. 2018.

OLIVEIRA, S. M. De *et al.* Intestinal parasites infection: protective effect in rheumatoid arthritis? Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition), Sep. 2017. v. 57, n. 5, p. 461–465.

PAP, T. *et al.* Fibroblast biology: Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis Research, 8 Jun. 2000. v. 2, n. 5, p. 361. Disponível em:

<<http://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar113>>. Acesso em: 22nd feb. 2019.

PAULA MONTEIRO GOMIDES, A. *et al.* Parasites in Rheumatoid Arthritis: Imminent Threat or Protective Effect? Current Rheumatology Reviews, Jul. 2017. v. 13, n. 2, p. 80–85.

PICCOLI, A. K. *et al.* Expressão de proteínas reguladoras do complemento CD55, CD59, CD35 e CD46 na artrite reumatoide. Revista Brasileira de Reumatologia, Nov. 2011. v. 51, n. 5, p. 503–510. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0482-50042011000500009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042011000500009&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 12th jul. 2018.

POPE, R. M. Apoptosis as a therapeutic tool in rheumatoid arthritis, 2002.

POŽGAN, U. *et al.* Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biological Chemistry*, 1 Jan. 2010. v. 391, n. 5. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2010.391.issue-5/bc.2010.035/bc.2010.035.xml>>. Acesso em: 30th sep. 2017.

RABINOVICH, Gabriel Adrián. Apoptosis as a target for gene therapy in rheumatoid arthritis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 95, supl. 1, p. 225-233, 2000.

RODRIGUES SENNA, É. *et al.* Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil: A Study Using the COPCORD Approach. *Journal of Rheumatology*, 2004.

ROSENGREN, S.; BOYLE, D. L.; FIRESTEIN, G. S. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods in molecular medicine*, [s. l.], v. 135, p. 365–375, 2007.

SCHELLEKENS, G. A. *et al.* The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. *Arthritis and Rheumatism*, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 155–163, 2000.

SANGHA, O. Epidemiology of rheumatic diseases. *Rheumatology*, 1 Dec. 2000. v. 39, n. suppl\_2, p. 3–12. Disponível em: <[https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/39.suppl\\_2.3](https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/39.suppl_2.3)>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

SAUNDERS, K. A. *et al.* Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infection and immunity*, 1 Jan. 2007. v. 75, n. 1, p. 397–407. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17043101>>. Acesso em: 7th jul. 2018.

SENN, E. R.; FERRAZ, M. B. Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil: A Study Using the COPCORD Approach. *The Journal of Rheumatology*, 2004. v. 31, p. 3–594. Disponível em: <[http://copcord.org/Publications/Brazil\\_copcord.pdf](http://copcord.org/Publications/Brazil_copcord.pdf)>. Acesso em: 19th oct. 2017.

SHERINE E GABRIEL, C. S. C. Epidemiology of, risk factors for, and possible causes of rheumatoid arthritis - UpToDate. [S.l.], 2018. Disponível em: <<https://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-risk-factors-for-and-possible-causes-of-rheumatoid-arthritis>>. Acesso em: 19th feb. 2019.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA. Artrite Reumatoide - Sociedade Brasileira de Reumatologia. [S.l.], 2017. Disponível em: <<https://www.reumatologia.org.br/doencas/principais-doencas/artrite-reumatoide/>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

SOKOLOVE, J. *Rheumatoid Arthritis Pathogenesis and Pathophysiology*. [S.l.]: Humana Press, Cham, 2018, p. 19–30.

SUMMERS, R. W. *et al.* Trichuris suis therapy in Crohn's disease. *Gut*, 1 Jan. 2005. v. 54, n. 1, p. 87–90. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591509>>. Acesso em: 7th jul. 2018.

SUMMERS, R. W. *et al.* Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*, Apr. 2005. v. 128, n. 4, p. 825–32.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15825065>>. Acesso em: 7th jul. 2018.

SYMMONS, S. Unriddling Dali. *The Art Book*, Mar. 1998. v. 5, n. 2, p. 3–4. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1467-8357.00079>>. Acesso em: 23rd jul. 2018.

TALAMINI, A. F. *et al.* Helintos 2 -Classe trematoda. 2014. p. 99–109. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/nv4nc/pdf/amarante-9788568334423-04.pdf>>. Acesso em: 3rd mar. 2018.

TANAKA, Y. Current concepts in the management of rheumatoid arthritis. *The Korean journal of internal medicine*, Mar. 2016. v. 31, n. 2, p. 210–8. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26932398>>. Acesso em: 19th feb. 2019.

TOLBOOM, T. C. A. *et al.* Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, Jul. 2005. v. 52, n. 7, p. 1999–2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15986342>>. Acesso em: 15th mar. 2018.

TONG, B. *et al.* Role of cathepsin B in regulating migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes into inflamed tissue from patients with rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental Immunology*, Sep. 2014. v. 177, n. 3, p. 586–597. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24749816>>. Acesso em: 12th jul. 2018.

VRAY, B.; HARTMANN, S.; HOEBEKE, J. Immunomodulatory properties of cystatins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, Sep. 2002. v. 59, n. 9, p. 1503–12. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12440772>>. Acesso em: 30th sep. 2017.

WANG, S. *et al.* Therapeutic potential of recombinant cystatin from *Schistosoma japonicum* in TNBS-induced experimental colitis of mice. *Parasites & Vectors*, 4 Dec. 2016. v. 9, n. 1, p. 6. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26728323>>. Acesso em: 2nd mar. 2018.

WHO. WHO | Musculoskeletal conditions. WHO, 2018.

WILSON, R. A. *et al.* Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *International Journal for Parasitology*, 1 Nov. 2011. v. 41, n. 13–14, p. 1347–1359. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020751911002426>>. Acesso em: 19th feb. 2019.

YANG, X. *et al.* Cloning, expression and characterisation of a type II cystatin from *Schistosoma japonicum*, which could regulate macrophage activation. *Parasitology Research*, 6 Nov. 2014. v. 113, n. 11, p. 3985–3992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25096535>>. Acesso em: 30th sep. 2017.

YOSHITOMI, H. Regulation of Immune Responses and Chronic Inflammation by Fibroblast-Like Synoviocytes. *Frontiers in Immunology*, [s. l.], v. 10, 2019.

**ARTIGO**

**Status: manuscrito em elaboração**

***Fasciola hepatica* extract alters viability, adhesion, migration and invasion properties of synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis.**

Suelen Pizzolatto Dalmolin<sup>1,2</sup>, Renata Ternus Pedó<sup>1,2</sup>, Mirian Farinon<sup>1,2</sup>, Jordana Miranda de Souza Silva<sup>1,2</sup>, Eduardo Cremonese Filippi Chiela<sup>2,3</sup>, Ana Helena Paz<sup>2,3</sup>, Martín Pablo Cancela Sehabiague<sup>2,4</sup>, Henrique Bunselmeyer Ferreira<sup>2,4</sup>, Rafaela Cavalheiro do Espírito Santo<sup>1,2</sup>, Fabiany da Costa Gonçalves\*<sup>5</sup>, Ricardo Machado Xavier\*<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Doenças Autoimunes, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS, Serviço de Pesquisa Experimental- Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

<sup>4</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Porto Alegre, Brazil.

<sup>5</sup>Department of Internal Medicine, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Netherlands.

<sup>6</sup>Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

\*Corresponding author:

Ricardo Machado Xavier

Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350; 6º andar

Porto Alegre, RS 90035-903, Brasil.

Fone: +55 (51) 3359

E-mail address: rmxavier@hcpa.edu.br

Fabiany da Costa Gonçalves

Nephrology and Transplantation, Internal Medicine, Erasmus Medical Center, Rotterdam, GD 3015,

Rotterdam, The Netherlands

Fone: +31 (0)10-704 0 704

E-mail address: fabygon85@gmail.com

Financial Support:

This study was supported by Research Incentive Fund (FIPE/HCPA) under Grant (nº 180350) and Research Support Fund of Sociedade de Reumatologia do Rio Grande do Sul. We acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, for a scholarship offered to Suelen Pizzolatto Dalmolin

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interests.

**Artigo original a ser submetido à revista *Scientific Reports***

**Normas:** [https://mts-srep.nature.com/cgi-bin/main.plex?form\\_type=display\\_auth\\_instructions](https://mts-srep.nature.com/cgi-bin/main.plex?form_type=display_auth_instructions)

## Background

**Introduction:** Fibroblasts-like synoviocytes (FLS) are the main stromal cells of the joint synovium and have an aggressive and invasive profile in RA patients, being involved in cartilage degradation and bone erosion. The current therapeutic options are aimed at suppressing inflammation and relieving symptoms, but are not effective in maintenance and remission of the disease, so new therapeutic alternatives for RA are needed. *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) is a helminth that releases excretory-secretory products through its tegument containing immunomodulatory components capable of suppressing the Th1 immune response and the production of inflammatory cytokines. **Objective:** To evaluate the therapeutic potential of *F. hepatica* extract in FLS from patients with RA. **Materials and methods:** First, the FLS were isolated from synovial fluid RA patients, cultured and characterized for the phenotypic markers CD55, CD90, and CD68. After, the FLS were exposed to different concentrations of *F. hepatica* extract (60 µg/ml, 80 µg/ml and 100 µg/ml) and analyzed after 24 h, 48 h and 72 h by the cell viability assay (MTT). The effect of the extract was also evaluated by nuclear morphometry index (NMI), apoptosis assay, cell adherence, invasion and migration tests, and TNF-α production. Statistical analyzes were performed by ANOVA or T test and  $p < 0.05$  was considered statistically significant. **Results:** *F. hepatica* extract decreased the cell viability of FLS at concentration of 100 µg/ml after 48 h ( $83.8 \% \pm 5.0$  extract vs  $100.0 \% \pm 0.0$  control;  $p < 0.05$ ), and at concentrations of 80 µg/ml ( $88.4 \% \pm 3.0$  extract vs  $100.0 \% \pm 0.0$  control;  $p < 0.05$ ) and 100 µg/ml ( $89.8 \% \pm 3.8$  extract vs  $100.0 \% \pm 0.0$  control;  $p < 0.05$ ) after 72 h, when compared with control group. The treatment with *F. hepatica* extract does not affect NMI parameters or induce apoptosis or cell death on FLS. However, the extract showed a decreased of FLS adherence ( $92.0$  cells  $\pm 5.8$  extract vs  $116.3$  cells  $\pm 7.9$  control;  $p < 0.05$ ), migratory potential ( $69.5 \% \pm 17.6$  extract vs  $100.0 \%$  control;  $p < 0.05$ ) and cell invasion ( $80.3 \% \pm 3.9$  extract vs  $100.0 \%$  control;  $p < 0.05$ ). Besides that, there was a trend of decreased TNF levels after extract treatment. **Conclusions:** Our results point out *F. hepatica* extract as a potential therapy for AR due to their ability to reduce in vitro the aggressive and invasive profile of FLS without inducing apoptosis and cell death.

**Key Words:** Rheumatoid arthritis, fibroblast-like synoviocytes, *Fasciola hepatica*

## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease that occurs in 0.5–1.0% of the adult population worldwide<sup>1</sup>. RA is characterized by synovial hyperplasia with invasion and destruction of cartilage and bone<sup>2</sup>. The synovial membrane is mainly comprised by fibroblast-like synoviocytes (FLS), and during the illness process, as a striking characteristic of RA, it can shelter a population of these cells with aggressive, invasive and morphologically modified characteristics<sup>3</sup>.

The joint synovia covers the articular space and produce the synovial fluid for the joints<sup>2</sup>. In healthy joints, FLS are responsible for producing extracellular matrix components, providing nutrient proteins to the joint cavity and surrounding tissues and assisting in joint lubrication<sup>4</sup>. In addition, they act in the continuous physiological remodeling of the extracellular matrix, through the secretion of collagens, fibronectin and laminin, and enzymes that degrade the matrix, such as metalloproteinases (MMPs) and its inhibitors<sup>5</sup>. In this way, FLS play an important role in the RA. As a relevant feature, the FLS exhibit an aggressive and invasive profile and are involved in inflammatory process of the disease<sup>6</sup>. The ability to invade and promote cartilage destruction stands out as one of the main characteristics of FLS in RA. Thus, they become one of the main tissue components in the initiation and perpetuation of RA, as well as in the process of joint destruction<sup>2,4</sup>.

Available treatments have been effective for induction and maintenance of disease remission, but there is no known cure for RA<sup>7,8</sup>. Among the existing drug options, besides the steroid and non-steroid anti-inflammatory drugs, there are the disease modifying antirheumatic drugs (DMARDs), that can affect the RA course<sup>9</sup>. The DMARDs can be conventional and targeted synthetic DMARDs, as well as biologic DMARDs. However, these options have not been successful in all patients, may cause several side effects, and some of them present significant health care costs<sup>10</sup>. For that reason, new therapeutic alternatives are needed.

In this sense, parasite-secreted proteins appear as a new therapeutic approach for RA and other self-inflammatory diseases, as they present an modulatory potential in the immune system<sup>11</sup>. In recent decades, data on the regulatory role of the immune system by parasites have been reported in autoimmune diseases, such as RA<sup>12,13</sup>, multiple sclerosis<sup>14</sup>, inflammatory bowel diseases such as Crohn's disease<sup>15,16</sup>, ulcerative colitis<sup>15</sup>, celiac disease<sup>13</sup>, type 1 diabetes<sup>17</sup> and allergies<sup>18</sup>. Among the helminths with immunomodulatory characteristics, *Fasciola Hepatica* (*F. hepatica*) is a parasite that has been studied for this purpose. The tegument covering this parasite is formed by a layer rich in secretory inclusions and externally limited by a dense glycocalyx plasma membrane<sup>19,20</sup>. *F. hepatica* tegument is highly glycosylated, with the presence of oligosaccharide motifs and glycoproteins, which have immune modulatory properties<sup>21</sup>. The interaction with host immune system cells occurs from the constant release of the integument<sup>22,23</sup>.

To the best of our knowledge, there are no studies of the effect of *F. hepatica* extract on RA-patient derived FLS. Thus, we aimed to evaluate the therapeutic potential of *F. hepatica* extract on FLS from patients with RA<sup>11</sup>.

## Results of RA patients

### *Clinical and serological characteristics of RA patients*

The synovial fluid was collected from a total of thirty-two patients with established RA. Of the 32 FLS isolates, 12 cellular cultures grew appropriately *in vitro* (7 females and 5 males), mean age 65 years, mean duration of disease 15 years) were enrolled in this study. In our cohort, 4 patients with RA were positive for anti-CCP antibodies and presented DAS 3,61 (IQR: 3,3-4.7)

(2 high, 9 moderate and 1 high disease activity). Most of them received treatment with DMARD, with concurrent glucocorticoids. The baseline demographic, clinical, and laboratory parameters are shown in Table 1.

Table 1: Clinical characteristics of the patients at the time of disease

	RA patients (n=12)
Age (years), mean $\pm$ SD	65.00 $\pm$ 6.08
Disease duration (years), mean $\pm$ SD	15.00 $\pm$ 9.20
Women, n (%)	7.00 (58.33)
Men, n (%)	5.00 (41.66)
Rheumatoid factor positive, n (%)	2.00 (16.66)*
ACPA positive, n (%)	4.00 (33.33)**
Presence of erosion, n (%)	6.00 (50.00)***
<i>Disease activity</i>	
DAS-28-ESR, median (IQR)	3.61 (3,3-4.7)
Low, n (%)	2 (16.66)
Moderate, n (%)	9 (75.00)
High, n (%)	1 (8.33)
ESR, median (IQR)	41.5 (26.0-68.7)
<i>Treatment regimen<sup>l</sup></i>	
DMARD with concurrent glucocorticoids, n (%)	4.00 (33.33)
DMARD monotherapy, n (%)	3.00 (25.00)
DMARDs, with concurrent biologic therapy, n (%)	3.00 (25.00)

\* Values equal or higher than 80 UI/ml; 5 patients had no results for this parameter.

\*\* Values higher than 100 UI/ml 6 patients had no results for this parameter.

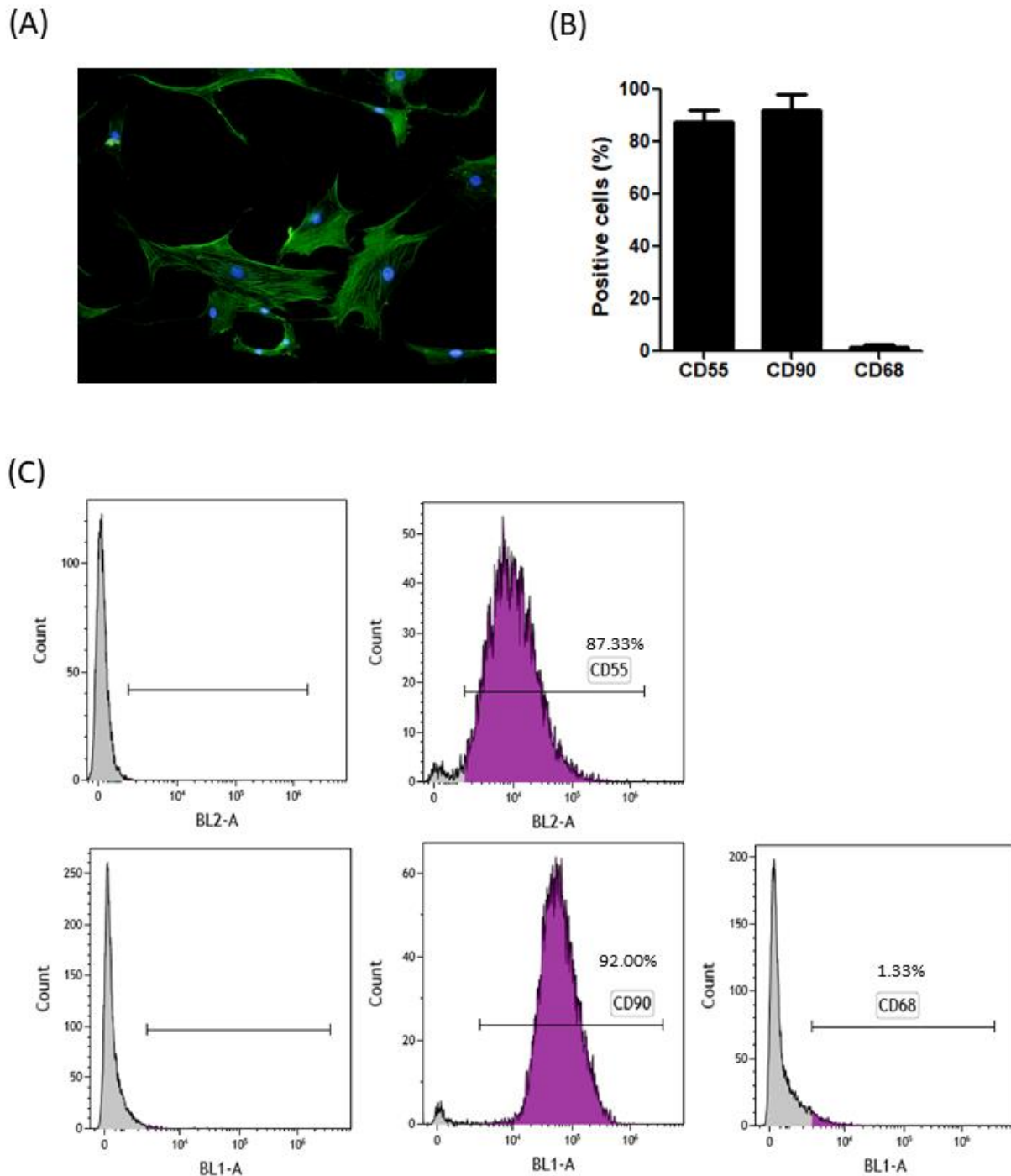
\*\*\* 3 patients had no results for this parameter

<sup>l</sup> 2 patients had no results for treatment

### ***Morphology and Characterization of FLS***

For evaluation of the morphology, FLS were stained with Phalloidin and analyzed by fluorescence microscopy. The cells have shown the FLS elongated classic phenotype (**Figure 1A**). To determinate the purity of the cultures, cells was tested by flow-cytometric analysis using FITC- Mouse Anti-Human CD90, PE- Mouse Anti-Human CD55 (both FLS positive) and FITC- Mouse Anti-Human CD68 (macrophage positive) monoclonal antibodies (**Figure 1B**). Most cells expressed the surface markers for FLS, such as CD55 (87%  $\pm$  4.5) and CD90 (92%  $\pm$  6.0) and they were negative for CD68 (1%  $\pm$  1.1) (**Figure 1C**).



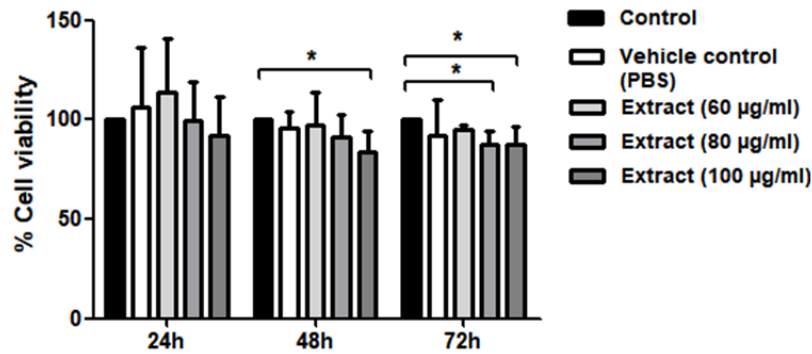


**Figure 1: Characterization of FLS cultures.** (A) Morphology of FLS labeled with Phalloidin for actin filamentous (green), and DAPI for nuclei (blue). (B) Percentage of positive cells for CD55, CD90 (both FLS markers), and CD68 (macrophage marker). (C) Representative of flow cytometry analysis for CD55, CD90, and CD68. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

#### ***F. hepatica* extract decrease the cellular viability of FLS**

To analyze the FLS viability after treatment with *F. hepatica* extract, the FLS were exposed to different doses and timepoints. The *F. hepatica* extract decreased the cell viability of FLS at concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$  after 48 h (83.8 %  $\pm$  5.0 extract vs 100.0 %  $\pm$  0.0 control;  $p < 0.05$ ) and at concentrations of 80  $\mu\text{g/ml}$  (88.4 %  $\pm$  3.0 extract vs 100.0 %  $\pm$  0.0 control;  $p < 0.05$ ), and 100  $\mu\text{g/ml}$  (89.8 % extract  $\pm$  3.8 extract vs 100.0 %  $\pm$  0.0 control;  $p < 0.05$ ) after 72 h, when

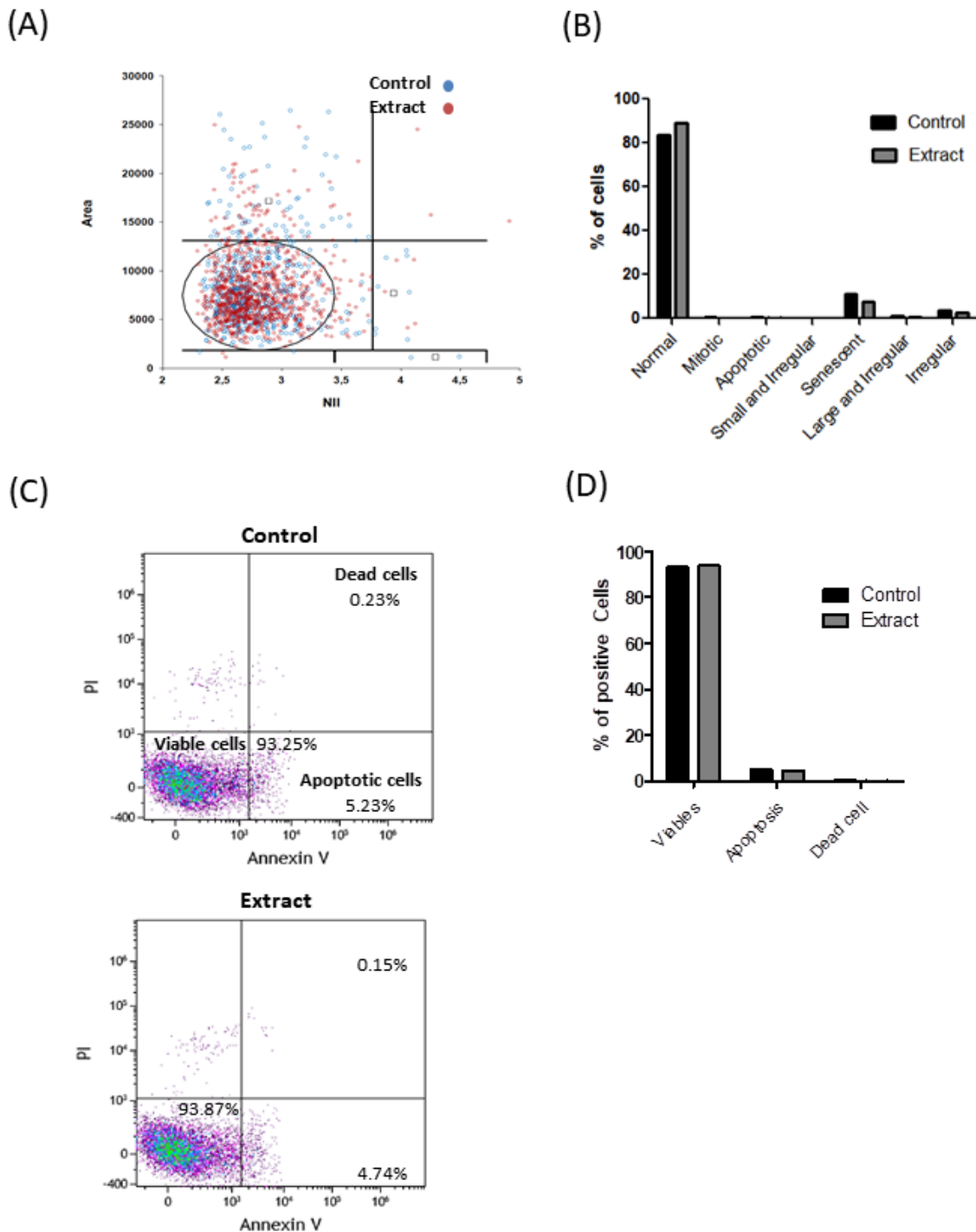
compared with control group without treatment (n=8). There was no significant difference in cell viability between the time of 48 h and 72 h at 100 µg/ml. Based on these results, the dose of 100 µg/ml and the time of 48 h were chosen as a treatment protocol for the next analyses (**Figure 2**).



**Figure 2: *F. hepatica* extract decreased the FLS viability.** *F. hepatica* extract decreased the cell viability of FLS by MTT test at concentration of 100 µg/mL after 48 h and at concentrations of 80 µg/mL and 100 µg/mL after 72 h, when compared with control group without treatment. \* $p < 0.05$ ; ANOVA two-way. (n=8). Data were normalized as percent of control at each time point and is expressed as mean  $\pm$  SD.

#### ***F. hepatica* extract did not alter the morphometry and did not cause apoptosis and cell death profile of FLS**

For the evaluation of the nuclear morphometry index and the nuclear irregularity index (NII), the cells were analyzed by ImageJ Pro Plus after treatment for 48 h with *F. hepatica* extract and DAPI stained. The treatment did not alter the nuclear morphometry of FLS in parameters of area, roundness, aspect, radius ratio, and area box (**Figure 3A/ Figure 3B**) (n=3). In order to access characteristics of apoptosis and necrosis, FLS were treated and labeled with annexin and propidium iodide and analyzed by flow cytometry (**Figure 3C**). The *F. hepatica* extract was not able to induce apoptosis or cell death (**Figure 3D**); (n=2).

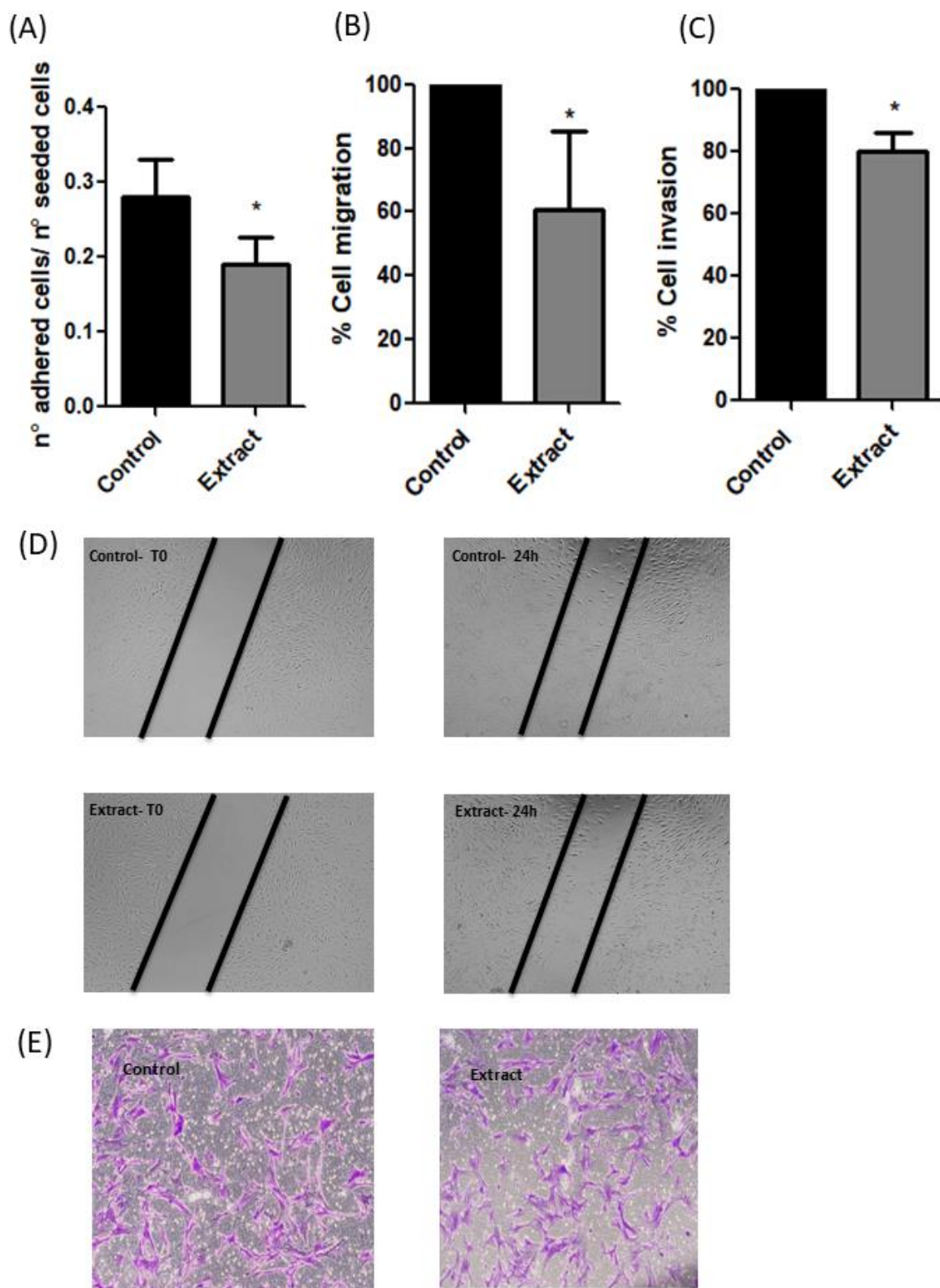


**Figure 3: *F. hepatica* extract did not alter parameters of nuclear morphometry, apoptosis, cell death of FLS.** (A) Representative analysis in parameters of area, roundness, aspect, radius ratio, area box, and the nuclear irregularity index NII in parameters of nuclear irregularity when compared to the untreated group. Red dots: control; blue dots: *F. hepatica* extract; (n=3) (B) Percentage of positive cells for annexin V and for Homogeneous population (n=3). (C) Representative flow cytometry analysis of apoptosis (Annexin V) and necrosis (propidium iodide); Control (left) and treated (right). (D) Percentage of viable, apoptotic, and dead cells (n=2). Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

***F. hepatica* extract decrease the FLS adherence efficiency, the invasion and migratory potential**

To analyze the FLS adherence efficiency, FLS were seeded and immediately treated with *F.*

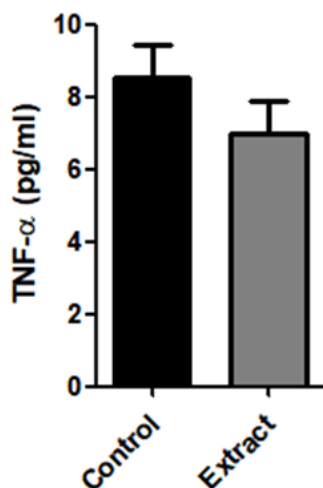
*hepatica* extract and analyzed after 6 h by optical microscopy. FLS treated with the extract decrease the capacity to adhere in 20% when compared to control group (92.0 cells  $\pm$  5.8 extract vs 116.3 cells  $\pm$  7.9 control;  $p < 0.05$ ); (n=4) (**Figure 4A**). For the FLS invasion potential, cells were treated with *F. hepatica* extract for 48 h and then cultured in matrigel inserts for 24h. FLS treated have their invasion potential reduced through the matrigel invasion chambers when compared to the control group (80.3 %  $\pm$  3.9 extract vs 100.0 % control;  $p < 0.05$ ) (n=2) (**Figure 4B**). To analyze the FLS migratory potential, FLS were treated with the *F. hepatica* extract for 48 h and then a linear wound was created in the well. Light microscopy images were taken immediately 0 and 24 h after wounding and images were analyzed by ImageJ. FLS treated have their migratory potential diminished when compared to the control group (69.5 %  $\pm$  17.6 extract vs 100.0 % control) (**Figure 4C**);  $p < 0.05$ ; (n=4).



**Figure 4: *F. hepatica* extract reduced the adherence efficiency, the migratory and invasion potentials of FLS.** (A) Adherence capacity of FLS (n=4). (B) Migratory potential of FLS; (n=3). (C) Invasive capacity of FLS (n=2). (D) Representative microscopy images of migration. (E) Representative images of stained cells that invaded through Matrigel invasion chambers. Original magnification: 20x. T Test; Data are expressed as mean  $\pm$  SD;  $p < 0.05$ .

### ***F. hepatica* extract demonstrate a tendency to decrease the release of TNF- $\alpha$ by FLS**

For the evaluation of TNF- $\alpha$  release, an important cytokine involved in the RA, FLS were first stimulated for 72 h with INF- $\gamma$  to let the environment more inflamed. After treatment, the samples were placed on an ELISA plate for analysis. The treatment showed a tendency to decrease the TNF- $\alpha$  release by FLS when compared to the control group, but this difference has not reached the statistical significance ( $8.55 \pm 0.51$ pg/mL control vs  $7.01 \pm 0.52$  pg/mL extract) (n=3) (**Figure 5**).



**Figure 5:** *F. hepatica* extract demonstrated a tendency to decrease the release of TNF- $\alpha$  by FLS. T-test; Data are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3); ( $p=0,1037$ )

## **Discussion**

The FLS cells are involved in the initiation and perpetuation of RA, as well as the process of joint degradation<sup>4,24</sup>. Despite the wealth of knowledge gained in the last years, many questions are still open that need to be answered to fully understand the role of FLS in the development of destructive AR. It is not clear how FLS become phenotypically altered and activated in RA and at which stage of the disease<sup>4</sup>. Based on that, a new strategy rather than a new target should be required for the advanced therapy of RA<sup>8</sup>. *In vitro* culture is a great study model for new therapies, as well an alternative model instead animal model use, being possible the environmental control and test of several doses in different times.

One hallmark of activated FLS in RA is the increased expression of various adhesion molecules that may be also induced by matrix-bound and soluble factors<sup>25</sup>. FLS express type IV and V collagens, vimentin, and CD90 (Thy-1). A significant percentage of the cultured fibroblasts express VCAM-1 and CD55<sup>5</sup>. In relation to surface phenotypes, it is known that CD55 is expressed by FLS in the intimate coat layer of the synovia, and the CD90 is highly expressed in the sub-intimate layer, which is of paramount importance in the maintenance and expansion of synovial inflammation that occurs in AR<sup>5,26</sup>. Considering the cellular heterogeneity of the synovia, associated with these markers of FLS, the synovial tissue also presents expression of CD68 (marker of macrophages). However, its presence is identified at low numbers in cultures after five passages<sup>27</sup>, as was observed in our study. By the fifth passage the vast majority of cells stained for the markers CD90 and CD55 and only a small proportion manifested expression of CD68. According to this pattern of cell surface marker expression, the cell population was quite uniform and can be considered FLS.

The FLS are present in the joint synovia. As a consequence of persistent local inflammation, the

thickness of the synovial membrane increases to 10-15 cell layers, which are mainly composed by FLS<sup>5</sup>. We demonstrated a decrease in the viability of FLS treated with *F. hepatica* extract, which indicates that this extract may reduce the synovial cell layer. Reducing this viability can be considered as a desirable therapeutic effect in decreasing RA progression. Sharaf and collaborators<sup>21</sup> demonstrated that products excretory-secretory (ESPs) from *F. hepatica* had significant suppressive effects on lympho-proliferation, up to 74%. Other group showed that ES-62, a glycoprotein secreted by the rodent filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*, prevented the development of disease in collagen-induced arthritis (CIA)<sup>28</sup> and modified bone remodeling by altering bone marrow progenitors<sup>29</sup>. We demonstrated a decrease in the viability of FLS treated with *F. hepatica* extract, which indicates that this extract may reduce the synovial cell layer. It is important to focus on reducing this viability, since this imbalance promoted by disease contributes to RA progression.

Besides increased viability, RA FLS are characterized by a resistance to apoptosis, and this contributes to the accumulation of cells in the rheumatoid lesion. One of the possible mechanisms responsible for this resistance is the presence of antiapoptotic factors in the synovial fluid<sup>30</sup>. In addition, this impaired apoptosis may contribute to the development of the microenvironment and to maintain the inflammatory response that characterizes established RA<sup>5,31</sup>. Despite the observed effect of *F. hepatica* extract on cell viability, there was no notable effect in the induction of apoptosis and cell death by morphometry parameters. However, cell viability may have been compromised through other pathways. We hypothesize that alteration of cell viability may be due to pro-senescent cell changes and that senescent cells are resistant to apoptosis<sup>32</sup>. Apoptosis conducts to a prompt elimination of dysfunctional cells in such a way that does not promote the inflammation. In contrast, cytokine secretion by senescent provokes extended paracrine signaling. Thus, a senescent cell has an advantage over apoptotic cells due to the capacity to communicate with other cells, increasing the cell signaling<sup>32,33</sup>. Moreover, the profile alteration of the cells involved in RA is a delicate process as it can modify/eliminate other cells that are also sensitive to the drug. Therefore, it is important to consider that selective elimination of a subpopulation of cells such as FLS may affect other synovial cells or lead to other diseases<sup>34</sup>.

FLS has a key role in *pannus* formation and joint destruction<sup>35</sup> through the ability to invade and degradate the cartilage and bone. During cartilage invasion and degradation, matrix-bound proteins may be accessible or even released from the degraded matrix and may additionally activate FLS in RA<sup>36</sup>. Adherence and mechanical forces affect FLS via the extracellular matrix, modulating FLS in behaviors as migration and adherence<sup>37</sup>. FLS of RA adhered significantly more to collagen type IV, fibronectin and laminin than normal FLS. Adhesion molecules on FLS can support the binding of T cells and other mononuclear cells thereby facilitating the ability of FLS to act as accessory cell<sup>38</sup>. Other important characteristic to be controlled is the invasive profile. The *in vitro* FLS invasion phenotype is correlated with radiologic joint destruction for RA patients<sup>39</sup> and histological joint damage for rats<sup>40</sup>. Accordingly, our findings demonstrated that *F. hepatica* extract was capable to significantly modify the parameters associated invasiveness and aggressive profile of FLS such as adherence, migration and invasion potential. These results are particularly interesting because the suppression or modification of these phenotype seems to be an important aspect involved in the study of these molecules with immunomodulatory effect and may indicate a potential inhibition of the processes involved in cartilage and bone damage.

Another important factor involved in RA pathophysiology is TNF- $\alpha$ , a cytokine with both pro-inflammatory and immune-regulatory properties. Findings from human and animal studies have indicated the direct involvement of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of AR<sup>41</sup>. Some studies had already shown the ability of *F. hepatica* in suppressing pro-inflammatory cytokines<sup>6</sup>. In addition, it has been reported that the reduction of TNF- $\alpha$  which is related with alterations in the

inflammatory condition, as well as with improvement in joint and bone damage, in mouse model treated with monoclonal antibodies<sup>42</sup>. Another study demonstrated this same affect in a septic shock model in mice by administering the preparation of antigens present in the *F. hepatica* tegument<sup>43</sup>. In our study, we observed a decreased release of TNF- $\alpha$  by FLS treated with *F hepatica* extract. However it was not statistically significant, what could be related to insufficient sample size

This study presented some limitations. As mentioned, *F. hepatica* extract has many different molecules with potential pharmacological effects, such as cystatins, glycoproteins and antioxidant proteins<sup>44,21,45,46</sup>. Therefore, the detailed concentration of these components in the extract are not known and it is not possible to determine which one exert a specific effect on the parameters studied. In this way, more studies should be carried on to clarify the exactly concentration of each of these factors.

To our knowledge, this is the first study to evaluate the therapeutic effect of *F. hepatica* extract on FLS of RA patients. Treatment with *F. hepatica* extract affected the viability of FLS, but did not induce apoptosis or necrosis. At the same time, the extract was capable to reduce adherence, migration potential and FLS invasion capacity. Also, it showed a tendency to decrease TNF release by FLS which indicate an immunomodulatory effect in FLS. Therefore, the characterization of promising new immunomodulatory molecules found in helminth-released products and their potential use as immunotherapies are important<sup>47</sup>. Our results point out *F. hepatica* extract as a potential therapy for AR due to their ability to reduce the aggressive and invasive profile of FLS.

## Methods

### *Study design and patients*

This cross-sectional study was performed at a tertiary public hospital in Rio Grande do Sul, Brazil (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA). Patients diagnosed with RA according to the American College of Rheumatology/American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) criteria<sup>48</sup>, with active disease and with indication and with indication of knee arthrocentesis by the attending rheumatologist were included in study. Patients with positive infection serology tests (HIV, HBV, HCV, syphilis, tuberculosis) and indication of arthrocentesis on other joints were excluded. The DAS was calculated with DAS28-erythrocyte sedimentation rate. The study was approved by the Hospital Ethics Committee of the HCPA and written informed consent was obtained from each patient.

### *Collection procedure*

The arthrocentesis procedure was performed by a rheumatologist. Briefly, local anesthetic was used in the area of the joint and a needle with a syringe attached is inserted within the joint (joint injection) and joint fluid is drawn back under suction (aspirated) into the syringe. The synovial liquid was placed in a 15 ml falcon tube and stored in ice until processing.

### *Isolation and Cell Cultures of FLS*

The synovial fluid of RA patients was processed for the isolation of FLS. The liquid was centrifuged at 2000 x g for 5 min, resuspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium - High glucose (DMEM-HG, Gibco by Life Technologies, USA) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 200 mM L-glutamine (Gibco), 100 units/mL penicillin (Gibco), 100 mg/mL streptomycin (P/S) (Gibco), 50 mg/mL of gentamicin and transferred to a 6-well plate for culture (Thermo Fisher Scientific, USA). Cells were allowed to attach during three



days before replacing the growth medium. The cultures were kept at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, and the medium was replaced every 3 days. The initial culture was monitored until 70–80% of confluence and then cells were detached with trypsin-EDTA (Gibco) and transferred to a culture flask for the tests. FLS between 5 and 11 passages were used for experiments.

#### *Preparation of F. hepatica extract*

Mature *F. hepatica* was extracted from the bile ducts of bovine livers to obtain at local abattoirs. Liver flukes were transported to the laboratory in bile at 37°C, washed for 2 h at 37°C in 10 mM phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.3, homogenized and sonicated as protocol indicated<sup>51</sup>. Liver adult flukes were frozen and the supernatant was stored at 80°C until used. The procedure was realized at the Biotechnology Center of the Federal University of Rio Grande do Sul, Porro Alegre, Brazil and characterization and the protocol are in a previous study.

#### *Morphology and Characterization of FLS*

For phenotyping characterization, FLS were used in passage 5. Cells were centrifuged (2000 x g for 5 min), the supernatant was aspirated, and the antibodies were applied directly onto the pellet. After, the FLS were incubated with the following monoclonal antibodies: anti-Thy-1 (CD90), anti-CD55 (both FLS positive) and anti-CD68 (macrophage positive) (BD Biosciences, New Jersey, EUA). After incubation for 15 min at dark and room temperature (RT), cells were washed, centrifuged, resuspended and analyzed by flow cytometer (Attune, Applied Biosystems, Life Technologies). Unstained cells were used as controls. The morphology analysis of FLS was performed by Phalloidin staining actin filaments (also known as F-actin) (Sigma-Aldrich by Merck, St. Louis, EUA). FLS ( $0.7 \times 10^4$  cells/ml) were cultured over microscopy cover slips (18 x 18 mm) and placed into 12-well culture plates. After 48 h, adhered cells were fixed for 15 min with paraformaldehyde at RT in dark. Then, the cells were washed three times with PBS and blocked with 3% bovine serum albumine (BSA) (Sigma-Aldrich) for 1 h at RT in dark. Staining was performed with Phalloidin (1MG) for 1 h at RT in dark. Finally, cells were photographed in a fluorescence microscope with appropriate filters (Olympus IX-71, Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

#### *Viability assay (MTT)*

FLS viability was determined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. The FLS were seeded in 96-well plates at a density of  $5 \times 10^3$  cells/ml and exposed to different doses of *F. hepatica* extract (60 µg/ml, 80 µg/ml and 100 µg/ml) for 24 h, 48 h and 72 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Parallel controls were carried out with PBS (vehicle control) or untreated group (control). Then, the culture medium was replaced with MTT (0.5 mg/ml) and incubate for 4 h. The supernatants were removed and dimethyl sulphoxide (DMSO, Sigma Aldrich) was added to dissolve the MTT formazan crystals. The absorbance of each well was measured at 570 nm and 690 nm (SpectraMax M3) spectrophotometer and background was discounted. Cell viability was expressed as percent of average of control (or vehicle control). Eight experiments were performed independently (n=8).

#### *Nuclear Morphometry Index (NMI)*

A nuclear morphometric analysis (NMA) was performed as described by Filippi-Chiela et al. (2012). FLS were seeded in 24-well plates at a density of  $1 \times 10^4$  cells/ml. The following day, FLS were treated with 100µg/mL *F. hepatica* extract for 48 h. After 24 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 100 µL (300 nM) of 4',6-diamidino-2-phenylindole solution (DAPI; Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Then, cells were photographed in a

fluorescence microscope with appropriate filters (Olympus IX-71, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) and a total of 50 nuclei was obtained from random fields. The images were analyzed using Image Pro-Plus 6.0 software (Media Cybernetics, Maryland, USA), for the acquisition of the nuclear area and the parameters of nuclear irregularity (roundness, aspect, radius ratio and area/box, which are grouped in an index, named the nuclear irregularity index (NII). Three experiments were performed independently (n=3).

#### *Apoptosis and necrosis assay (Annexin V/Propidium Iodide [PI])*

FLS were plated in 24-well plate at a density of  $5 \times 10^4$  cells/ml for the apoptosis and cell death detection. FLS were treated with the  $100 \mu\text{g/ml}$  of *F. hepatica* extract or PBS for 48 h. The test was performed by the Annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/Propidium Iodide (PI) kit (Gibco| Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Briefly, FLS were washed and resuspended in Annexin V binding buffer, centrifuged at  $1600 \times g$  for 5 min, and labeled with Annexin V-FITC and Propidium Iodide (PI). After 10 min at RT in dark, Annexin V binding buffer was added and centrifuged one more time. The resulting fluorescence was detected by flow cytometry (Attune, Applied Biosystems, Life Technologies). Two experiments were performed independently (n=2).

#### *Adherence assay*

To evaluate the adherence potential of FLS, cells were seeded in 96-well plate at a density of  $1 \times 10^2$  cells/ml and exposed to  $100 \mu\text{g/ml}$  *F. hepatica* extract or PBS for 6 h. After 6 h, cells were counted immediately in an optical microscopy for adherence to polystyrene plate evaluation. Adherence was expressed by number of adhered cells divided by number of seeded cells. Four experiments were performed independently (n=4).

#### *Wound healing assay*

The wound closure motility assay was performed by seeding  $3.5 \times 10^4$  cells/ml in 24-well plates overnight and by treating then with  $100 \mu\text{g/ml}$  *F. hepatica* extract or PBS for 48 h. A linear wound was created using a  $200 \mu\text{L}$  micropipette tip and then washed with medium to remove unattached cells. Light microscopy images were taken immediately 0 and 24 h after wounding and, at the end of the experiment, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with crystal violet. The distance of the wound was measured in "inch" by ImageJ software and was expressed as percent of the average of control. Four experiments were performed independently (n=4).

#### *Invasion assay*

To the invasion capacity analysis, FLS were treated with  $100 \mu\text{g/ml}$  of *F. hepatica* or PBS for 48 h in T75 culture flasks. After, the FLS were seeded in matrigel inserts (collagen matrix) Corning (24 well plates, 8-mm pore diameter; Bedford, MA, USA) at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well. The test was performed according to the manufacturer's specifications. To measure cell invasion, FLS were seeded in medium free of FBS in the upper chamber. Medium supplemented with 15% FBS was used as an attractant in the lower chamber. After 24 h, cells that invaded through the matrix were stained with Crystal Violet, photographed by under microscope, and analyzed in the ImageJ software. Two experiments were performed independently (n=2).

#### *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

To evaluate the TNF- $\alpha$  expression of FLS, a density of  $1 \times 10^4$  cells/ml were seeded in a 24-well

plate for ELISA assay. When cells reached the confluence of 80%, the culture medium was supplemented with 2  $\mu\text{L}/\text{mL}$  of interferon-gamma (INF- $\gamma$ - Thermo Fisher) for 3 days to induce an inflammatory condition *in vitro*. After that, FLS were treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  *F. hepatica* extract or PBS for 48 h. Then, the medium was replaced and the supernatant was collected after 24 h and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. The concentration of TNF- $\alpha$  in supernatants was measured by human TNF- $\alpha$  Elisa Max<sup>TM</sup> Standard Set (BioLegend, San Diego, CA, USA). The absorbance of each well was measured at 450 nm and 570 nm in SpectraMax M3 spectrophotometer. Data analyses were performed in My Assays software (“Four Parameter Logistic Curve” online data analysis tool, MyAssays Ltd, Sussex, UK) and there are representative at pg/mL. Three experiments were performed independently (n=3).

#### *Statistical analyses*

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD). Groups were compared by two-way analysis of variance (ANOVA) and by Student's t-test using GraphPad Prism 6.0. Statistical differences were considered significant with a  $p$  value  $<0.05$ .

## Acknowledgments

We would like to thank the Biotechnology Center of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, for the collecting and extracting of *Fasciola hepatica*.

## References

1. de Melo Cruvinel, W. *et al.* *Células T Regulatórias Naturais (T REGS) em Doenças Reumáticas Natural Regulatory T cells in Rheumatic Diseases*. (2008).
2. Gibofsky, A. Overview of epidemiology, pathophysiology, and diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am. J. Manag. Care* **18**, S295-302 (2012).
3. Pap, T., Müller-Ladner, U., Gay, R. E. & Gay, S. Fibroblast biology: Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* **2**, 361 (2000).
4. Ospelt, C. Synovial fibroblasts in 2017. *RMD Open* (2017). doi:10.1136/rmdopen-2017-000471
5. Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **233**, 233–255 (2010).
6. Gabriel, S. E. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* (2001). doi:10.1016/S0889-857X(05)70201-5
7. NICE. Rheumatoid arthritis in adults: management | Guidance and guidelines | NICE. (2018).
8. Tanaka, Y. Current concepts in the management of rheumatoid arthritis. *Korean J. Intern. Med.* **31**, 210–8 (2016).
9. NATIONAL RHEUMATOID ARTHRITIS SOCIETY. NRAS - National Rheumatoid Arthritis Society. (2010). Available at: <https://www.nras.org.uk/dmards>. (Accessed: 2nd March 2018)
10. Matisz, C. E., McDougall, J. J., Sharkey, K. A. & McKay, D. M. Helminth parasites and the modulation of joint inflammation. *Journal of Parasitology Research* (2011). doi:10.1155/2011/942616
11. Langdon, K. *et al.* Helminth-based therapies for rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Int. Immunopharmacol.* **66**, 366–372 (2019).
12. Paula Monteiro Gomides, A., Maria Bezerra Luna Lima, C., Airton Castro Rocha, F., Maria Henrique da Mota, L. & Maximiano de Oliveira, S. Parasites in Rheumatoid Arthritis: Imminent Threat or Protective Effect? *Curr. Rheumatol. Rev.* **13**, 80–85 (2017).
13. Sipahi, A. M. & Baptista, D. M. Helminths as an alternative therapy for intestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology* **23**, 6009–6015 (2017).
14. Correale, J. & Farez, M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **61**, 97–108 (2007).
15. Summers, R. W., Elliott, D. E., Urban, J. F., Thompson, R. A. & Weinstock, J. V. Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* **128**, 825–32 (2005).
16. Maruszewska-Cheruiyot, M., Donskow-Łysoniewska, K. & Doligalska, M. Review Helminth therapy: Advances in the use of parasitic worms against Inflammatory Bowel Diseases and its challenges. *HELMINTHOLOGIA* **55**, 1–11 (2018).
17. Saunders, K. A., Raine, T., Cooke, A. & Lawrence, C. E. Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. *Infect. Immun.* **75**, 397–407 (2007).
18. Helmbj, H. Human helminth therapy to treat inflammatory disorders- where do we stand? *BMC Immunology* (2015). doi:10.1186/s12865-015-0074-3
19. ABATH, F. G. C. & WERKHAUSER, R. C. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite Immunol.* **18**, 15–20 (1996).
20. Hamilton, C. M. *et al.* The *Fasciola hepatica* Tegumental Antigen Suppresses Dendritic Cell Maturation and Function. *Infect. Immun.* **77**, 2488–2498 (2009).

21. Sharaf, O. F., Amir, E. M. & Hawash, Y. A. LYMPHO-PROLIFERATIVE RESPONSES TO VARIOUS FASCIOLA HEPATICA WORM'S ANTIGENS: AN IN VITRO STUDY. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **46**, 217–222 (2016).
22. Khaznadji, E., Collins, P., Dalton, J. P., Bigot, Y. & Moiré, N. A new multi-domain member of the cystatin superfamily expressed by *Fasciola hepatica*. *Int. J. Parasitol.* **35**, 1115–1125 (2005).
23. Wilson, R. A. *et al.* Exploring the *Fasciola hepatica* tegument proteome. *Int. J. Parasitol.* **41**, 1347–1359 (2011).
24. Bartok, B. & Firestein, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* **233**, 233–55 (2010).
25. Smolen, J. S., Aletaha, D. & McInnes, I. B. therapies for bone r. *Lancet (London, England)* **388**, 2023–2038 (2016).
26. Dennis, G. *et al.* Synovial phenotypes in rheumatoid arthritis correlate with response to biologic therapeutics. *Arthritis Res. Ther.* **16**, (2014).
27. Manferdini, C. *et al.* From osteoarthritic synovium to synovial-derived cells characterization: synovial macrophages are key effector cells. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 83 (2016).
28. Lumb, F. E. *et al.* Dendritic cells provide a therapeutic target for synthetic small molecule analogues of the parasitic worm product, ES-62. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
29. Doonan, J. *et al.* Protection Against Arthritis by the Parasitic Worm Product ES-62, and Its Drug-Like Small Molecule Analogues, Is Associated With Inhibition of Osteoclastogenesis. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
30. Casnici, C. *et al.* Optimized “in vitro” culture conditions for human rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Mediators Inflamm.* **2014**, 702057 (2014).
31. Korb, A., Pavenstädt, H. & Pap, T. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis* **14**, 447–454 (2009).
32. Childs, B. G., Baker, D. J., Kirkland, J. L., Campisi, J. & Van Deursen, J. M. Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? doi:10.15252/embr.201439245
33. Erwig, L. P. & Henson, P. M. Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death and Differentiation* **15**, 243–250 (2008).
34. Green, D. R. & Kroemer, G. Pharmacological manipulation of cell death: Clinical applications in sight? *Journal of Clinical Investigation* **115**, 2610–2617 (2005).
35. Bottini, N. & Firestein, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 24–33 (2013).
36. Lefèvre, S. *et al.* Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.* **15**, 1414–1420 (2009).
37. Konttinen, Y. T. *et al.* Fibroblasts biology. Signals targeting the synovial fibroblast in arthritis. *Arthritis Research* **2**, 348–355 (2000).
38. Firestein, G. S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum.* **39**, 1781–1790 (1996).
39. Tolboom, T. C. A. *et al.* Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **52**, 1999–2002 (2005).
40. Laragione, T., Brenner, M., Mello, A., Symons, M. & Gulko, P. S. The arthritis severity locus *Cia5d* is a novel genetic regulator of the invasive properties of synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* **58**, 2296–2306 (2008).
41. Lubberts, E. & Berg, W. B. van den. Cytokines in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Collagen-Induced Arthritis. (2013).
42. Matsuno, H. *et al.* The role of TNF- $\alpha$  in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology* **41**, 329–337 (2002).
43. Hamilton, C. M. *et al.* The *Fasciola hepatica* tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. *Infect. Immun.* **77**, 2488–98 (2009).

44. CANCELA, M. *et al.* Functional characterization of single-domain cystatin-like cysteine proteinase inhibitors expressed by the trematode *Fasciola hepatica*. *Parasitology* **144**, 1695–1707 (2017).
45. Ravidà, A. *et al.* *Fasciola hepatica* Surface Tegument: Glycoproteins at the Interface of Parasite and Host. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 3139–3153 (2016).
46. Dalton, J. P., Robinson, M. W., Mulcahy, G., O'Neill, S. M. & Donnelly, S. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Vet. Parasitol.* **195**, 272–285 (2013).
47. Cooke, A. *et al.* Helminth immunomodulation in Autoimmune Disease. *Article* **8**, 1 (2017).
48. Daniel Aletaha, et al. Criteria 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against. *Ann. Rheum. Dis.* **62**, 1580–1588. (2010).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstra que o extrato da *F. hepatica* age sobre os mecanismos relacionados ao perfil invasivo e agressivo dos FLS envolvidos diretamente na progressão da AR. Dessa forma, o extrato da *F. hepatica* foi capaz de reduzir a parâmetros de viabilidade, adesão, invasão e migração celular. Por outro lado, o extrato não apresentou efeitos em parâmetros de morfometria nuclear e em aspectos de apoptose e morte celular. A modificação do perfil de células envolvidas na AR é um processo delicado, pois se houver ausência de especificidade da droga, esta pode vir a modificar/eliminar outras células do organismo. É importante considerar que a eliminação seletiva de uma subpopulação de células como os FLS pode afetar outras células da sinóvia e também acarretar o aparecimento de outras doenças (GREEN; KROEMER, 2005).

Nossos resultados sugerem que o extrato de *F. hepatica* apresenta potencial para o tratamento da AR, através de uma abordagem de ação anti-inflamatória. Essa nova terapia também proporcionaria menor custo em relação aos tratamentos convencionais. Apesar disso, ainda não necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo* para ampliar o conhecimento sobre os efeitos do extrato na AR e a composição deste.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Este trabalho tem como perspectivas futuras avaliar a ação do extrato da *F. hepatica*, bem como de componentes do extrato, em ensaios *in vitro* com outros tipos celulares e em modelos *in vivo*. Como já descrito neste trabalho, um importante componente do extrato da *F. hepatica* são as cistatinas, as quais apresentam propriedades anti-inflamatórias *in vitro* e *in vivo*. Por esse motivo, tem-se de avaliar a ação das cistatinas recombinantes sobre células imunes como FLS e macrófagos e sobre células saudáveis, como as células estromais mesenquimais. Além disso, serão avaliadas as ações do extrato e das cistatinas em modelos animais de artrite aguda e crônica. O modelo agudo será o de artrite induzida por antígeno e o crônico o de artrite induzida por colágeno, a fim de testar primeiramente concentrações e número de doses do extrato de *F. hepatica* e das cistatinas recombinantes.



## 8. ANEXOS E/OU APÊNDICES

### Anexo I. Termo de consentimento livre e esclarecido

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do CAAE: 89044918.8.0000.5327

**Título do Projeto:** Avaliação *in vitro* do potencial terapêutico de Cistatinas recombinantes de *Fasciola hepatica* e de seu extrato em fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o potencial de uma molécula como terapia para a artrite reumatoide. Os testes para avaliação dessa molécula serão realizados em células (fibroblastos) de pacientes que tem artrite reumatoide. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Laboratório de Doenças Autoimunes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

Autorizar a utilização de uma amostra de líquido sinovial que será obtida após o procedimento de punção articular, no ambulatório clínico. O líquido sinovial removido na punção é habitualmente descartado. Você não precisará passar por nenhum procedimento adicional durante a punção em decorrência da participação na pesquisa. Você deverá assinar este documento dando permissão para utilizarmos o material biológico cedido para a obtenção das células (fibroblastos) que serão utilizadas nesta pesquisa. Também será necessário acessar o seu prontuário para obter algumas informações como data do diagnóstico da doença e medicamentos utilizados para o tratamento. Por isso, solicitamos a sua autorização para realizar este acesso.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, exceto potencial de quebra de confidencialidade. Para evitar isso, suas informações serão codificadas e sua identificação não aparecerá em qualquer divulgação da pesquisa.

A pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre diferentes abordagens terapêuticas em diversas doenças.

Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados. Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória.

Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Após a realização das análises previstas neste projeto, as células (fibroblastos) obtidas do líquido sinovial serão expandidas e congeladas sendo armazenadas no Laboratório de Doenças Autoimunes do HCPA. Este material será utilizado exclusivamente para esta pesquisa e após as análises será descartado.

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
Página 1 de 2 CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você poderá solicitar a retirada do material a qualquer momento, bastando solicitar por escrito ao responsável pelo projeto.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Ricardo Machado Xavier, pelo telefone (51) 3359-8000 ramal 7614, com a pesquisadora Suelen Pizzolatto Dalmolin, pelo telefone (51) 3359-8000 ramal 8837 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 3359-7640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h. Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

---

Assinatura

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
2 CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

Página 2 de

## Anexo II. Termo de confidencialidade para uso de dados


### TERMO DE COMPROMISSO

#### Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas

**Título do Projeto:** Avaliação *in vitro* do potencial terapêutico de Cistatinas recombinantes de *Fasciola hepática* e de seu extrato em fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos materiais biológicos serão mantidos em biorepositórios, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 21 de março de 2018.

Nome dos pesquisadores	Assinatura
Ricardo Machado Xavier	
Fabiany da Costa Gonçalves	Fabiany Gonçalves
Suelen Pizzolatto Dalmolin	Suelen Pizzolatto
Jordana Miranda de Souza Silva	Jordana Miranda
Mirian Farinon	Mirian Farinon
Renata Ternus Pedó	Renata Ternus Pedó
Bárbara Jonson Bartikoski	Bárbara Jonson Bartikoski

**STROBE Statement**—Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies*

	<b>Item No</b>	<b>Recommendation</b>
<b>Title and abstract</b>	1	(a) Indicate the study’s design with a commonly used term in the title or the abstract 56 (b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found 8 / 9 / 46
<b>Introduction</b>		
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported 20 / 26 / 27
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses 34 / 55
<b>Methods</b>		
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper 46
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection 46 - 48
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants 46
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable 47 – 54
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group 56 - 59
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias Not applicable
Study size	10	Explain how the study size was arrived at Not applicable
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why 59
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding 59 (b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions Not applicable (c) Explain how missing data were addressed Not applicable (d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy Not applicable (e) Describe any sensitivity analyses Not applicable
<b>Results</b>		
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed 56 (b) Give reasons for non-participation at each stage Not applicable (c) Consider use of a flow diagram Not applicable
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social)

		and information on exposures and potential confounders 56
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest Not applicable
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures Not applicable
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included Not applicable (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized Not applicable (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period Not applicable
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses Not applicable
<b>Discussion</b>		
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives 46 / 56
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias 56
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence 54 - 56
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results Not applicable
<b>Other information</b>		
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based 45

\*Give information separately for exposed and unexposed groups.

**Note:** An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at [www.strobe-statement.org](http://www.strobe-statement.org).

## Artigos publicados

2019

Ms. Ref. No.: ETAP-D-19-00661R1

Title: Biomarkers of occupational exposure to pesticides: Systematic review of insecticides

Environmental Toxicology and Pharmacology

by Suelen P Dalmolin; Danielly B Dreon; Flavia V Thiesen; Eliane Dallegrove  
Review Article

## Trabalhos apresentados

Apresentação oral: 39ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Setembro, 2019, Porto Alegre- RS

Apresentação de pôster: "*Fasciola hepatica* extract alters viability, adhesion, migration and invasion properties of synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis". 36º Congresso Brasileiro de Reumatologia. Setembro, 2019, Fortaleza- CE

## Participações/encontros

*Annual European Congress of Rheumatology (EULAR). Junho, 2018, Amsterdam-Netherlands*

21º Jornada Cone Sul de Reumatologia. Agosto, 2018, Gramado- RS

## Resumos publicados em anais

*Annual European Congress of Rheumatology (EULAR):*

*"Fasciola hepatica* extract alters viability, adhesion, migration and invasion properties of synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis"

## Resumos

*Efeito do tratamento com Tofacitinibe na perda muscular em modelo experimental de artrite induzida por colágeno.*

Descrição: A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória, caracterizada pela infiltração de células imunológicas na sinóvia, resultando em hiperplasia sinovial, degradação da cartilagem e erosão óssea. Adicionalmente, pacientes com AR sofrem déficits musculares, como perda de massa magra, redução da área e densidade muscular e comprometimento da função muscular. O citrato de tofacitinibe (CT) foi recentemente aprovado para uso clínico, porém ainda não há estudos que relatem seu efeito nas vias de sinalização do músculo esquelético. OBJETIVO GERAL: Avaliar o efeito do tofacitinibe sobre a atrofia muscular de animais com artrite experimental (CIA). OBJETIVOS ESPECÍFICOS: Mensurar peso dos animais; Avaliar a força muscular; Avaliar escore clínico da artrite; Avaliar o edema das patas posteriores; Avaliar a nocicepção das patas traseiras; Dosar a enzima creatinofosfoquinase (CPK); Medir o peso dos músculos tibial-anterior e gastrocnêmio; Avaliar o escore histopatológico da articulação tíbio-tarsal; Medir o diâmetro das fibras musculares do músculo tibial-anterior; Avaliar a expressão de diversas proteínas relacionadas com a regeneração muscular (MyoD, miogenina), proteólise (miostatina, MuRF-1) através da técnica de Western blot.. , Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. , Integrantes: Suelen Pizzolatto Dalmolin - Integrante / Fabiany da Costa Gonçalves - Integrante / Ricardo Machado Xavier - Coordenador / Jordana Miranda de

Souza Silva - Integrante / Mirian Farinon - Integrante / Renata Ternus Pedó - Integrante / Bárbara Jonson Bartikoski - Integrante / RAFAELA CAVALHEIRO DO ESPIRITO SANTO - Integrante / THAIS EVELYN KARNOPP - Integrante / THALES HEIN DA ROSA - Integrante / MANUELA DOS SANTOS - Integrante.

2018 - Atual

*Avaliação dos níveis de miostatina e de GDF-11 no soro e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide.*

Descrição: A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória, crônica e caracteriza-se por inflamação e degradação das articulações sinoviais, com consequentes limitações funcionais, incapacidade de trabalho e má qualidade de vida. Na AR, os fibroblastos sinoviais (FLS) assumem um fenótipo inflamatório agressivo e invasivo contribuindo para destruição articular. Algumas moléculas, como as miocinas, apresentam função parácrina e endócrina e, nesse sentido, já foi reportado que miostatina e GDF-11 são capazes de agir sobre as células do tecido ósseo, favorecendo a degradação articular. Em AR, há maior expressão de miostatina na membrana sinovial, em comparação com pacientes com osteoartrite (OA), mais especificamente nos FLS. Por outro lado, não é conhecida a ação de GDF-11 na sinóvia de pacientes com AR.. , Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. , Integrantes: Suelen Pizzolatto Dalmolin - Integrante / Ricardo Machado Xavier - Coordenador / Jordana Miranda de Souza Silva - Integrante / Renata Ternus Pedó - Integrante / RAFAELA CAVALHEIRO DO ESPIRITO SANTO - Integrante / MANUELA DOS SANTOS - Integrante / VANESSA HAX - Integrante.

2017 - Atual

*Efeitos da Exposição Subcrônica Inalatória da Associação de Diclorvós e Cipermetrina na Audição de Ratos Wistar.*

Descrição: O estudo objetiva avaliar os efeitos da exposição subcrônica inalatória à associação dos inseticidas organofosforado Diclorvós e piretróide Cipermetrina, na audição de ratos. Para tanto, serão utilizados 36 ratos (12 por grupo) Wistar machos de 60 dias, alocados em 3 grupos: grupo controle (expostos ao veículo água), grupo controle positivo para lesão auditiva (tratados com cisplatina) por 3 dias, 24h antes da eutanásia) e grupo Experimental (exposto à associação de Diclorvós e Cipermetrina). A exposição será realizada durante 4 horas, 5 vezes por semana, por 6 semanas, por meio de uma câmara inalatória acoplada a um nebulizador com fluxo controlado. Serão avaliadas: a presença ou ausência e possíveis mudanças de amplitude de emissões otoacústicas evocadas produto de distorção (EOAPD); variáveis de toxicidade sistêmica como massa corporal, sinais clínicos, níveis de colinesterase plasmática e, após a eutanásia, a massa relativa dos órgãos e histologia pulmonar.. , Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. , Integrantes: Suelen Pizzolatto Dalmolin - Integrante / ALÉXIA DOS REIS - Integrante / ELIANE DALLEGRAVE - Coordenador / Eduarda Oliveira Cunha - Integrante / Dora de Athayde Saul - Integrante / Danielly dos Santos Bassani - Integrante / Mateus Belmonte Macedo - Integrante.

2017 - Atual

*Comparação dos protocolos de descalcificação em diferentes linhagens de roedores para implementação institucional.*

Descrição: A análise histopatológica de um tecido ósseo ou calcificado, exige uma etapa de descalcificação após a fixação, que permite a remoção dos sais de cálcio, necessária à obtenção de bons cortes neste tipo de amostras. A descalcificação se faz necessária nestes tecidos, pois os cristais de cálcio destroem o fio da navalha criando "dentes" que impedem a confecção de bons cortes e levam a formação de artefatos

técnicos, impedindo a análise histológica adequada. A escolha da solução de descalcificação depende da urgência, do grau de mineralização, do interesse da investigação, das técnicas de coloração e do tipo de fixador utilizado. Deseja-se avaliar ao microscópio um preparo no qual os tecidos estejam perfeitamente preservados, apresentando a mesma estrutura e composição química que possuíam quando vivos. Normalmente, soluções de ácido, como o ácido nítrico, estão associadas há efeitos negativos quanto à preservação da morfologia (fraca basofilia nuclear) e antigenicidade dos tecidos, além da integridade do DNA. Quanto mais fortes forem as soluções ácidas e mais duradouro for o processo de descalcificação, mais se acentuam estes efeitos indesejáveis. Por outro lado, o uso de agentes quelantes evita os problemas acima mencionados, mas tem a desvantagem de exigir um tempo de descalcificação mais longo. Objetivo geral Comparar os protocolos de descalcificação utilizando o ácido nítrico 10% e EDTA 12,5% em ratos wistar, camundongos BALB/c, DBA1/J, C57 e AG/WT. Objetivos específicos 1. Avaliar o tempo de descalcificação nos diferentes protocolos e linhagens; 2. Avaliar a qualidade da coloração HE nos diferentes protocolos e linhagens; 3. Avaliar a qualidade da coloração especial nos diferentes protocolos e linhagens; 4. Avaliar a qualidade da técnica de imunohistoquímica nos diferentes protocolos e linhagens; 5. Padronizar o método de descalcificação para amostras mineralizadas de roedores no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA.. , Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. , Integrantes: Suelen Pizzolatto Dalmolin - Integrante / EDUARDA CORREA FREITAS - Integrante / EMILY FERREIRA SALLES PILAR - Coordenador.

2017 - Atual

*Suplementação de vitamina D no envolvimento muscular em modelo experimental de lúpus.*

Descrição: O presente projeto pretende avaliar o envolvimento muscular do lúpus eritematoso sistêmico em modelo experimental induzido por pristane após suplementação de vitamina D e/ou exercício. Isso será analisado por experimentos in vivo utilizando modelo animal de LES induzido por pristane submetidos a suplementação e/ou exercício, onde será avaliado seu papel sobre escore clínico, nocicepção articular, dano histológico muscular e produção de mediadores inflamatórios. Objetivo geral Descrever as alterações histológicas e moleculares do músculo gastrocnêmio, tibial-anterior e sóleo após suplementação de vitamina D e/ou exercício físico aeróbio em esteira inclinada em um modelo experimental de lúpus induzido por pristane. Objetivos específicos 1. Estudar a ação da suplementação de vitamina D nas manifestações clínicas do LES induzido por pristane através de: a. Avaliação de escore clínico visual das articulações; b. Avaliação da mobilidade; c. Avaliação da fadiga; d. Avaliação de força; 2. Estudar a ação da suplementação de vitamina D nas manifestações laboratoriais do LES induzido por pristane através de: a. Variação do perfil hematológico; b. Detecção de proteinúria e alterações do sedimento urinário; 3. Avaliar o peso corporal e o peso dos músculos gastrocnêmio, tibial-anterior e sóleo dos animais; 4. Estudar a ação do treinamento aeróbio em esteira inclinada nas manifestações clínicas do LES induzido por pristane através de: e. Avaliação de escore clínico visual das articulações; f. Avaliação da mobilidade; g. Avaliação da fadiga; h. Avaliação de força.. , Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa. , Integrantes: Suelen Pizzolatto Dalmolin - Integrante / Jordana Miranda de Souza Silva - Integrante / EDUARDA CORREA FREITAS - Integrante / KEVIN ZEBROWSKI FERNANDES - Integrante / ODIRLEI ANDRE MONTICIELO - Coordenador / RAFAELA CAVALHEIRO DO ESPIRITO SANTO - Integrante / THAIS EVELYN KARNOPP - Integrante / THALES HEIN DA ROSA - Integrante.