

Laís Calissi Brisolla Tavares

**Avaliação do efeito terapêutico da associação proteoglicano/VitD3 na
artrite experimental**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista “Julio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, como
exigência parcial para o título de
Bacharel em Ciências Biomédicas

Orientadora: Alexandrina Sartori

Co-orientadora: Larissa Lumi Watanabe Ishikawa

Botucatu – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Tavares, Laís Calissi Brisolla.

Avaliação do efeito terapêutico da associação proteoglicano /vitamina D3 na artrite experimental / Laís Calissi Brisolla Tavares. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Alexandrina Sartori

Capes: 21102007

1. Artrite reumatoide – Estudos experimentais. 2. Proteoglicanos.
3. Vitamina D. 4. Autoimunidade.

Palavras-chave: Artrite experimental; Autoimunidade; Proteoglicano; Vitamina D3.

EPÍGRAFE

O sonho

Sonhe com aquilo que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades
que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem
a importância das pessoas que passaram por suas vidas.

Clarice Lispector

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho e toda a minha formação à minha família inteira, especialmente aos meus pais Rosa e Paulo, minha irmã Ísis e meus avós Ioni e Mário.

Porque cada membro da minha família desempenhou um papel único e importante ao longo desses quatro anos.

Por cada um sempre ter me oferecido amor, compreensão e amizade incondicionais.

Por aqueles cinco terem estado sempre tão presentes mesmo longe, por terem sido meu porto seguro, meu conforto, minha força e minha inspiração.

Por terem me ensinado bons valores, humildade, paciência e a ser dedicada.

Por me darem liberdade, apoio e estrutura para que eu pudesse escolher e sair em busca do meu sonho.

Por estes sempre terem acreditado, mesmo quando eu estava desacreditada. Sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Pai Celestial pela oportunidade de estar aqui vivendo essa experiência e por ter me permitido viver essa vida maravilhosa, repleta de ‘acazos’ tão acertados e rodeada de pessoas tão queridas.

À minha orientadora Alexandrina Sartori, por ter me acolhido em sua equipe e confiado em mim. Por ter me ensinado com paciência a Imunologia, a Escrita Científica, o raciocínio da Pesquisa e muitas técnicas, além de ser um exemplo de profissional para mim.

À minha co-orientadora Larissa Lumi Watanabe Ishikawa, que sempre esteve ao meu lado para me assistir e ajudar. Aprendi muito com você! Todo o seu otimismo, o seu incentivo e sua vontade foram fundamentais para o meu aprendizado e para “o bom andamento” do meu projeto! Esteve sempre pronta para me ajudar e tirar minhas dúvidas nas férias, no fim de semana, à noite depois do estágio...fazendo hora extra para me acompanhar sempre, o que me dava a sensação que tudo ia dar certo. Devo muito à você, espero que você possa imaginar o quanto!

Às meninas do então laboratório de Vacinas e Imunomodulação, as quais me aceitaram e acolheram da melhor maneira possível: Sofia, Larissa (Dutra), Priscila, Fernanda, Larissa (Akú) e Thaís. Serei eternamente grata por ter tido a oportunidade de trabalhar e aprender com vocês. Não poderia ter iniciado em um ambiente melhor; com vocês aprendi Imunologia e a me virar no meio científico, aprendi muitas técnicas, protocolos e procedimentos, bem como a ser prestativa e a me portar frente a uma equipe de trabalho. Vocês foram fundamentais na minha formação profissional, aprendi muito mesmo com vocês.

À família Fracotes Suyen (D-vassa), Juliana (Sarnentinha), Fernanda (Mirrada), Marília (Suindara) e Ana Maria (Matinho). Com vocês vivi e dividi meus quatro anos de faculdade, minhas felicidades, minhas tristezas, minhas piadas, minhas comidas...minha vida. A República foi a melhor coisa que me aconteceu em Botucatu e jamais esquecerei de vocês. Que possamos seguir “com toda a força” sempre! Porque morar com vocês realmente não foi só dividir contas.

À Turma XLV de Ciências Biomédicas da UNESP Botucatu.

Às amigas Cecília (Dupexe), Niele (Lady Murf), Muriel (Sarninha), Cristiane (Dofa), Viviane (Pint) e Natália (Figueirinha) por terem sido motivo de eu ter aguentado até o fim. Por todas as risadas, histórias, festas, comidas, desabafos e apoio incondicional. Tenho orgulho de chamar cada uma de vocês de ‘amiga’. Agora vocês moram no meu coração. Sucesso a todas nós!

À Comissão Organizadora do Interbiomed, entre veteranos e bixos, por ter me ensinado e perpetuado uma paixão, bem como a valorizar trabalhos muitas vezes realizados unicamente através de muito esforço, querer, perseverança e amor.

Ao Kelvin (Nano) por ser tão importante, presente, carinhoso e prestativo nesse momento da minha vida.

Aos meus avós Mário, Ioni e em memória da minha avó Therezinha, por terem feito tão bem o papel de pais durante a minha faculdade.

Aos meus pais Rosa e Paulo, por terem me proporcionado condições de viver meu sonho e por serem os melhores pais que eu jamais poderia escolher.

À minha irmã Ísis, por ter se tornado minha amiga e conselheira, sempre pronta ao telefone.

À todos os meus familiares por todo o amor, carinho e suporte.

Aos meus tios Carmo e Yura, pela orientação, pela disponibilidade, dicas e oportunidades, e por estarem sempre de portas abertas quando precisei de São Paulo.

Aos meus amigos de Santa Catarina Murilo, Bárbara, Camila e Luanna , que nunca me deixaram esquecer de onde eu vim e quem eu sou, e sempre arrumaram tempo em suas vidas para me receberem de volta uma vez por ano. Esses amigos que mesmo na distância e no silêncio sempre me reencontram como se nem um dia tivesse se passado; esses amigos que são páginas fundamentais da minha infância, adolescência, de momentos decisivos da minha vida e da profissional que estou me tornando.

A todos os funcionários e professores do campus da UNESP Botucatu, especialmente do Departamento de Microbiologia e Imunologia por terem proporcionado todas as condições necessárias a minha formação.

À própria UNESP – Botucatu pela excelente formação profissional, pessoal e pela experiência universitária única que tive a chance de experimentar aqui.

À FAPESP, que aprovou meu projeto e me concedeu a bolsa de Iniciação Científica (processo nº 2012/00605-7), sem a qual seria muito mais difícil ter desenvolvido esse projeto.

E a todos que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento e concretização deste trabalho.

RESUMO

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica de caráter autoimune que compromete as articulações. A maioria das terapias aprovadas para o tratamento desta e outras patologias autoimunes é baseada na inibição global da resposta imune, o que aumenta a susceptibilidade aos agentes infecciosos.

O objetivo geral deste projeto foi definir se a associação de vitamina D (VitD3) com o antígeno proteoglicano (PG) é tolerogênica e serve como medida terapêutica. Para isso, utilizamos o modelo de artrite experimental obtido pela imunização de camundongos BALB/c com PG. Inicialmente, os animais foram imunizados com diferentes doses do antígeno específico (PG) na presença de VitD3 para determinação da dose tolerogênica. O potencial terapêutico da estratégia mais tolerogênica foi testado no período pré-clínico da doença, isto é, no período após o aparecimento do nível máximo de anticorpos anti-PG, mas antes das manifestações clínicas da artrite (eritema e edema articular). A eficácia terapêutica foi avaliada através da incidência de artrite e do escore clínico da doença. O possível mecanismo imunológico envolvido no efeito terapêutico foi estudado por avaliação dos níveis de citocinas (IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e IL-17) produzidas por células esplênicas estimuladas *in vitro* com PG.

Analisados em conjunto, os resultados obtidos mostraram que os três procedimentos (PG, VitD3 e PG+VitD3) determinaram efeito terapêutico. Entretanto, a análise mais detalhada, incluindo número de animais com escore clínico maior que oito (escore > 8), início dos sintomas clínicos e escore máximo atingido, sugere que o uso de PG50 (50 μ g de PG) associado à VitD3 ou o uso isolado de VitD3 foram os procedimentos terapêuticos mais eficazes. A produção mais elevada de IL-10 nestes dois grupos sugere contribuição desta citocina neste efeito terapêutico.

SUMÁRIO

Introdução	08
Artrite reumatóide: características gerais e imunopatogênese	08
Modelos experimentais de artrite	09
Estratégias imunoterapêuticas na artrite	09
Efeito da vitamina D no sistema imunológico	10
Racional Científico da Proposta	13
Objetivo Geral	13
Objetivos Específicos	13
Materiais e Métodos	14
Animais	14
Indução de artrite experimental	14
Tratamento com vitamina D	14
Reação de hipersensibilidade tardia (DTH)	14
Avaliação da resposta imune	14
Análise estatística	15
Protocolos Experimentais e Resultados	16
Protocolo experimental 1	16
Resultados	17
Avaliação da DTH	17
Produção de citocinas	18
Protocolo experimental 2	25
Resultados	26
Incidência e escore clínico	26
Níveis de anticorpos específicos	27
Protocolo experimental 3	28
Resultados	29
Incidência e escore clínico	29
Produção de citocinas	32
Discussão	35
Referências	39

INTRODUÇÃO

Artrite reumatóide: características gerais e imunopatogênese

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica que usualmente acomete pequenas articulações das extremidades, sendo os dedos particularmente afetados. Articulações maiores, incluindo ombros, cotovelos, joelhos e tornozelos podem também ser afetadas. É considerada a doença autoimune sistêmica mais freqüente, afetando entre 0,5 e 1% da população adulta. O processo inflamatório caracteriza-se por uma sinovite associada à destruição do osso e da cartilagem. O quadro inflamatório na artrite sugere a participação tanto de resposta imune humoral quanto celular (Figura 1).

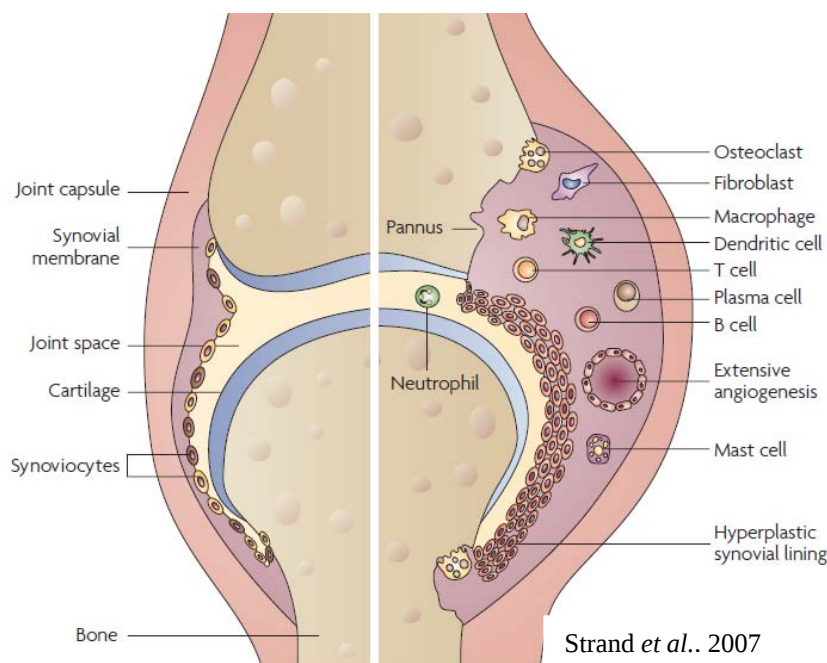


Figura 1: Representação esquemática de duas articulações: normal (esquerda) e com artrite (direita). Na articulação saudável a membrana sinovial encontra-se delgada e não há inchaço. Na artrite reumatóide a membrana sinovial encontra-se hiperplásica e infiltrada com células inflamatórias.

Apesar de ser considerada uma doença autoimune, não existe ainda um consenso sobre os autoantígenos envolvidos na mesma. Entre os possíveis candidatos a autoantígenos nesta patologia são descritos: componentes da cartilagem, proteínas chaperonas, enzimas, proteínas nucleares e proteínas citrulinadas (Imboden, 2009; Song & Kang, 2010). Entre os numerosos tipos celulares encontrados na articulação inflamada, células TCD4⁺ com fenótipo Th1 são descritas como as mais relevantes nesta patologia. Macrófagos ativados também constituem uma fonte importante de fatores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias. Numerosas citocinas, incluindo IL-1, IL-8, TNF- α e IFN- γ têm sido detectadas no líquido sinovial. Acredita-se que estas citocinas, em especial o TNF- α , ativem as células sinoviais residentes a produzir enzimas proteolíticas que

medeiam a destruição da cartilagem, ligamentos e tendões das articulações. Nos últimos anos, tem sido evidenciada a presença de IL-17 no sítio da inflamação e seu efeito sinérgico com o TNF- α , agravando o processo inflamatório (Koenders & Van den Berg, 2010).

A participação de células B nesta patologia vem sendo mais enfatizada e investigada nos últimos anos. Entre seus possíveis papéis se destacam a produção de autoanticorpos e de citocinas, apresentação de autoantígenos para os linfócitos T e organogênese ectópica linfóide (Martinez-Gamboa *et al.*, 2006). A participação de células T reguladoras (Tregs), em função do potencial terapêutico e profilático destas células, vem sendo amplamente estudada tanto em artrite humana quanto experimental (Oh *et al.*, 2010). Estas células Tregs incluem diferentes tipos celulares caracterizados pela secreção de determinadas citocinas, tais como IL-10 (Tr1), TGF- β (Th3) ou a expressão constitutiva de CD25 (células T reguladoras naturais). O balanço entre estas células Tregs e as Th efetoras (principalmente Th1 e Th17) parece ser o fator determinante na evolução da AR e de outras doenças autoimunes. Em consequência, o elevado potencial regulatório das células Tregs as torna um alvo terapêutico muito investigado na AR (van Roon *et al.*, 2006).

Modelos experimentais de artrite

Existem vários modelos experimentais sendo utilizados para o estudo desta doença, podendo ser induzidos por diferentes estímulos. Entre estes estímulos se destacam componentes específicos da cartilagem (colágeno e proteoglicano), adjuvante, óleo, pristane e agentes exógenos como bactérias e vírus (van den Berg, 2009).

O modelo experimental escolhido para desenvolver este projeto é baseado na imunização de camundongos BALB/c com proteoglicano (PG) que é um componente da cartilagem. Este modelo é denominado “Proteoglycan induced arthritis (PGIA)” e foi descrito com detalhes por Glant & Mickecz, 2004. Neste caso, a artrite autoimune sistêmica é induzida pela inoculação intraperitoneal de camundongos BALB/c ou determinadas colônias de C3H com PG isolado de humanos, porcos, cães, ovelhas ou bovinos. Vários aspectos imunológicos já estão sendo caracterizados neste modelo como, por exemplo, o mapeamento dos epítomos artritogênicos reconhecidos por células T (Buzás *et al.*, 2005). A contribuição de diferentes citocinas na imunopatogênese desta doença, tais como IL-12, IL-8, IFN- γ e IL-17, também vem sendo esclarecida com o auxílio deste modelo de artrite (Doodes *et al.*, 2010; Finnegan *et al.*, 2010).

Estratégias imunoterapêuticas na artrite

A maioria das terapias aprovadas para tratamento das patologias autoimunes é baseada na inibição global da resposta imune o que, evidentemente, tem efeitos colaterais, em especial o

aumento da susceptibilidade aos agentes infecciosos. Por isto, a tendência nesta área de pesquisa é o estabelecimento de estratégias imunomoduladoras como, por exemplo, a indução de tolerância antígeno-específica e a indução/ativação de células Tregs.

A vacinação com antígenos próprios para promover tolerância específica para autoantígenos (vacinação negativa) seria, teoricamente, a forma mais segura de evitar as patologias autoimunes. Estudos empregando roedores como modelos experimentais mostram que a autotolerância pode ser induzida por diferentes estratégias tais como: administração do autoantígeno por via tolerogênica (mucosa oral, por exemplo), bloqueio concomitante de moléculas co-estimulatórias ou direcionamento do autoantígeno para células apresentadoras de antígenos (APCs) em repouso. Dentro deste contexto, destacam-se os estudos que visam definir as condições ideais para a indução de células dendríticas (DCs) tolerogênicas. Apesar de caracterizadas tradicionalmente como fortes indutoras de resposta imune, incluindo respostas autorreativas em patologias autoimunes, achados mais recentes implicam estas APCs não só na indução como também na manutenção da tolerância aos autoantígenos nos modelos experimentais. Esta dicotomia funcional das DCs é determinada por vários fatores, sendo que um dos mais relevantes parece ser seu estágio de diferenciação/maturação e ativação e também sua origem hematopoiética. Por exemplo, DCs imaturas podem prevenir ou mesmo reverter artrite e diabetes em modelos murinos (Thomson & Robbins, 2008). O desenvolvimento de DCs tolerogênicas/supressoras depende, em grande parte, dos fatores presentes no microambiente onde a DC está se diferenciando. Neste sentido, destacam-se a presença de citocinas supressoras tais como IL-10 e TGF- β e outros fatores como fator de crescimento de hepatócitos, G-CSF, prostaglandina E2 e histamina (Taub, 2004; Kaliński *et al.*, 1998). Mais recentemente, foi constatado que vários agentes farmacológicos, incluindo corticosteróides, ciclosporina A (CsA), rapamicina, micofenolato mofetil, prostaglandina E2 e vitD3, conferem propriedades tolerogênicas às DCs (Hackstein & Thomson, 2004; Adorini *et al.*, 2004). A promoção/manutenção de tolerância por DCs tem sido atribuída a diferentes mecanismos imunológicos: indução de anergia ou apoptose de células T virgens ou de memória (Süss & Shortman, 1996), ativação seletiva de células Th2 (Khoury *et al.*, 1996) e indução de células Tregs (Menges *et al.*, 2002). Segundo a literatura, as DCs tolerogênicas estão muito próximas de serem adotadas no tratamento de AR em humanos (Thomson & Robbins, 2008).

Efeito da vitamina D no sistema imunológico

Este projeto é baseado no potencial tolerizante da vitamina D3 quando associada a determinado antígeno. O hormônio 1,25(OH)₂D3, também denominado calcitriol, é a forma ativa da vitamina D3 e seus efeitos biológicos são mediados pelo receptor para vitamina D (VDR) que é

um membro da superfamília de receptores nucleares para hormônios. O VDR é encontrado em muitos tipos celulares incluindo células do sistema imunológico tais como monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B e T ativados. Este receptor funciona como um fator de transcrição que se liga a determinadas sequências do DNA (Calberg & Polly, 1998).

São descritos a seguir os principais efeitos deste hormônio na imunidade inata e específica. Na imunidade inata, o calcitriol diminuiu a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α quando adicionado em monócitos humanos. Este efeito é mediado por interação com receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4) (Du *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* também indicam que esta vitamina inibe a proliferação de células T, a produção de IL-2 e de IFN- γ (Dimeloe *et al.*, 2010). Já o efeito deste hormônio sobre células Th2 é menos claro; sendo que alguns relatos indicam aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10 (Boonstra *et al.*, 2001), enquanto outros mostram redução no número de células produtoras de IL-4 ou até mesmo ausência de efeito (Dimeloe *et al.*, 2010). A dependência das concentrações utilizadas *in vitro* tem sido apontada como causa destes resultados contraditórios. Este efeito inibidor de Th1 e esta variabilidade na expressão de Th2 também têm sido constatados em modelos murinos de doenças autoimunes (Mattner *et al.*, 2000; Overbergh *et al.*, 2000).

A complexidade do efeito da vitD3 sobre as células T vem sendo, aos poucos, esclarecida. Sabe-se, por exemplo, que a inibição da proliferação pode ocorrer tanto sobre as células T virgens quanto sobre células T já diferenciadas e comprometidas (Piemonti *et al.*, 2000; van Halteren *et al.*, 2002). Parte da atividade imunorreguladora do calcitriol tem sido atribuída aos seus efeitos sobre DCs e conseqüente indução de células Tregs. DCs humanas diferenciadas na presença de calcitriol são imaturas e se caracterizam por expressão reduzida de CD1a e MHC II (moléculas apresentadoras de antígenos) e de CD40, CD80 e CD86 (moléculas co-estimulatórias) (Adorini & Penna, 2009). Estas células também produzem menor quantidade de IL-12 (citocina pró-inflamatória envolvida na diferenciação de Th1) e maior concentração de IL-10 (citocina anti-inflamatória). Estes efeitos determinam uma condição tolerogênica na qual estas DCs se tornam incapazes de estimular a proliferação de células T. Este fenômeno tem sido, pelo menos em parte, atribuído à geração de células T com atividade supressora, pois a co-cultura de DCs pré-tratadas com calcitriol e células T CD4⁺ CD25⁺ leva à indução de células Tregs CD4⁺ Foxp3⁺ (Penna *et al.*, 2005). Foi recentemente descrito que esta indução de Tregs é altamente dependente da expressão de PD-L1 na superfície das DCs (Wendy *et al.*, 2009). Outra subpopulação de Th afetada pela vit D3 é a Th17. A administração de calcitriol teve um efeito inibidor sobre a resposta Th17 tanto na colite quanto na uveíte (Daniel *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009).

No contexto deste projeto, várias publicações ilustram o papel benéfico da vitD3 em modelos experimentais de doenças autoimunes. Foi demonstrado, por exemplo, que o tratamento de camundongos NOD adultos com um análogo do calcitriol inibiu a produção de IL-12 e IFN- γ ,

impediu a infiltração de células Th1 no pâncreas e bloqueou a progressão da insulite. Os autores ainda demonstraram que este bloqueio na evolução da insulite foi acompanhado de uma frequência aumentada de células Tregs CD4⁺ e CD25⁺ no pâncreas e nos linfonodos capazes de retardar significativamente a transferência adotiva da doença (Gregori *et al.*, 2002). Na encefalite autoimune experimental foi demonstrado que o efeito inibidor do calcitriol no desenvolvimento dessa doença foi dependente de uma via de sinalização envolvendo a IL-10 (Spach *et al.*, 2006). Achados bem recentes em pacientes com esclerose múltipla indicam correlação entre os níveis séricos de VitD3 e a frequência e função de células Tregs. No estudo de Smolders *et al.*, 2009, constatou-se que os níveis séricos de vitD3 se correlacionaram positivamente com a capacidade de células Tregs de suprimir a proliferação de linfócitos T. Os resultados descritos por Royal *et al.*, 2009 foram similares. Neste caso, os autores mostraram uma correlação inversa entre os níveis séricos de VitD3 e o percentual de células Tregs. No modelo de uveíte autoimune experimental foi constatado que o calcitriol suprime a autoimunidade através da inibição da resposta de células Th17, interferindo na capacidade de ativação, diferenciação e produção de citocinas por estas células (Tang *et al.*, 2009).

RACIONAL CIENTÍFICO DA PROPOSTA

Nossa hipótese de trabalho é que este efeito imunomodulador da VitD3 associado com a presença de antígeno específico (PG), disponibilizado ao sistema imunológico através da imunização via intraperitoneal, tenha um efeito terapêutico mais eficaz do que a VitD3 sozinha. É justamente neste aspecto que se encontra o diferencial desta proposta: a utilização de VitD3 *in vivo*, e não *in vitro* como descrito na maioria dos trabalhos, para desencadear uma tolerância específica. Neste contexto, o objetivo geral do presente projeto é avaliar se a imunização com proteoglicano (PG) na presença de VitD é capaz de induzir tolerância antígeno específica e se ela tem efeito terapêutico na artrite experimental induzida por este antígeno. Espera-se que o processo de imunização com o antígeno na presença deste fármaco polarize a resposta imune no sentido da tolerância. Este resultado é esperado em função dos dados já publicados na literatura que indicam que esta droga é capaz de modular a resposta imune em vários níveis, os quais, em conjunto, determinam uma diminuição da polarização Th1/Th17.

Nossa previsão é que ocorra indução de tolerância específica também *in vivo* e que esta estratégia seja capaz de impedir a evolução de um quadro pré-clínico para um estado de artrite clínica. Esta hipótese é baseada no fato de que a VitD3 é capaz de atuar tanto em células T virgens como em células T efectoras, como é o caso desta proposta terapêutica.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial terapêutico da associação de VitD3 ao proteoglicano (PG) em modelo de artrite induzida por este antígeno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a eficácia tolerogênica da imunização com diferentes doses de PG associado à VitD3;
2. Caracterizar o período pré-clínico da artrite experimental induzida por proteoglicano;
3. Avaliar o efeito terapêutico da VitD3 no período pré-clínico da artrite experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas *retired breeders*, provenientes do CEMIB - UNICAMP. Os animais receberam ração comercial autoclavada e água filtrada *ad libitum*. Foram acondicionados em caixas de polipropileno com maravalha de pinho autoclavada e mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, sob condições ambientais adequadas.

Indução de artrite experimental

Para a indução da artrite, os camundongos foram imunizados com três doses de PG bovino (Sigma) associado com brometo de dimetil dioctadecil amônio (DDA) (Sigma) por via intraperitoneal, com intervalo de 21 dias entre cada dose, conforme descrito por Glant & Mikecz, 2004. A avaliação do escore clínico foi realizada diariamente após a terceira imunização, atentando para qualquer sinal da artrite, principalmente vermelhidão e inchaço. Seguimos a escala de 0 a 4 para indicar o grau da artrite em cada pata e a escala de 0 a 16 por animal para expressar a gravidade da doença, como descrito por Hanyecz *et al.*, 2004.

Tratamento com vitamina D

Os animais foram inoculados intraperitonealmente com 0,1µg de VitD3 (Sigma) em dias alternados durante 15 dias e o PG foi co-administrado nos dias 3 e 11.

Reação de hipersensibilidade tardia (DTH)

Inicialmente analisamos o efeito tolerogênico de três diferentes doses de PG associado com VitD3 através da DTH. Uma semana após o tratamento com VitD3, os animais foram imunizados com PG associado ao DDA (PG+DDA), para avaliar a eficácia desta estratégia tolerogênica. A avaliação da DTH foi realizada sete dias após a imunização com PG+DDA, através da inoculação de 10µg de PG no coxim plantar. A espessura das patas foi avaliada antes e 24h após a inoculação do PG.

Avaliação da resposta imune

Para a avaliação da resposta imune celular, células esplênicas dos animais dos grupos estudados foram re-estimuladas *in vitro* para a indução de diferentes citocinas. Para isso, os baços dos animais foram coletados, desagregados e as células ressuspensas em meio RPMI (Sigma) contendo gentamicina e soro bovino fetal. Para a indução da produção de citocinas, as células totais foram estimuladas com ConA (5µg/mL) ou PG (50µg/mL) e incubadas na estufa a 37°C / 5% CO₂

durante 48 horas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados a -20°C para posterior dosagem de TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-10 e IL-17. Estas citocinas foram quantificadas através de ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo as instruções do fabricante (R&D Systems e BD Biosciences). A avaliação da resposta imune humoral foi feita por detecção de anticorpos específicos anti-PG em diferentes momentos durante o desenvolvimento da artrite. Para isso, amostras de sangue dos animais foram coletadas 2 dias antes de cada imunização com PG+DDA e 5 dias após a última imunização através da veia facial. Ao final do experimento, o sangue foi coletado por punção cardíaca imediatamente após eutanásia. O soro foi obtido através da centrifugação do sangue a 6000 rpm, por 15 minutos, a 25°C e os anticorpos específicos IgG1 e IgG2a anti-PG séricos foram detectados através de ELISA.

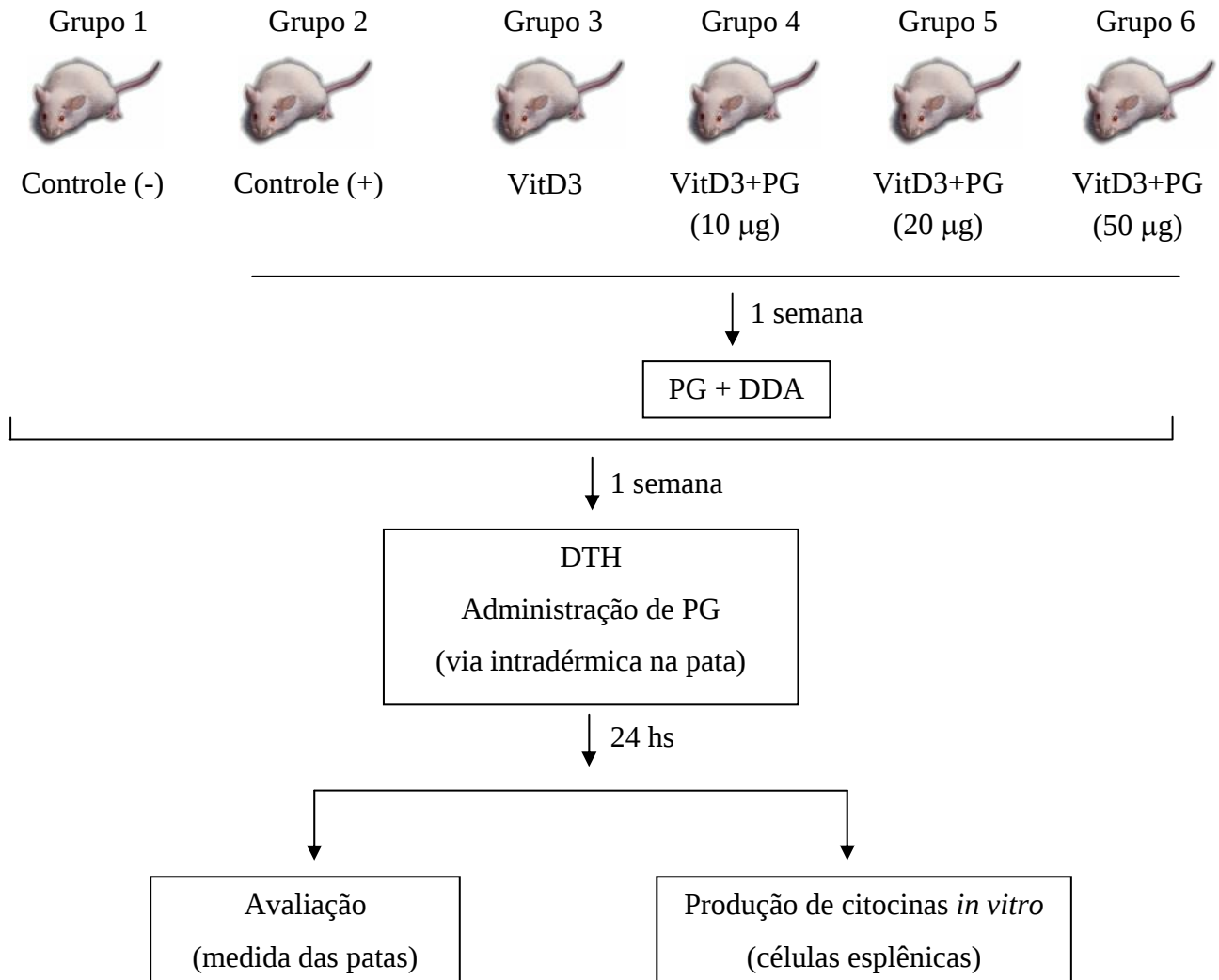
Análise estatística

A variação da espessura da pata, a produção de citocinas e a média do escore clínico foram comparadas por meio de ANOVA ou teste Kruskal-Wallis, dependendo da análise descritiva dos dados. Neste caso, para as variáveis paramétricas, foi utilizada ANOVA seguida de teste comparativo de Tukey e os resultados obtidos foram apresentados em média e desvio padrão. Para as variáveis não paramétricas, foi feito o teste Kruskal-Wallis seguido de teste comparativo de Dunn's e os resultados foram apresentados em mediana. Para comparar a produção de anticorpos em diferentes momentos, foi utilizado RM ANOVA. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SigmaPlot para Windows versão 11.0 (Jandel Corporation, CA, EUA) e o nível de significância adotado foi de 5%.

PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1

Objetivo: Avaliar a eficácia tolerogênica de diferentes doses de PG associado à VitD3.



RESULTADOS

Avaliação da DTH

Conforme esperado, não observamos aumento significativo na espessura das patas dos animais do grupo Controle (-) (não imunizado e desafiado com PG na pata), mas constatamos um aumento significativo na espessura das patas dos animais do grupo Controle (+) (animais previamente imunizados com PG+DDA). O tratamento prévio somente com VitD3 determinou queda na DTH, mas essa diminuição não foi estatisticamente diferente do grupo Controle (+). A imunização prévia com diferentes doses de PG associado à VitD3 determinou diminuição da DTH, mas somente o grupo imunizado com a dose mais elevada de PG (PG50) apresentou diferença significativa em relação ao grupo Controle (+). Estes dados podem ser observados na figura 2.

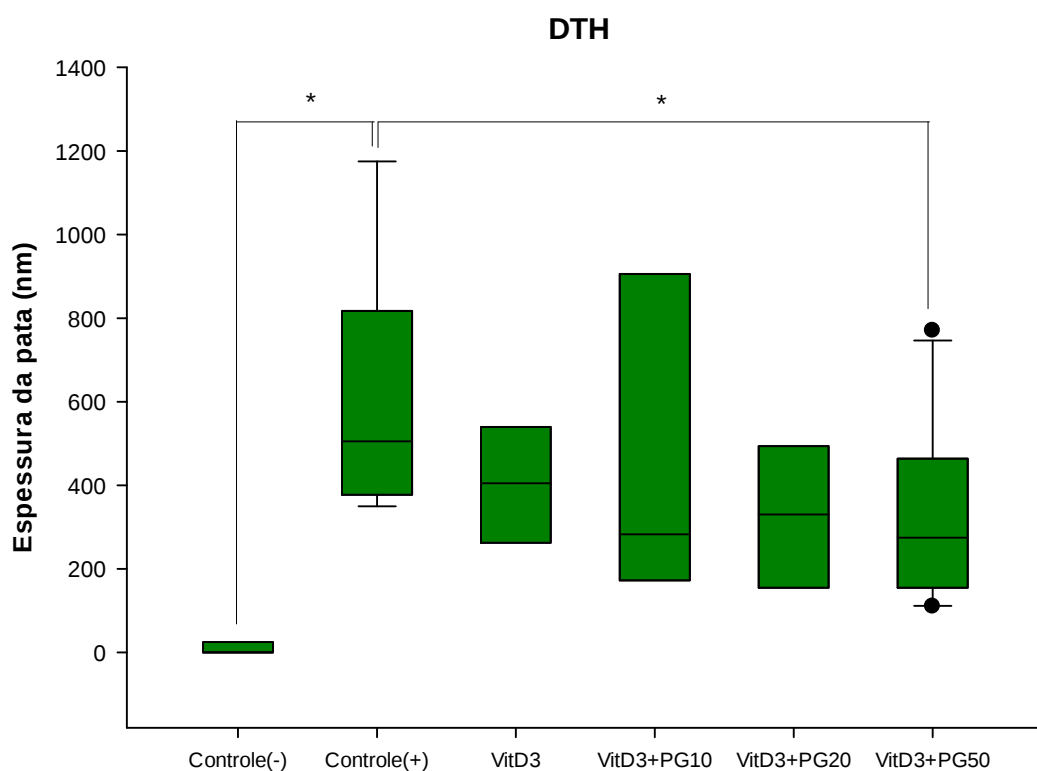


Figura 2: Avaliação da indução de tolerância específica através da reação de hipersensibilidade tardia (DTH) em animais que receberam vitamina D ativa (VitD3). Média da espessura da pata de camundongos BALB/c que receberam VitD3 associada a 10, 20 ou 50 µg de proteoglicano (PG) bovino. Controle (-): grupo de animais não imunizados com PG+DDA e desafiados com PG. Controle (+): grupo de animais imunizados com PG+DDA e desafiados com PG (n = 4 a 10 animais por grupo). *p < 0,05.

Produção de citocinas

Os níveis de citocinas nos diferentes grupos foram estatisticamente comparados em três condições distintas: sem estímulo, estímulo com ConA e estímulo com PG.

Não detectamos produção de TNF- α nas culturas estimuladas com PG, mas os níveis desta citocina estavam igualmente elevados nas culturas de todos os grupos experimentais estimulados com ConA (figura 3). Quanto aos níveis de IFN- γ , houve produção em culturas não estimuladas, ou seja, adicionadas apenas de meio de cultura, e também nas culturas estimuladas com PG. Nestas duas condições, os níveis desta citocina estavam mais elevados nas culturas provenientes dos animais imunizados em comparação com o grupo Controle (-). No entanto, somente os níveis do grupo VitD3+PG50 estavam significativamente mais elevados do que o grupo Controle (-). Também constatamos que nessas condições os níveis de IFN- γ estavam mais elevados, embora sem diferença estatística, nos grupos Controle (+) e VitD3+PG50 (figura 4A e 4C). Os níveis de IFN- γ em resposta ao estímulo com ConA foram similares nos diferentes grupos experimentais (figura 4B).

Foi detectada a produção de IL-6 em culturas sem estímulo, estimuladas com PG e estimuladas com ConA. O perfil de produção dessa citocina foi muito similar no grupo sem estímulo e no grupo estimulado com PG. No caso do estímulo com PG, os grupos Controle (+) e VitD3+PG50 produziram níveis mais elevados de IL-6 do que o grupo Controle (-). Foi observada uma elevada produção de IL-6 em todos os grupos experimentais estimulados com ConA. Neste caso, os níveis de IL-6 nos grupos VitD3+PG10 e VitD3+PG20 estavam significativamente mais baixos do que no grupo VitD3+PG50 (figura 5).

Não houve produção de IL-17 nas culturas estimuladas com PG, mas nas culturas ativadas com ConA ocorreu produção dessa citocina em todos os grupos, sendo que os níveis estavam significativamente mais elevados no grupo VitD3 do que nos grupos VitD3+PG10 e VitD3+PG20 (figura 6).

Detectou-se a produção espontânea de IL-5 nas culturas não estimuladas, sendo que nestas condições os níveis observados nas culturas dos animais do grupo VitD3+PG50 estavam significativamente maiores do que no grupo Controle (-). O re-estímulo das culturas com PG aumentou a produção de IL-5 nos três grupos inicialmente tratados com VitD3+PG, entretanto, somente o aumento observado no grupo VitD3+PG50 foi estatisticamente significativo. Nas culturas estimuladas com ConA todos os grupos experimentais produziram níveis elevados desta citocina. No entanto, os níveis de IL-5 no grupo VitD3+PG50 foram os mais elevados, sendo significativamente maiores do que os grupos Controle (-), Controle (+) e VitD3 (figura 7).

Foi detectada uma produção espontânea significativa de IL-10 somente nas culturas provenientes do grupo VitD3+PG50. Além disso, após estímulo com PG, os níveis desta citocina aumentaram significativamente neste grupo em comparação com os grupos Controle (+), Controle (-) e VitD3. Nas culturas estimuladas com ConA, detectamos produção dessa citocina em todos os grupos experimentais; todavia, os níveis no grupo VitD3+PG50 estavam significativamente maiores em comparação com o grupo VitD3 (figura 8).

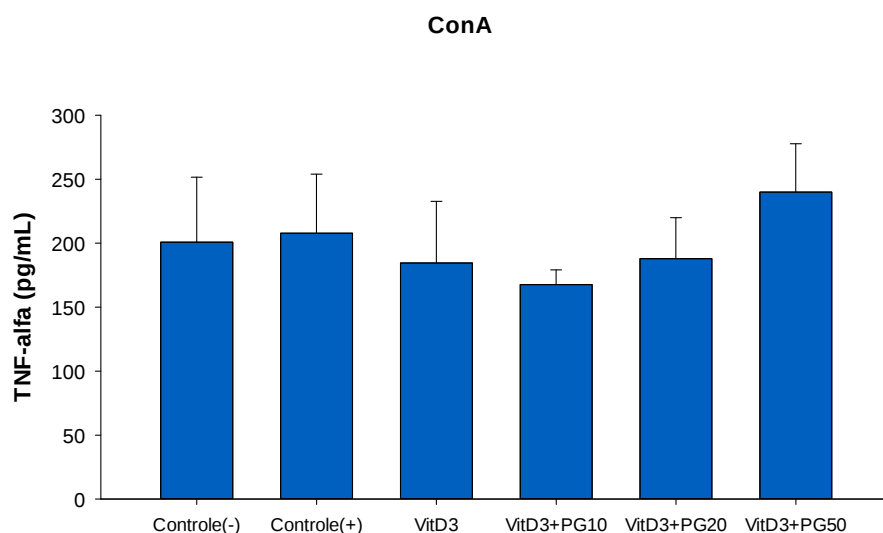


Figura 3: Produção de TNF- α por células esplênicas de camundongos BALB/c *retired breeders* tolerizados com PG+VitD3. Culturas estimuladas com ConA. Controle (-): grupo de animais não imunizados com PG+DDA e desafiados com PG. Controle (+): grupo de animais imunizados com PG+DDA e desafiados com PG (n = 4 a 7 animais por grupo).

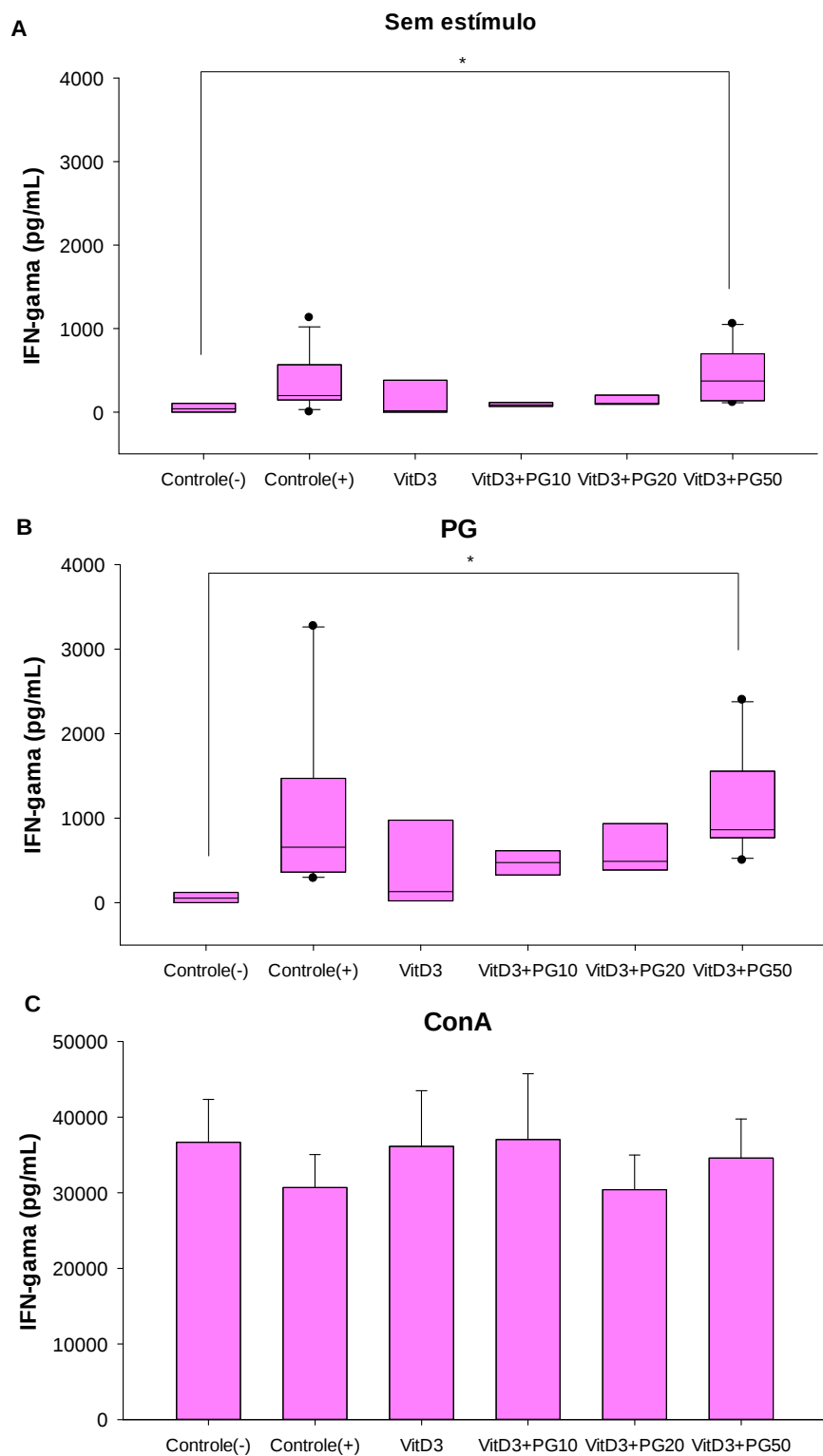


Figura 4: Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos BALB/c *retired breeders* tolerizados com PG+VitD3. A. Células esplênicas não estimuladas. B. Células estimuladas com PG. C. Células estimuladas com ConA. Controle (-): grupo de animais não imunizados com PG+DDA e desafiados com PG. Controle (+): grupo de animais imunizados com PG+DDA e desafiados com PG (n = 4 a 7 animais por grupo). *p < 0,05.

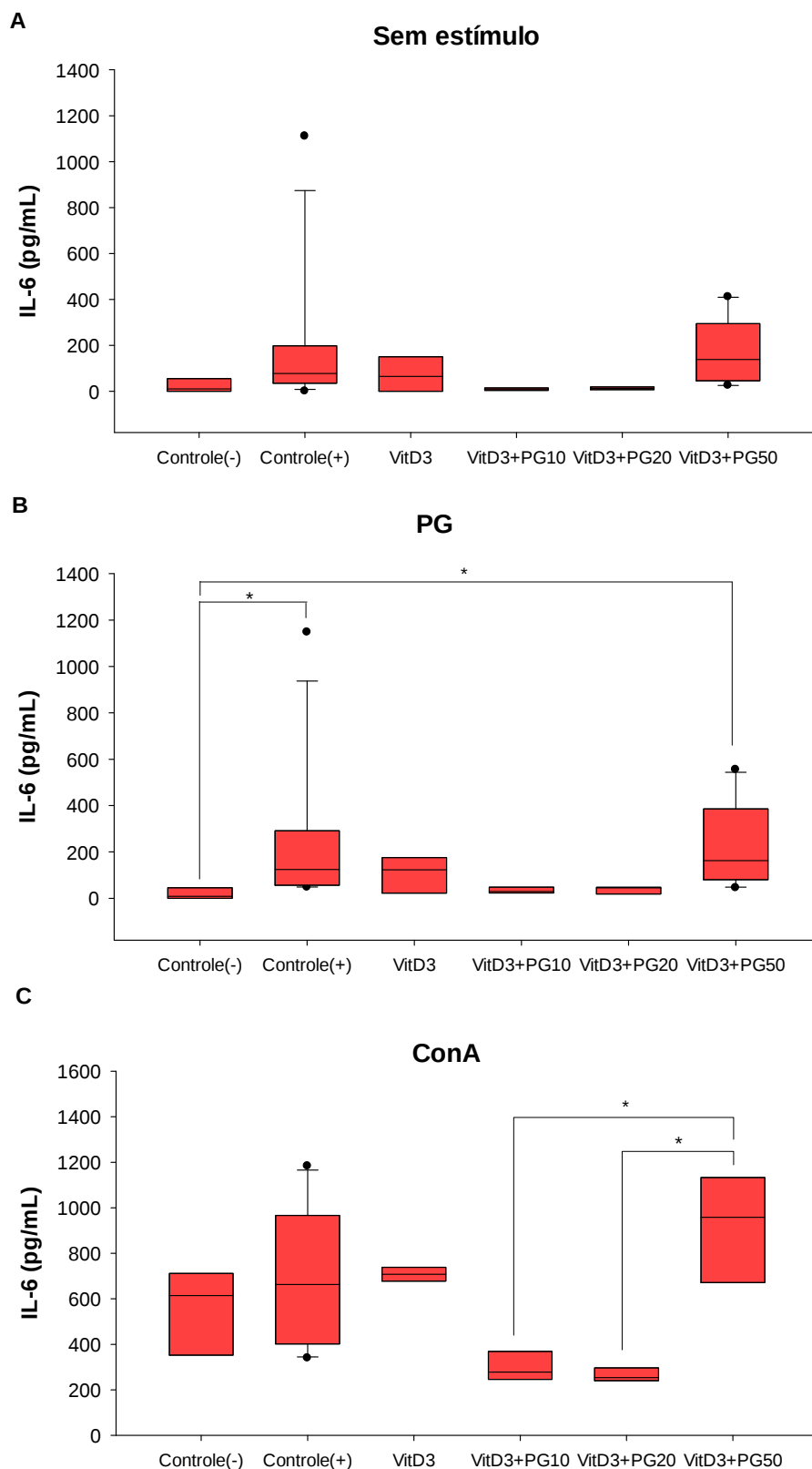


Figura 5: Produção de IL-6 por células esplênicas de camundongos BALB/c *retired breeders* tolerizados com PG+VitD3. A. Células esplênicas não estimuladas. B. Células estimuladas com PG. C. Células estimuladas com ConA. Controle (-): grupo de animais não imunizados com PG+DDA e desafiados com PG. Controle (+): grupo de animais imunizados com PG+DDA e desafiados com PG (n = 4 a 7 animais por grupo). *p < 0,05.

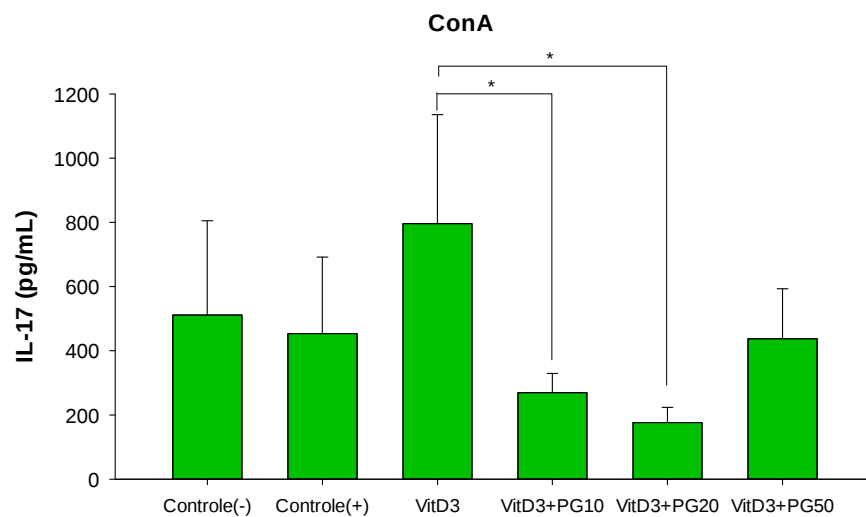


Figura 6: Produção de IL-17 por células esplênicas de camundongos BALB/c *retired breeders* que receberam vitamina D associada ao proteoglicano. Culturas estimuladas com ConA. Controle (-): grupo de animais não imunizados com PG+DDA e desafiados com PG. Controle (+): grupo de animais imunizados com PG+DDA e desafiados com PG (n = 4 a 7 animais por grupo). *p < 0,05.

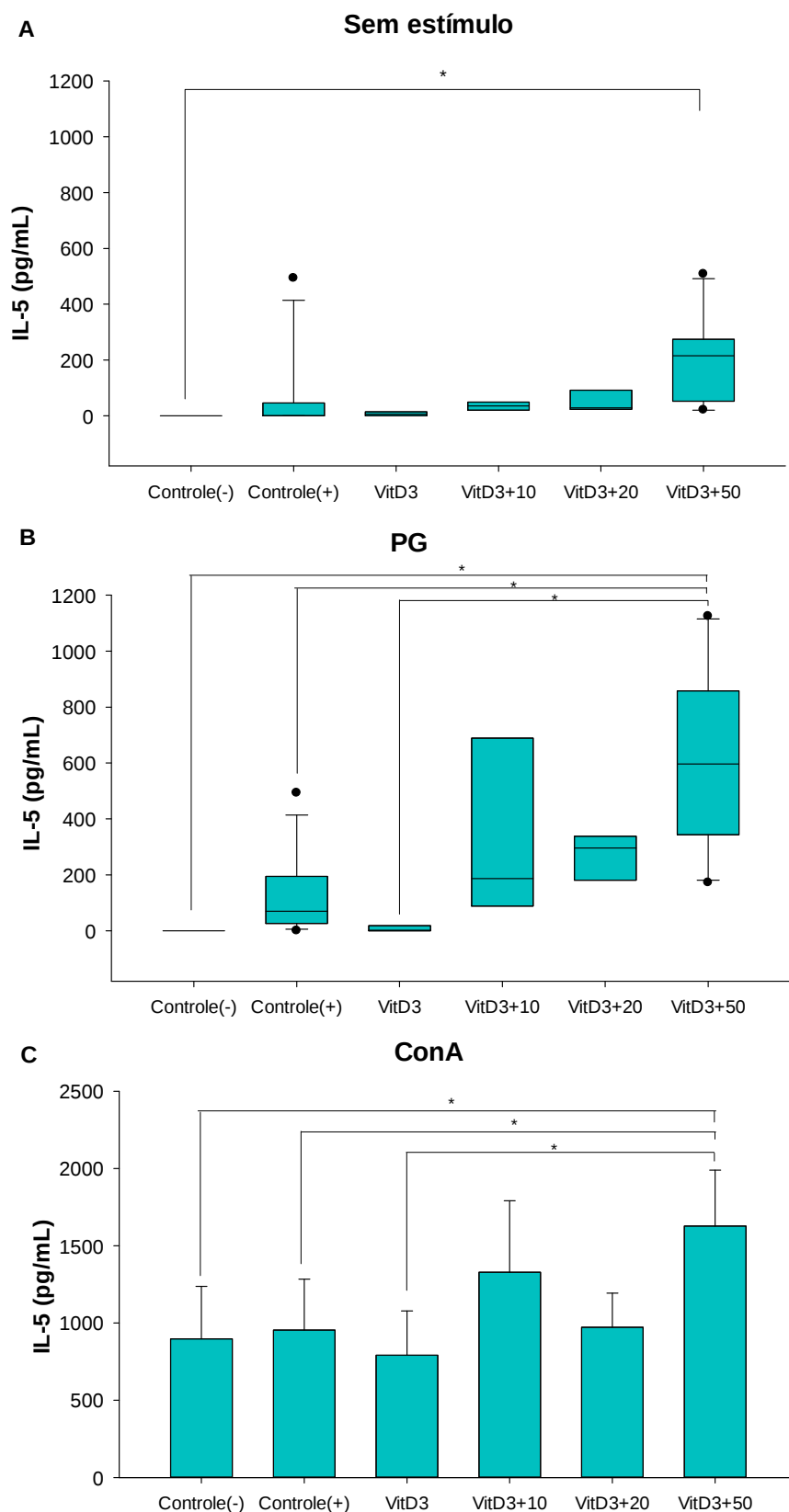


Figura 7: Produção de IL-5 por células esplênicas de camundongos BALB/c *retired breeders* tolerizados com PG+VitD3. A. Células esplênicas não estimuladas. B. Células estimuladas com PG. C. Células estimuladas com ConA. Controle (-): grupo de animais não imunizados com PG+DDA e desafiados com PG. Controle (+): grupo de animais imunizados com PG+DDA e desafiados com PG (n = 4 a 7 animais por grupo). *p < 0,05.

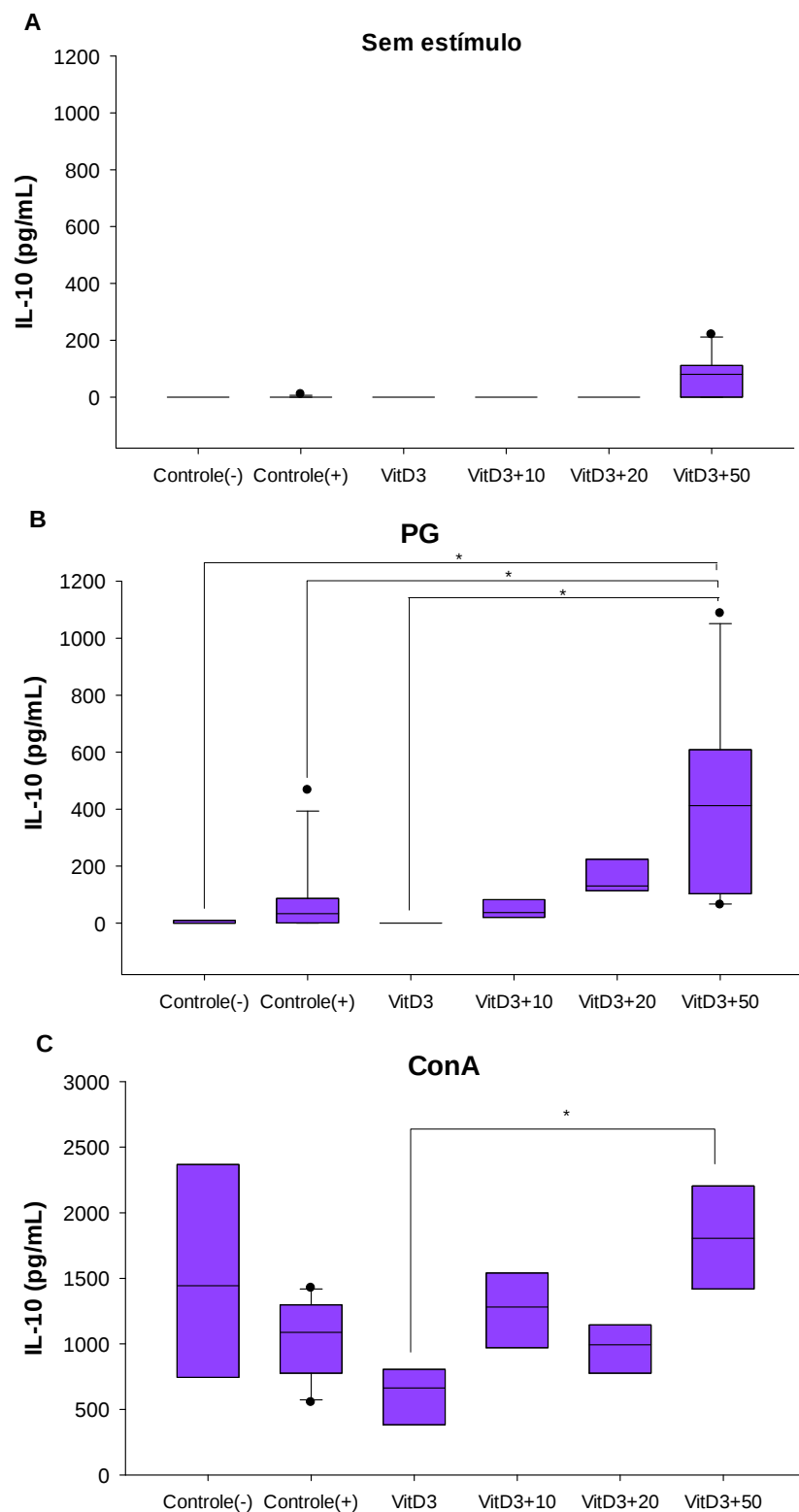
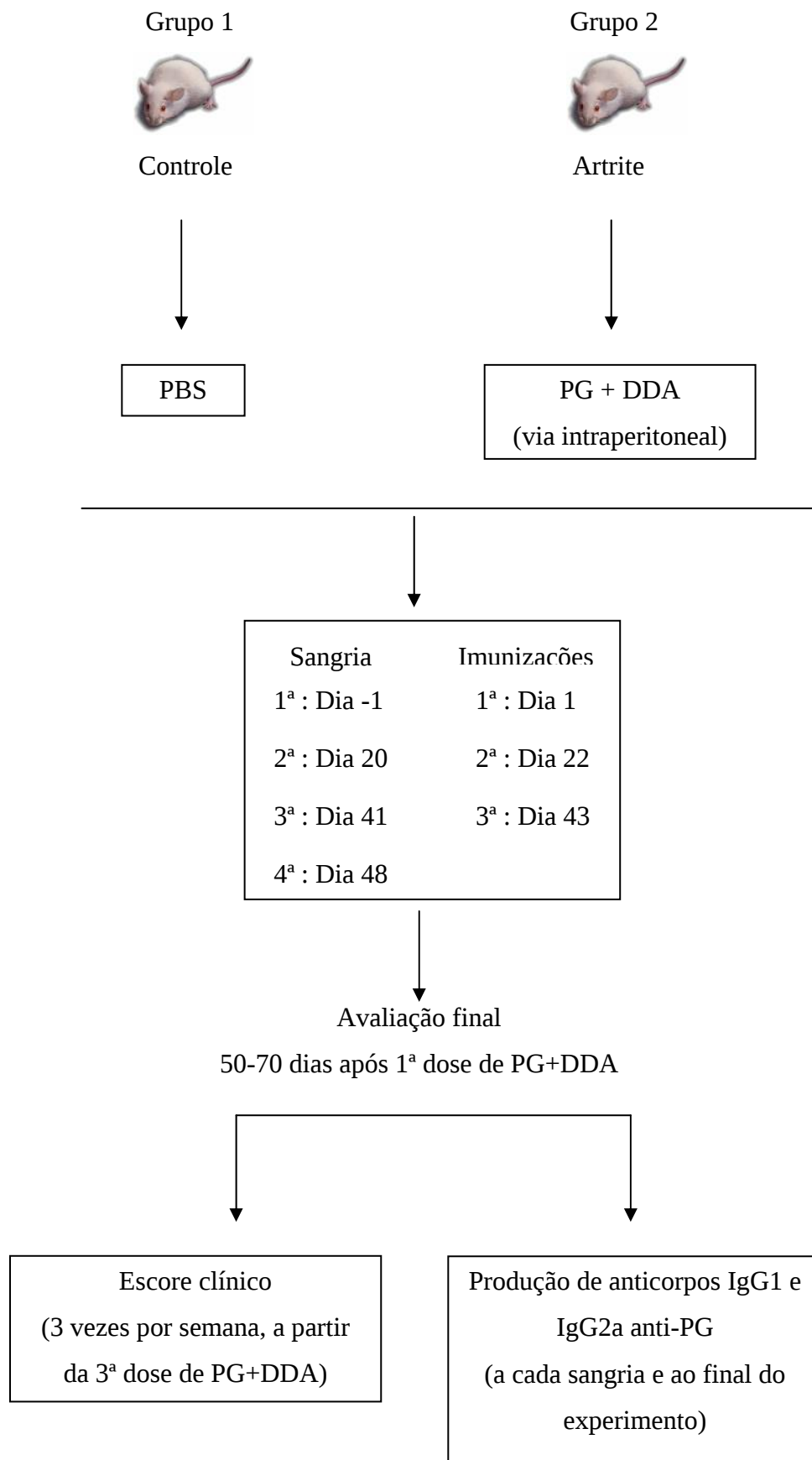


Figura 8: Produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos BALB/c *retired breeders* tolerizados com PG+VitD3. A. Células esplênicas não estimuladas. B. Células estimuladas com PG. C. Células estimuladas com ConA. Controle (-): grupo de animais não imunizados com PG+DDA e desafiados com PG. Controle (+): grupo de animais imunizados com PG+DDA e desafiados com PG (n = 4 a 7 animais por grupo). *p < 0,05.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2

Objetivo: Caracterizar o período pré-clínico da artrite induzida por proteoglicano.



RESULTADOS

Incidência e escore clínico

No experimento de caracterização da fase pré-clínica da artrite, a administração de PG+DDA nos camundongos BALB/c *retired breeders*, determinou 100% de incidência da doença (figura 9A). Todos os animais apresentaram sinais artríticos, embora em graus variados de comprometimento das articulações. O escore máximo atingido no grupo artrítico foi 14. Conforme esperado, os animais não imunizados com PG+DDA (controle) não desenvolveram artrite. Estes dados podem ser observados na figura 9B.

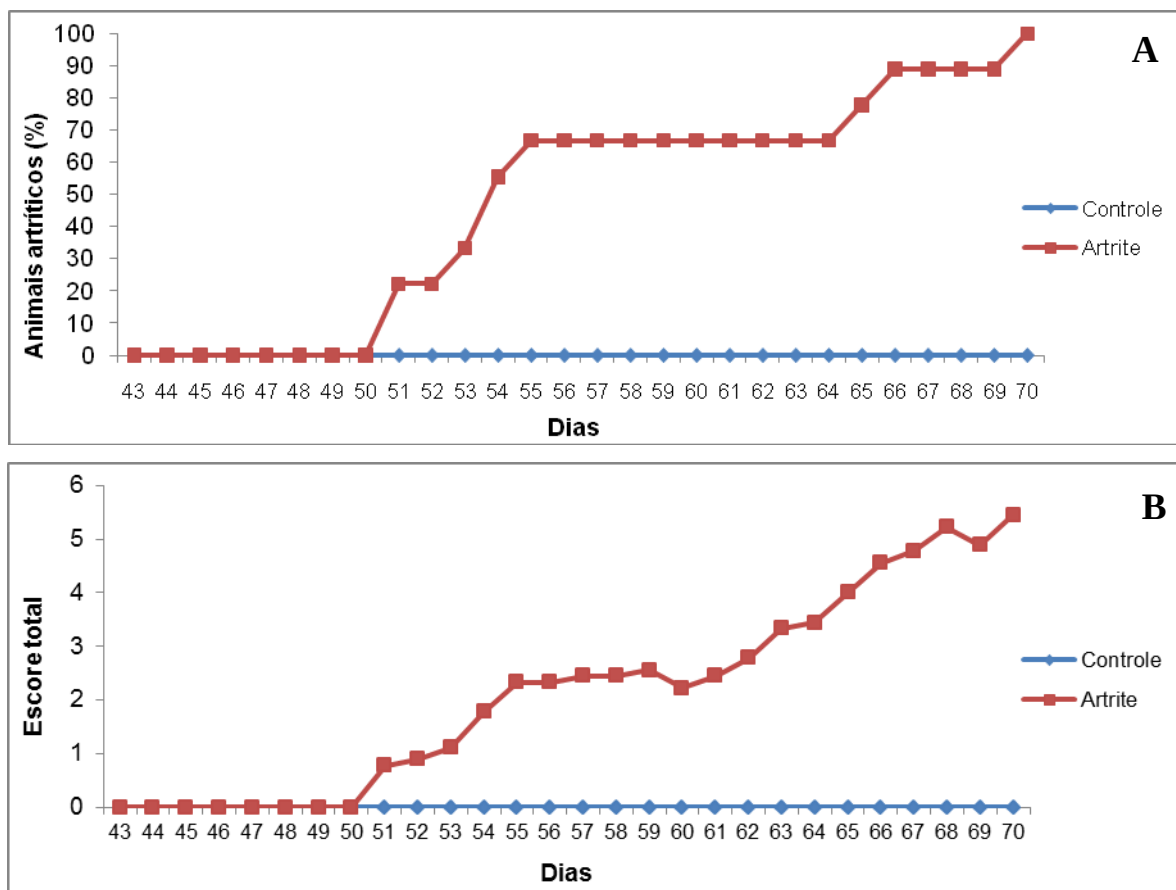


Figura 9: Incidência e escore da artrite induzida por proteoglicano bovino em camundongos BALB/c fêmeas *retired breeders*. A. Percentual de animais artríticos. B. Média do escore total dos animais dos grupos controle e artrítico. O escore total foi obtido pela soma do escore de cada pata por animal. A avaliação do escore foi feita diariamente a partir da terceira imunização (dia 43) até 70 dias após a 1ª imunização (n = 5 no grupo Controle e n = 9 no grupo Artrite).

Níveis de anticorpos específicos

A artrite induzida por proteoglicano bovino determinou a produção de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PG bovino, sendo a produção de IgG1 muito mais elevada do que a de IgG2a. Os níveis destes anticorpos aumentaram de forma significativa e progressiva após a primeira imunização (dia 1) com PG+DDA. Podemos observar que o pico de produção dos anticorpos específicos foi no dia 41. Após esse dia, a produção se manteve, conforme observado na figura 10. Como esperado, os animais controle que não foram imunizados com PG+DDA não produziram anticorpos específicos contra PG bovino (dados não mostrados).

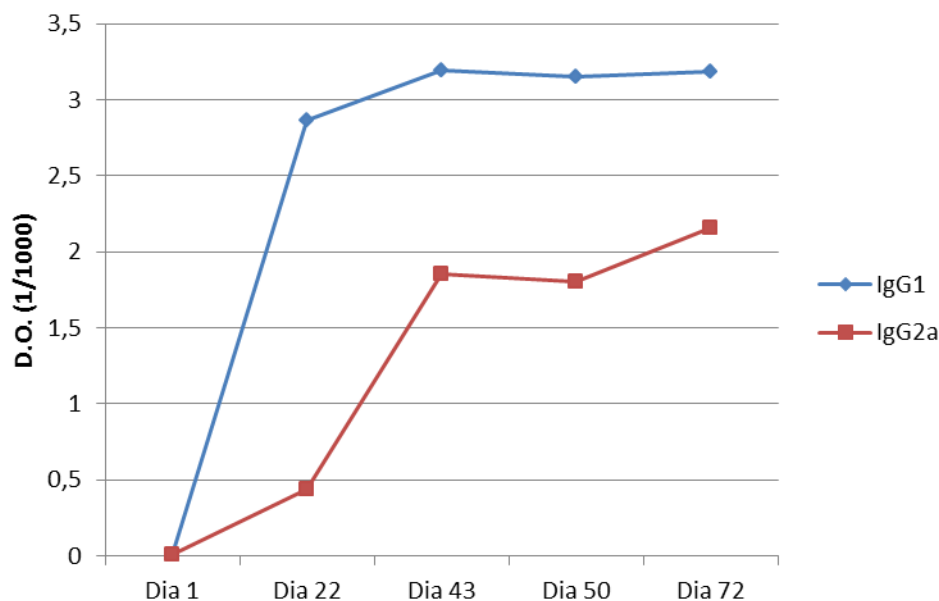
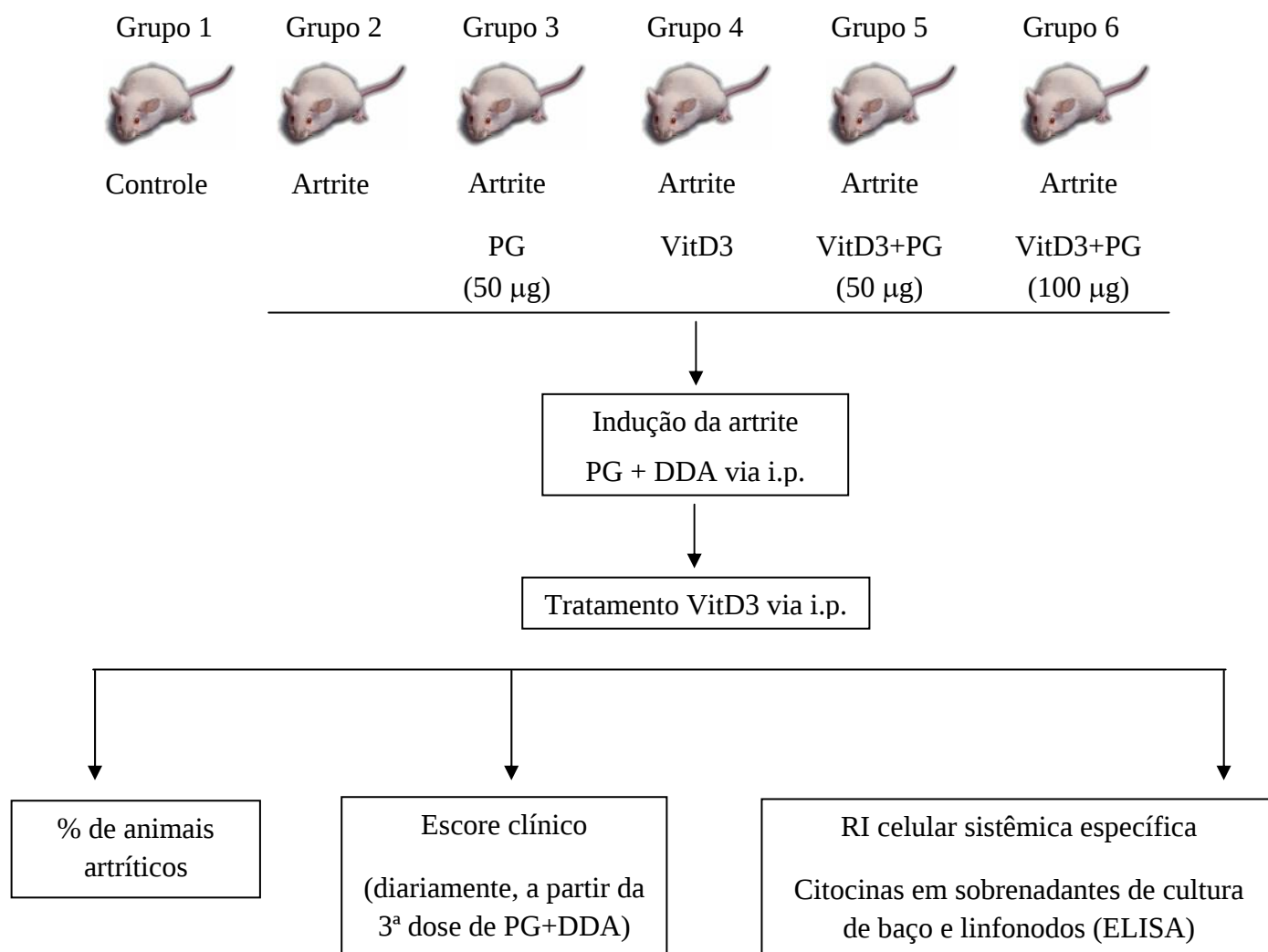


Figura 10: Produção dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-PG em animais artríticos. O sangue foi obtido através de sangria parcial dois dias antes de cada imunização, cinco dias após a última imunização e ao final do experimento. 1ª imunização: dia 1, 2ª imunização: dia 22, 3ª imunização: dia 43 e eutanásia: dia 70. * $p < 0,05$ em relação ao primeiro dia avaliado do grupo controle. N = 5 no grupo Controle e N = 9 no grupo Artrite.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL 3

Objetivo: Avaliar o efeito terapêutico do tratamento com VitD3.



RESULTADOS

Incidência e escore clínico

Os animais do grupo Controle (-), como previsto, não desenvolveram artrite, permanecendo o escore clínico total igual a zero. No entanto, todos os outros grupos estudados desenvolveram a doença em maior ou menor gravidade, como mostrado na figura 11. O grupo artrítico foi o que apresentou o escore médio mais elevado. O aparecimento da artrite neste grupo teve início 45 dias após a primeira imunização (dia 1). Após esse dia, o escore aumentou progressivamente até sua estabilização no dia 56. O escore clínico médio deste grupo permaneceu o mais elevado entre os diferentes grupos até o momento da eutanásia, que foi realizada no dia 70. O grupo tratado apenas com VitD3 apresentou a menor média de escore clínico deste protocolo experimental. Os sintomas clínicos da artrite começaram a aparecer a partir do dia 50 e aumentaram continuamente até o escore médio próximo de 4 ao final do experimento. Comparativamente, nos grupos PG50, VitD+PG50 e VitD+PG100 foram observados escores intermediários. Os dois primeiros grupos apresentaram escore crescente ao longo do experimento e atingiram escores médios próximos de 5 e 4, respectivamente. O grupo PG também demorou a desenvolver a artrite (dia 47), ao passo que os animais VitD+PG100 tiveram o primeiro representante doente no dia 46. Já o grupo VitD+PG50 apresentou picos de aumento e regressão de escore ao longo do protocolo, atingindo uma média próxima a 4. O aparecimento de sintomas clínicos neste grupo ocorreu no dia 50. Entre estes três grupos, o tratamento com VitD+PG50 apresentou um perfil distinto de evolução da doença. Enquanto os grupos PG e VitD+PG100 tiveram um aumento progressivo de escore, o grupo VitD+PG50 demonstrou períodos de regressão da doença, caracterizados por quedas ocasionais do escore clínico ao longo do período. Os escores máximos atingidos pelos grupos PG, VitD+PG50 e VitD+PG100 foram 16, 11 e 14, respectivamente. Estes dados podem ser observados na figura 12 e na tabela 1.



Figura 11: Fotos das patas traseiras de camundongos BALB/c *retired breeders* em diferentes escores clínicos.

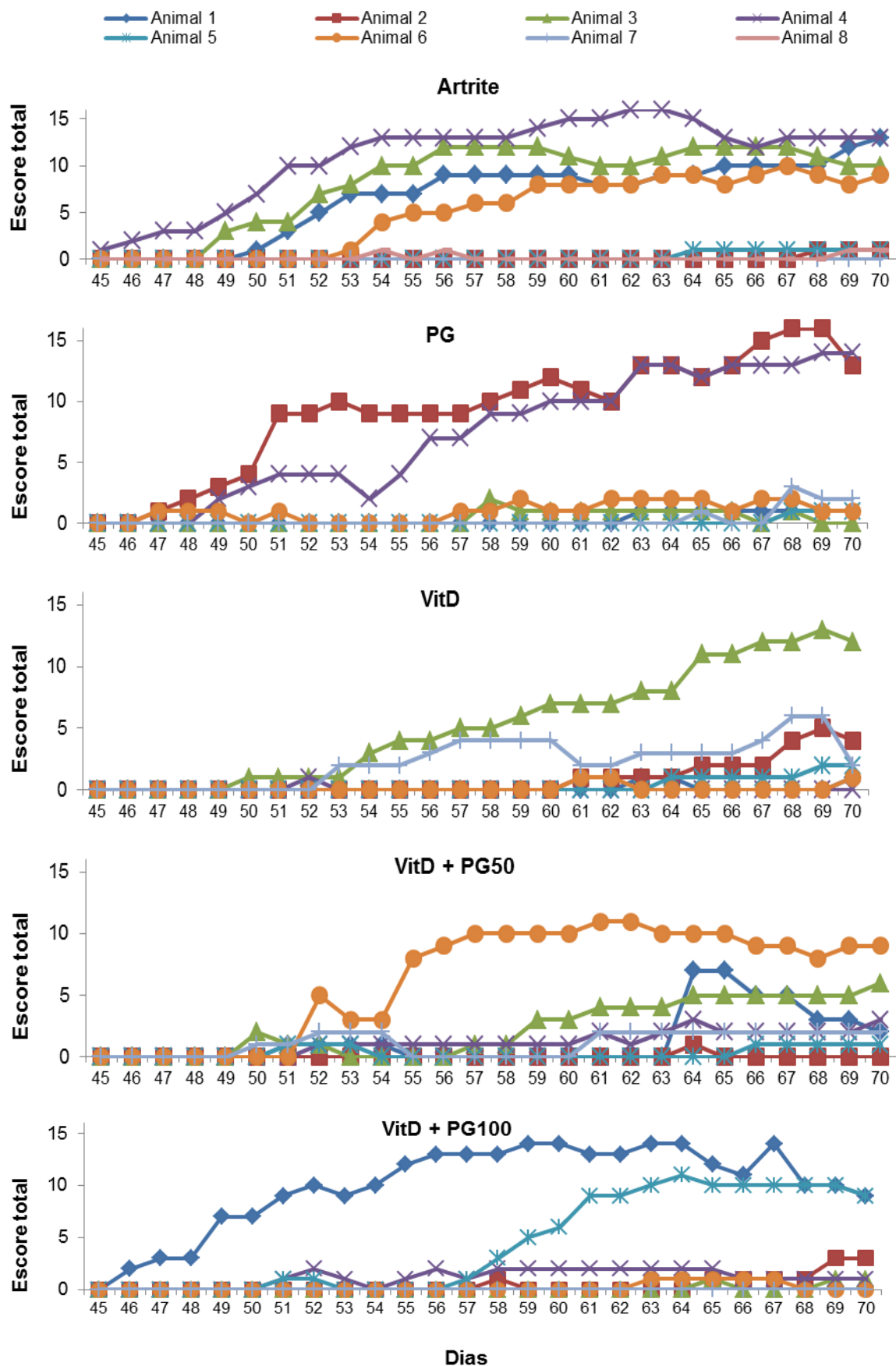


Figura 12: Efeito do tratamento com PG+VitD3 no escore clínico.. Escore total obtido pela soma do escore de cada pata por animal. A avaliação do escore foi feita diariamente a partir da terceira imunização até 70 dias após a primeira imunização (n=5 no grupo Controle e n=7 a 8 nos demais grupos)

Tabela 1: Características do desenvolvimento da artrite induzida por proteoglicano em camundongos BALB/c tratados com PG associado à VitD3.

	Incidência de artrite	Nº de animais com escore > 8	Início dos sintomas clínicos (dias)	Escore máximo atingido
Controle	0/5 (0%)	0/5 (0%)	-	-
Artrite	7/8 (88%)	4/8 (50%)	45	16
PG	6/7 (86%)	2/7 (29%)	47	16
VitD3	6/7 (86%)	1/7 (14%)	50	13
VitD3+PG50	5/7 (71%)	1/7 (14%)	50	11
VitD3+PG100	5/7 (71%)	2/7 (29%)	46	14

Produção de citocinas

Até o momento foram analisadas apenas as citocinas presentes no sobrenadante das culturas celulares esplênicas estimuladas com o antígeno específico. Conforme esperado, animais do grupo Controle (-) não produziram nenhuma citocina após o estímulo específico (não mostrado).

A análise da produção de citocinas em resposta ao PG revelou níveis similares de IFN- γ nos animais que receberam PG associado à VitD3 em relação aos animais dos grupos Artrite e PG. No entanto, os animais que receberam somente VitD3 produziram níveis elevados desta citocina. A análise estatística indica que estes níveis de IFN- γ estavam significativamente mais elevados do que os presentes nos animais que receberam a associação PG/VitD3 (figura 13). Em relação à produção de IL-6 e IL-5 todos os grupos experimentais produziram níveis similares destas citocinas (figuras 14 e 15). Interessantemente, animais dos grupos VitD3+PG50 e VitD3+PG100 apresentaram níveis de IL-10 significativamente mais elevados do que o grupo Artrite (figura 16). Os níveis de TNF- α e IL-17 estavam abaixo dos níveis detectáveis nas culturas estimuladas com PG (dados não mostrados).

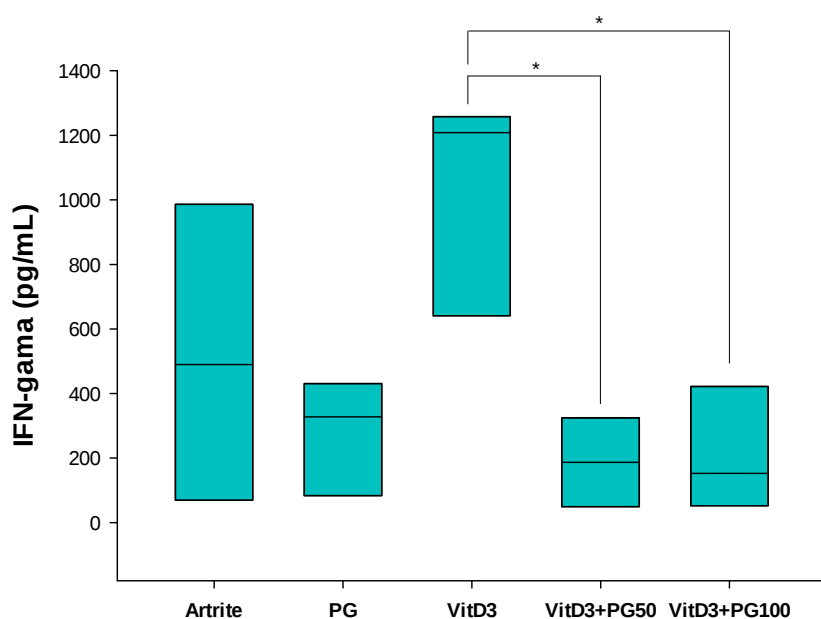


Figura 13: Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos BALB/c *retired breeders* que receberam vitamina D associada ao proteoglicano (PG) em resposta ao antígeno específico. Artrite: grupo de animais apenas imunizados com PG+DDA; PG: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam apenas PG. VitD: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam apenas VitD; VitD+PG 50 ou 100: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam 50 ou 100 μ g de PG associado à VitD. (n = 7 a 8 animais por grupo). *p < 0,05.

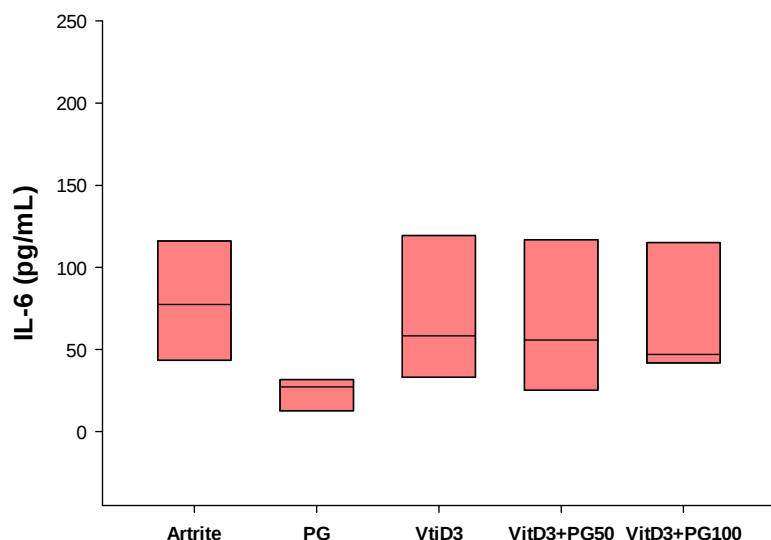


Figura 14: Produção de IL-6 por células esplênicas de camundongos BALB/c *retired breeders* que receberam vitamina D associada ao proteoglicano (PG) em resposta ao antígeno específico. Artrite: grupo de animais apenas imunizados com PG+DDA; PG: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam apenas PG. VitD: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam apenas VitD; VitD+PG 50 ou 100: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam 50 ou 100 µg de PG associado à VitD. (n = 7 a 8 animais por grupo).

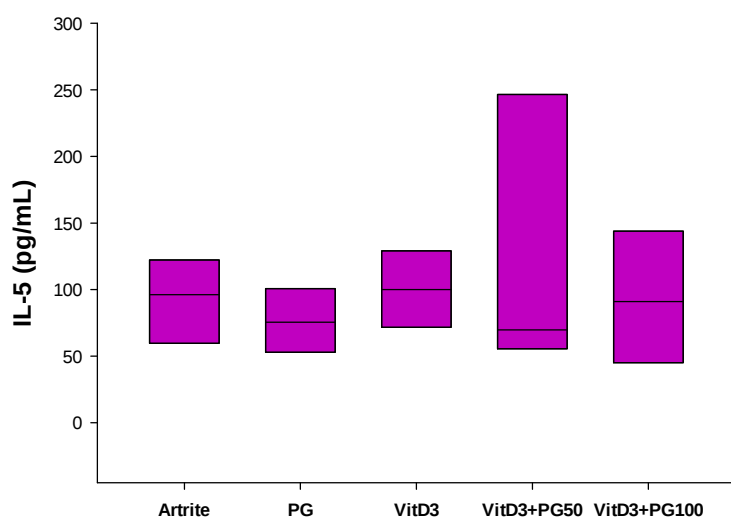


Figura 15: Produção de IL-5 por células esplênicas de camundongos BALB/c *retired breeders* que receberam vitamina D associada ao proteoglicano (PG) em resposta ao antígeno específico. Artrite: grupo de animais apenas imunizados com PG+DDA; PG: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam apenas PG. VitD: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam apenas VitD; VitD+PG 50 ou 100: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam 50 ou 100 µg de PG associado à VitD. (n = 7 a 8 animais por grupo).

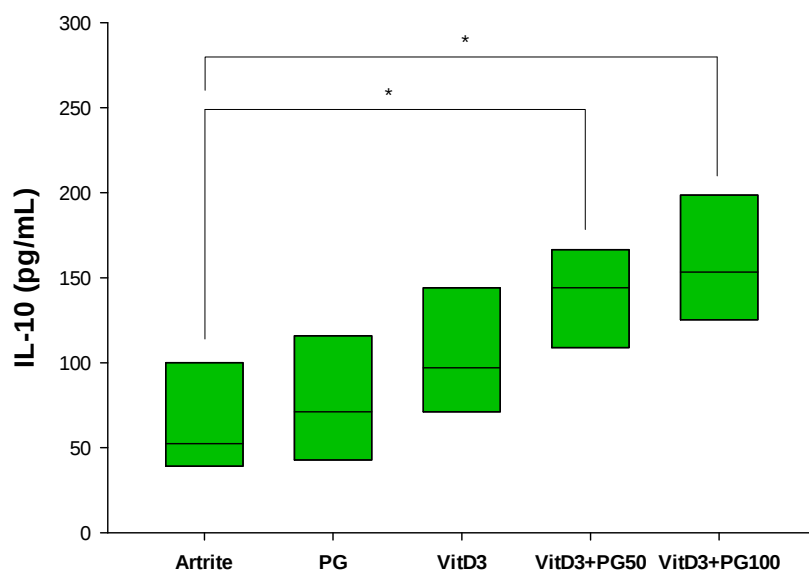


Figura 16: Produção de IL-10 por células esplênicas de camundongos BALB/c *retired breeders* que receberam vitamina D associada ao proteoglicano (PG); resposta ao antígeno específico. Artrite: grupo de animais apenas imunizados com PG+DDA; PG: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam apenas PG. VitD: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam apenas VitD; VitD+PG 50 ou 100: grupo de animais imunizados com PG+DDA que receberam 50 ou 100 µg de PG associado à VitD. (n = 7 a 8 animais por grupo). *p < 0,05.

DISCUSSÃO

O objetivo geral deste projeto é estabelecer se a associação de alguns fármacos com o antígeno PG é capaz de induzir tolerância específica e se esta associação tem potencial terapêutico e/ou profilático na artrite.

No primeiro relatório, apresentamos os resultados referentes aos diferentes fármacos propostos inicialmente: aspirina, dexametasona, rapamicina e vitamina D ativa. Conforme já avaliado, a aspirina e a dexametasona não apresentaram resultados satisfatórios, sendo excluídas das análises posteriores neste projeto de pesquisa. Tanto a rapamicina quanto a VitD apresentaram resultados promissores, no entanto, a VitD foi o fármaco escolhido para dar continuidade a este projeto devido aos crescentes estudos que envolvem sua capacidade imunomoduladora em diferentes patologias, incluindo doenças autoimunes (Kamem & Tangpricha, 2010).

Dessa forma, neste segundo relatório, avaliamos inicialmente se a associação de VitD3 a diferentes doses de PG era capaz de induzir tolerância específica. Para fazer esta avaliação, imunizamos os animais com três diferentes doses de PG (10, 20 e 50 μ g) na presença de VitD3. O esquema de administração e a dose de VitD3 foram baseados em dados da literatura (Lemire & Archer, 1991). A presença de um estado tolerogênico específico foi testada por imunização posterior com PG em condições sabidamente imunogênicas. Neste caso, essas condições imunogênicas consistiram em imunizar os animais com PG associado ao adjuvante DDA. A comparação do estado imunológico dos diferentes grupos foi feita pelo teste de hipersensibilidade tardia (DTH), através da inoculação de PG no coxim plantar. O procedimento adotado funcionou, pois, como esperado, não observamos aumento na espessura das patas no grupo Controle (-), enquanto que no grupo Controle (+) constatamos aumento expressivo desta medida.

A comparação dos diferentes grupos experimentais sugere a indução de tolerância parcial no grupo VitD3+PG50. Neste grupo, mas não no controle tratado somente com VitD3 ou nos grupos imunizados com doses menores de PG (10 e 20 μ g), ocorreu uma queda significativa no valor da DTH. Estes resultados também sugerem que a tolerização foi dependente da dose de PG, tendo se manifestado apenas na presença da dose mais elevada deste antígeno. A possibilidade de que doses mais elevadas de PG sejam mais tolerogênicas do que as testadas neste protocolo foi testada no terceiro protocolo deste relatório no qual incluímos também um grupo controle inoculado somente com PG, ou seja, na ausência de VitD3. Devido à dificuldade de se adquirir camundongos BALB/c *retired breeders*, em todos os protocolos experimentais propostos há uma limitação no número de grupos e de animais por grupo. Segundo dados da literatura, é possível que este grau de tolerância possa ser aumentado pois o efeito da VitD3 é dependente da dose e da via de administração. Lemire & Archer, 1991, constataram que doses mais elevadas de VitD3 eram mais eficazes no tratamento da encefalite autoimune experimental. A via oral de administração de VitD3 tem sido descrita como

altamente eficiente na ativação de células Tregs, o que poderia aumentar a eficácia do nosso protocolo de tolerização (Takeda *et al.*, 2010; Bock *et al.*, 2011).

Apesar da tolerização no grupo VitD3/PG ter sido parcial, encontramos resultados muito interessantes nos níveis de citocinas, os quais poderiam explicar, pelo menos parcialmente, o mecanismo imunológico envolvido neste efeito tolerogênico. O perfil de produção de IL-10 e IL-5 no grupo VitD3+PG50, grupo no qual constatamos tolerização, foi distinto dos demais. Neste caso observamos níveis significativamente elevados destas citocinas nas três condições de cultivo celular, ou seja, sem estímulo, estimulada com PG e estimulada com ConA.

A IL-5 é descrita como uma citocina típica de padrão Th2 (Xu *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2012). Portanto, é possível que a presença de VitD3 juntamente com uma dose adequada de PG tenha polarizado a resposta imune induzida para o sentido Th2. Há relatos que indicam que a administração de VitD3 pode causar aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10, ou seja, de citocinas de padrão Th2 (Boonstra *et al.*, 2001).

A IL-10 vem sendo descrita como uma citocina de padrão Th2 e até mesmo sendo dosada e comparada em outros trabalhos juntamente com outras citocinas deste mesmo padrão, como a IL-5 e IL-4 (Cheng *et al.*, 2012). Ela é dotada de grande potencial anti-inflamatório (Katsikis *et al.*, 1994; Isomaki *et al.*, 1996) e sua contribuição para a indução de tolerância a antígenos próprios e estranhos também tem sido descrita (den Hartog *et al.*, 2011).

Algumas características relacionadas com a produção destas duas citocinas merecem destaque. Constatamos, por exemplo, a produção espontânea delas, ou seja, níveis bastante elevados de IL-5 e IL-10 foram encontrados nas culturas não estimuladas. Isso indica a existência de células efetoras produtoras destas citocinas *in vivo*. Além disso, a produção destas duas citocinas foi antígeno-específica, pois o re-estímulo *in vitro* com PG aumentou sua produção.

Se por um lado estes resultados são promissores e apontam para a indução de tolerância, outros resultados referentes à produção de citocinas são mais difíceis de explicar. Por exemplo, os níveis de IL-17 estavam significativamente mais baixos nos grupos VitD3+PG10 e VitD3+PG20, mas não no grupo VitD3+PG50, em comparação com o grupo VitD3. Nossa expectativa inicial era que o nível de IL-17 estivesse mais baixo no grupo tolerizado porque esta citocina é mais conhecida por seu efeito pró-inflamatório em doenças autoimunes, como revisado por Pöllinger, 2012. Por outro lado, dados recentes da literatura também sugerem que as células Th17 podem apresentar uma função tanto pró-inflamatória como protetora contra a inflamação, o que depende muito do microambiente no qual estas células se encontram (Marwaha AK *et al.*, 2012).

Em um segundo momento, induzimos artrite para acompanhar o seu desenvolvimento clínico e assim estabelecer o período pré-clínico, ou seja, aquele no qual já existem alterações imunológicas bem estabelecidas, mas a doença ainda não se manifestou clinicamente. Para isso,

foram feitas sangrias no decurso da indução e desenvolvimento da doença. Os primeiros animais doentes foram observados no dia 51 a partir do início de indução da doença. Ao final do experimento (dia 70) a incidência foi de 100%. Estes resultados são similares aos descritos por Glant e Mikecz, 2004, que observaram uma incidência de 80 a 100 % de artrite induzida por proteoglicano.

Os anticorpos específicos já foram detectados no 20º dia de imunização e aumentaram no 41º dia. A partir de então, estes níveis se estabilizaram. Considerando estes dados, definimos o período entre 41 dias (estabilização dos níveis de anticorpos) e 51 dias (início do aparecimento dos sintomas clínicos) como o período pré-clínico da artrite autoimune induzida por PG. A partir desses dados escolhemos o período para iniciarmos o tratamento dos animais com PG associado à VitD3 no protocolo subsequente.

No terceiro e último protocolo deste relatório, o PG associado à VitD3 foi administrado 32 dias após a primeira imunização com PG+DDA para que o tratamento terminasse antes do aparecimento dos sintomas. Dessa forma, a maior parte do tratamento foi realizada durante período pré-clínico. Consideramos que a escolha do período em que foi feito o tratamento com VitD3 foi importante para avaliar o efeito do tratamento precoce da artrite. Atualmente, a maioria dos tratamentos disponíveis apenas controlam os sintomas clínicos já estabelecidos (Colmegna *et al.*, 2012). Com o avanço das pesquisas no sentido de elucidar os mecanismos envolvidos na imunopatogênese dessa doença, novos marcadores pré-clínicos, como por exemplo, os anticorpos anti-proteínas citrulinadas foram descobertos (Uysal *et al.*, 2010; Song & Kang, 2010). Este conhecimento associado a um bom diagnóstico poderia ser a chave para o tratamento precoce da artrite, evitando os sintomas clínicos como dor, inchaço e deformidade. No momento estamos tentando adequar um kit utilizado para quantificação de anticorpos anti-proteínas citrulinadas de uso humano para nosso modelo experimental. Se tivermos sucesso podemos utilizar este marcador como um indicador para melhor caracterizar a fase pré-clínica.

Estudos mostram que a VitD3 exerce uma atividade imunomoduladora em doenças autoimunes como a artrite e a esclerose múltipla, evitando a progressão da doença em modelos experimentais (Lemire & Archer, 1991; Cantorna *et al.*, 1998). Em nosso estudo, apesar de não observarmos a diminuição da incidência da artrite com a administração de VitD3, foi possível observar que esta substância foi capaz de promover um retardo no aparecimento dos sintomas clínicos e uma diminuição no valor do escore máximo atingido no grupo. Além disso, os grupos não tratados com VitD3 apresentaram um maior número de animais no estado moderado a grave da doença (escore maior do que 8) em relação aos tratados, com ou sem a associação com PG.

Estes resultados, quando combinados com a análise da produção de citocinas em resposta ao estímulo específico, sugerem que a associação do PG com a VitD3 aumenta a capacidade

imunomoduladora deste fármaco. Isso porque observamos um aumento significativo da produção de IL-10 antígeno-específica nos animais que receberam PG associado à VitD3. Conforme discutimos anteriormente, esta citocina possui propriedades anti-inflamatórias e contribui para a indução de tolerância. Similarmente ao observado na primeira etapa deste relatório, uma maior dose de PG (PG100) parece ser mais tolerogênica, uma vez que determinou uma maior produção de IL-10 em resposta ao PG. No entanto, apenas o grupo que recebeu a menor dose (VitD3+PG50) apresentou um padrão de doença diferente, não homogêneo. Devido à escassez de trabalhos relacionados à indução de artrite experimental com proteoglicano de origem bovina, não se sabe ao certo quais as características compartilhadas e as que se distinguem do modelo original com proteoglicano humano. É possível que além da quantidade, a origem do heteroantígeno influencie também na progressão da doença (Glant *et al.*, 2003).

De maneira geral, o PG administrado na presença de VitD3 foi capaz de promover um estado tolerogênico que implicou em mudanças significativas no desenvolvimento da artrite induzida por proteoglicano. Os protocolos delineados para as próximas etapas do trabalho permitirão confirmar esta estratégia terapêutica, determinar sua eficácia como medida profilática e também avaliar com mais detalhes o possível mecanismo imunológico envolvido na tolerância.

REFERÊNCIAS

- Adorini L, Giarratana N, Penna G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin Immunol*. 2004;16(2):127-34.
- Adorini L, Penna G. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. *Hum Immunol*. 2009 May;70(5):345-52.
- Bock G, Prietl B, Mader JK, Höller E, Wolf M, Pilz S, Graninger WB, Obermayer-Pietsch BM, Pieber TR. The effect of vitamin D supplementation on peripheral regulatory T cells and β cell function in healthy humans: a randomized controlled trial. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011;27(8):942-5
- Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HFJ, O'Garra A. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4⁺ T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. *The Journal of Immunology*, 2001;167(9) 4974-4980.
- Buzás EI, Végvári A, Murad YM, Finnegan A, Mikecz K, Glant TT. T-cell recognition of differentially tolerated epitopes of cartilage proteoglycan aggrecan in arthritis. *Cell Immunol*. 2005;235(2):98-108.
- Cantorna MT, Hulet DA, Redaelli C, Brandt CR, Humpal-Winter J, Sollinger HW, Deluca HF. $1,25$ -Dihydroxyvitamin D3 prolongs graft survival without compromising host resistance to infection or bone mineral density. *Transplantation*. 1998;15;66(7):828-31.
- Carlberg C, Polly P. Gene regulation by vitamin D3. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1998;8(1):19-42
- Cheng AS, Cheng YH, Chang TL. Scopoletin attenuates allergy by inhibiting Th2 cytokines production in EL-4 T cells. *Food Funct*. 2012. [Epub ahead of print].
- Colmegna I, Ohata BR, Menard HA. Current understanding of rheumatoid arthritis therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;91(4):607-20
- Daniel C, Sartory NA, Zahn N, Radeke HH, Stein JM. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther*., 2008;324(1):23-33.
- den Hartog G, Savelkoul HF, Schoemaker R, Tijhaar E, Westphal AH, de Ruiter T, van de Weg-Schrijver E, van Neerven RJ. Modulation of human immune responses by bovine interleukin-10. *PLoS One*. 2011;6(3):e18188.
- Dimeloe S, Nanzer A, Ryanna K, Hawrylowicz C. Regulatory T cells, inflammation and the allergic response-The role of glucocorticoids and Vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010 May 31;120(2-3):86-95. Epub 2010 Mar 19.
- Doodles PD, Cao Y, Hamel KM, Wang Y, Rodeghero RL, Mikecz K, Glant TT, Iwakura Y, Finnegan A. IFN-gamma regulates the requirement for IL-17 in proteoglycan-induced arthritis. *J Immunol*. 2010;1;184(3):1552-9. Epub 2009 Dec 18.

- Du T, Zhou ZG, You S, Lin J, Yang L, Zhou WD, Huang G, Chao C. Regulation by 1, 25-dihydroxy-vitamin D3 on altered TLRs expression and response to ligands of monocyte from autoimmune diabetes. *Clinica Chimica Acta*. 2009;402(1-2):133-138
- Finnegan A. IFN-gamma regulates the requirement for IL-17 in proteoglycan-induced arthritis. *J Immunol*. 2010;184(3):1552-9.
- Glant TT, Finnegan A, Mikecz K. Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics. *Crit Rev Immunol*. 2003;23(3):199-250.
- Glant TT, Mikecz K. Proteoglycan aggrecan-induced arthritis: a murine autoimmune model of rheumatoid arthritis. *Methods Mol Med*. 2004;102:313-38.
- Gregori S, Giarratana N, Smiroldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2002;51(5):1367-74.
- Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(1):24-34.
- Hanyecz A, Berlo SE, Szántó S, Broeren CP, Mikecz K, Glant TT. Achievement of a synergistic adjuvant effect on arthritis induction by activation of innate immunity and forcing the immune response toward the Th1 phenotype, *Arthritis Rheum*. 2004;50(5):1665-76.
- Imboden JB. The Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2009. 4:417–434.
- Isomaki P, Luukkainen R, Saario R, Toivanen P, Punnonen J. Interleukin-10 functions as an antiinflammatory cytokine in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 1996;39(3):386-95.
- Kaliński P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol*. 1998;161(6):2804-9.
- Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(5):441-50.
- Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*. 1994 1;179(5):1517-27.
- Khoury SJ, Gallon L, Verburg RR, Chandraker A, Peach R, Linsley PS, Turka LA, Hancock WW, Sayegh MH. Ex vivo treatment of antigen-presenting cells with CTLA4Ig and encephalitogenic peptide prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Immunol*. 1996;157(8):3700-5.
- Koenders MI, van den Berg WB. Translational mini-review series on Th17 cells: are T helper 17 cells really pathogenic in autoimmunity? *Clin Exp Immunol*. 2010;159(2):131-6.

- Lemire & Archer. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the *in vivo* induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Clin Invest.* 1991; 87(3):1103-7.
- Martinez-Gamboa L, Brezinschek HP, Burmester GR, Dörner T. Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. *Autoimmun Rev.* 2006;5(7):437-42.
- Marwaha AK, Leung NJ, McMurchy AN, Levings MK. TH17 Cells in Autoimmunity and Immunodeficiency: Protective or Pathogenic? *Front Immunol.* 2012;3:129.
- Mattner F, Smirolto S, Galbiati F, Muller M, Di Lucia P, Poliani PL, Martino G, Panina-Bordignon P, Adorini L. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Eur J Immunol.* 2000;30(2):498-508.
- Menges M, Rössner S, Voigtländer C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, Erb K, Schuler G, Lutz MB. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med.* 2002;195(1):15-21.
- Oh S, Rankin AL, Caton AJ. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune arthritis. *Immunol Rev.* 2010;233(1):97-111.
- Overbergh L, Decallonne B, Waer M, Rutgeerts O, Valckx D, Casteels KM, Laureys J, Bouillon R, Mathieu C. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 induces an autoantigen-specific T-helper 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65 (p524-543). *Diabetes.* 2000;49(8):1301-7.
- Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, Adorini L. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood.* 2005;106(10):3490-7. Epub 2005 Jul 19.
- Park HK, Cho MK, Park HY *et al.* Macrophage migration inhibitory factor isolated from a parasite inhibited Th2 cytokine production in PBMCs of atopic asthma patients. *J Asthma.* 2012;49(1):10-5.
- Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, Allavena P, Di Carlo V. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000 May 1;164(9):4443-51.
- Pöllinger B. IL-17 producing T cells in mouse models of multiple sclerosis and rheumatoid arthritis. *J Mol Med (Berl).* 2012;90(6):613-24.
- Royal W 3rd, Mia Y, Li H, Naunton K. Peripheral blood regulatory T cell measurements correlate with serum vitamin D levels in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009;213(1-2):135-41.
- Smolders J, Thewissen M, Peelen E, Menheere P, Tervaert JW, Damoiseaux J, Hupperts R. Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLoS One.* 2009;13(4):e6635.

- Song YW, Kang EH. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: rheumatoid factors and anticitrullinated protein antibodies. *QJM*. 2010 103(3):139-46.
- Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, Hayes CE. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006;1;177(9):6030-7
- Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(1):75-92.
- Süss G, Shortman K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med*. 1996;183(4):1789-96.
- Takeda M, Yamashita T, Sasaki N *et al*. Oral administration of an active form of vitamin D₃ (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(12):2495-503.
- Tang J, Zhou R, Luger D, Zhu W, Silver PB, Grajewski RS, Su SB, Chan CC, Adorini L, Caspi RR. Calcitriol Suppresses Antiretinal Autoimmunity through Inhibitory Effects on the Th17 Effector Response. *The Journal of Immunology*,2009;182(8); 4624-4632
- Taub DD. Cytokine, growth factor, and chemokine ligand database. *Curr Protoc Immunol*. 2004;6:6.29.
- Thomson AW, Robbins PD. Tolerogenic dendritic cells for autoimmune disease and transplantation. *Ann Rheum Dis*. 2008;67:90-96.
- Uysal H, Nandakumar KS, Kessel C, Haag S, Carlsen S, Burkhardt H, Holmdahl R. Antibodies to citrullinated proteins: molecular interactions and arthritogenicity. *Immunol Rev*. 2010;233(1):9-33.
- van den Berg WB. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(5):250.
- van Halteren AG, van Etten E, de Jong EC, Bouillon R, Roep BO, Mathieu C. Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D(3). *Diabetes*. 2002;51(7):2119-25.
- van Roon JA, Bijlsma JW, Lafeber FP. Diversity of regulatory T cells to control arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(5):897-913.
- Xu J, Ehrman B, Graham LM, Eagleton MJ. Interleukin-5 is a potential mediator of angiotensin II-induced aneurysm formation in apolipoprotein E knockout mice. *J Surg Res*. 2012; 10.
- Wendy W. J. U., Sandra L., Fleur S. K., Arno R. van der Slik, Bart O.R. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D₃ or dexamethasone: Differential role for PD-L1. *Eur. J. Immunol.*,2009;39: 3147–3159