

## RESUMO DA TESE DE DOUTORAMENTO

**Título:** Role of IL-1 $\beta$  in rheumatoid arthritis

**Nome da estudante:** Ana Rita Cascão Rodrigues

**Orientadores:**

**Professor Doutor João Eurico Fonseca**

Director da Unidade de Investigação em Reumatologia  
Instituto de Medicina Molecular, Lisboa, Portugal

**Professor Doutor Luís Ferreira Moita**

Director da Unidade de Biologia Celular do Sistema Imunológico  
Instituto de Medicina Molecular, Lisboa, Portugal

A artrite reumatóide é uma doença inflamatória crónica imunomediada, com envolvimento predominante da membrana sinovial das pequenas articulações e destruição progressiva de cartilagem e osso, que induz incapacidade funcional e aumento da morbilidade e mortalidade dos doentes. O diagnóstico precoce da artrite reumatóide e a administração imediata de uma terapêutica adequada são cruciais para a prevenção da progressão da doença e da destruição articular, a qual pode ocorrer numa fase muito inicial. A característica mais debilitante da artrite reumatóide é a hiperplasia sinovial. Esta inflamação sinovial é mediada pela interação entre diversas células do sistema imunitário (macrófagos, neutrófilos, células T e B) e complexas redes de citocinas (particularmente interleucina (IL)-1 $\beta$ , fator de necrose tumoral (TNF) e IL-17).

A IL-1 $\beta$  é considerada um dos elementos centrais na patologia da artrite reumatóide, por induzir um aumento na secreção de citocinas e quimiocinas e produção de metaloproteinases (MMPs) bem como expansão e sobrevivência de células T, que por sua vez conduzem a um aumento na produção de autoanticorpos pelas células B, à diferenciação de células T auxiliares (Th)17 e à osteoclastogénese, com consequente erosão óssea. É importante salientar que a produção de IL-1 $\beta$  é fortemente regulada quer a nível da transcrição, quer a nível da pós-tradução, envolvendo o factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), o inflamassoma e a caspase-1. É interessante notar que estudos anteriores documentaram que a desregulação destes mecanismos resulta numa resposta inflamatória exacerbada e desnecessária, característica de doenças autoinflamatórias e autoimunes, como é o caso da artrite reumatóide. Estes mecanismos poderão ser particularmente relevantes na fase muito inicial da doença. Contudo, a maioria dos estudos relativos à fisiopatologia da artrite

reumatóide têm sido focados na fase estabelecida da doença, sendo o conhecimento acerca das interações celulares e dos mecanismos regulatórios imunológicos que participam na fase inicial da artrite reumatóide ainda muito limitado.

O principal objectivo deste trabalho foi o estudo dos elementos iniciadores do processo inflamatório na artrite reumatóide, incluindo aqueles que estão relacionados com a atividade do inflamassoma. Assim, a primeira tarefa realizada neste estudo foi a análise da libertação de citocinas e quimiocinas na fase muito inicial da artrite reumatóide. Para tal, um grupo de doentes com poliartrite com menos de seis semanas de evolução, não tratada, foi prospectivamente seguido. Estes doentes foram avaliados antes do tratamento, após terapêutica de curta duração com dose baixa de corticosteróides e após metotrexato (MTX). O acompanhamento clínico destes doentes permitiu a identificação de dois subgrupos: um que evoluiu para artrite reumatóide e um outro que evoluiu para outras doenças crónicas inflamatórias articulares ou que incluiu formas autolimitadas de artrite. Adicionalmente, foi analisado um segundo grupo de doentes com artrite reumatóide na fase estabelecida da doença, sob terapêutica com MTX. É interessante notar que, na fase muito inicial da artrite reumatóide, foram observados no soro dos doentes níveis aumentados de citocinas relacionadas com o recrutamento (IL-6), maturação e sobrevivência das células B (a proliferation-inducing ligand (APRIL) e B-lymphocyte stimulator (BLyS)), bem como um perfil de citocinas relacionadas com o recrutamento de neutrófilos (IL-8) e com a polarização (IL-1 $\beta$  e IL-6) e ativação (IL-17A e IL-22) de células Th17, comparativamente com doentes que não evoluem para artrite reumatóide e com doentes com artrite reumatóide estabelecida. Além disso, a análise de amostras de líquido sinovial de doentes tratados com MTX na fase estabelecida da artrite reumatóide revelou também um perfil de citocinas semelhante ao da fase muito inicial desta doença. De salientar que o tratamento com corticosteróides e MTX, embora clinicamente eficaz na redução das manifestações inflamatórias, não pareceu afetar o padrão de citocinas em circulação.

A elevada concentração sérica e sinovial de IL-1 $\beta$  observada desde a fase muito inicial da artrite reumatóide pode ser explicada pelo aumento nos níveis de caspase-1 ativada que foi também observado, quer em doentes com artrite reumatóide com menos de 1 ano de evolução e não tratados, quer nos doentes com artrite reumatóide estabelecida, tratados com MTX. O papel central da IL-1 $\beta$  faria supor que esta citocina seria um alvo ideal na terapêutica da artrite reumatóide. Contudo, os resultados dos ensaios clínicos em doentes com artrite reumatóide estabelecida com um bloqueador do recetor da IL-1 $\beta$  (anakinra) e com um anticorpo monoclonal (canakinumab) não

demonstraram o mesmo nível de eficácia dos antagonistas do TNF. Colocámos a hipótese de que a IL-1 $\beta$  desempenhe um papel complementar ao do TNF e mais relevante na fase inicial da doença. Por este motivo, a interferência na fase inicial da artrite com a via reguladora da libertação de IL-1 $\beta$  e de TNF poderia constituir uma opção terapêutica promissora. Para testar esta hipótese, usou-se uma biblioteca de drogas na linha celular macrófágica THP1 no sentido de identificar as drogas que simultaneamente diminuam a produção de ambas as citocinas. As drogas selecionadas foram posteriormente estudadas in vivo num modelo de rato Wistar de artrite induzida por adjuvante para analisar as suas propriedades anti-inflamatórias. Nestas experiências in vivo foi observado que duas das drogas selecionadas, o celastrol e o ácido gambógico, têm propriedades anti-inflamatórias e anti-proliferativas, tratando eficazmente os ratos artríticos devido ao seu efeito inibitório sobre a IL-1 $\beta$  e o TNF, induzido pela diminuição da ativação quer da caspase-1, quer do NF-kB. Por fim, com o intuito de distinguir entre um papel direto da IL-1 $\beta$  como elemento efetor ou como iniciador do processo inflamatório, pela indução da diferenciação das células Th17, foi também testada in vivo uma droga inibitória da atividade transcricional do retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma (ROR $\gamma$ )T (digoxina) no mesmo modelo animal, permitindo a análise do seu efeito anti-inflamatório. Após o tratamento com a digoxina foi observada uma melhoria nos sinais inflamatórios dos ratos artríticos quando a droga foi administrada na fase inicial do desenvolvimento da artrite, tendo-se verificado um efeito menos rápido e menos eficiente na progressão da doença comparativamente com as drogas acima mencionadas. Contrariamente à digoxina, o celastrol e o ácido gambógico são também eficientes quando administrados em fases tardias do desenvolvimento da artrite, sendo este resultado muito importante no contexto da prática clínica. Estes resultados sugerem que a inibição da polarização das células Th17 per se parece ser uma estratégia com uma eficácia limitada, pelo menos no que diz respeito à fase estabelecida da doença.

No seu conjunto, os resultados da presente tese suportam a hipótese de que a IL-1 $\beta$  desempenha um papel mais relevante na fase inicial do que na fase tardia da artrite reumatóide. Estes novos dados têm assim uma implicação clínica importante, ao sugerirem que a introdução precoce de terapêuticas direcionadas às vias reguladoras de IL-1 $\beta$  poderão ser particularmente eficazes na indução da remissão na fase inicial da doença, devendo esta estratégia ser avaliada em doentes com artrite reumatóide.

**Palavras-chave:** Artrite reumatóide, Inflamassoma, Caspase-1, NF-kB, IL-1 $\beta$ , TNF, IL-17A, Modelo de rato AIA, Drogas

## PHD THESIS SUMMARY

**Title:** Role of IL-1 $\beta$  in rheumatoid arthritis

**Student's name:** Ana Rita Cascão Rodrigues

**Supervisors:**

**Professor Doutor João Eurico Fonseca**

Head of the Rheumatology Research Unit  
Instituto de Medicina Molecular, Lisbon, Portugal

**Professor Doutor Luís Ferreira Moita**

Head of the Cell Biology of the Immune System Unit  
Instituto de Medicina Molecular, Lisbon, Portugal

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory and immuno-mediated disease with a significant involvement of the synovial membrane of multiple small joints and progressive destruction of cartilage and bone, which leads to functional impairment and a significant increase of both morbidity and mortality of patients. Early diagnosis and an accurate prompt therapeutic strategy are crucial to prevent rheumatoid arthritis progression and joint destruction that can occur immediately after its onset. The most debilitating characteristic of rheumatoid arthritis is the synovial hyperplasia of joints, which is mediated by the interplay of several immune cells (macrophages, neutrophils, T and B cells) and complex cytokine networks (particularly interleukin (IL)-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF) and IL-17).

IL-1 $\beta$  is considered to be a crucial element in rheumatoid arthritis pathology due to its ability to enhance cytokine and chemokine secretion, metalloproteinases (MMPs) production, T cell expansion and survival which further increases antibody production by B cells, T helper (Th)17 cells differentiation, and osteoclastogenesis with consequent bone loss. Importantly, the production of IL-1 $\beta$  is tightly regulated both at the transcriptional and post-translational levels, involving nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B), inflammasomes and caspase-1. Interestingly, it has been shown that perturbation of these regulatory mechanisms results in an exaggerated inflammatory response that underlies autoinflammatory and autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis. These mechanisms might be particularly relevant in the early phase of the disease. Nevertheless, the majority of the studies concerning rheumatoid arthritis physiopathology have focused on the established phase of this disease, while the knowledge regarding the cellular

interactions and the immunologic regulatory cascades involved in its onset are still scarce.

The main goal of this work was to study the early triggers of the inflammatory process in rheumatoid arthritis, including those involved in inflammasome activation. Accordingly, the first task in this study was the analysis of the early cytokine and chemokine environment in the early phase of rheumatoid arthritis. To that end, a cohort of untreated polyarthritis patients with less than six weeks of disease duration was prospectively followed up. These patients were evaluated at baseline (without treatment) and after short-term therapy with low dose of corticosteroids and methotrexate (MTX). The clinical follow up of these patients allowed the identification of two subgroups of patients: one that evolved into rheumatoid arthritis and another which evolved into other chronic inflammatory joint diseases or had self-limited forms of arthritis. Additionally, a second cohort of rheumatoid arthritis patients with established disease and under MTX therapy was also analyzed. Interestingly, we found that in the very early phase of rheumatoid arthritis there are increased levels of circulating cytokines related with the recruitment (IL-6), maturation and survival (a proliferation-inducing ligand (APRIL) and B-lymphocyte stimulator (BLyS)) of B cells, as well as a cytokine profile that supports neutrophil recruitment (IL-8) and Th17 cells polarization (IL-1 $\beta$  and IL-6) and activation (IL-17A and IL-22) when compared with other very early chronic inflammatory joint diseases and with the established phase of the disease. Furthermore, the analysis of synovial fluid samples from established rheumatoid arthritis patients treated with MTX also revealed a pattern of cytokines similar to that of the very early phase of the disease. Of note, treatment with corticosteroids and MTX, although clinically effective in reducing inflammatory manifestations, did not seem to affect the cytokine content in circulation.

The increased concentration of IL-1 $\beta$  observed since the early phase of the disease both in peripheral blood and in the synovial fluid may be explained by the increased levels of active caspase-1 that were also observed both in early untreated rheumatoid arthritis patients with less than 1 year of disease evolution and in established rheumatoid arthritis patients treated with MTX. The crucial role of IL-1 $\beta$  suggests that this cytokine could be a promising target for rheumatoid arthritis treatment. However, clinical trials with IL-1 receptor targeting (anakinra) and with IL-1 monoclonal antibody (canakinumab) have not revealed encouraging results in the established phase of rheumatoid arthritis compared with TNF antagonists. Therefore, we raised the hypothesis that IL-1 $\beta$  plays a complementary role to that of TNF and more relevant in the early stage of the disease rather than in the established phase.

Consequently, interference, during the early phase of arthritis, with pathways regulating both IL-1 $\beta$  and TNF could constitute a promising therapeutic option. To test this hypothesis, a drug screen was performed in a THP1 macrophage-like cell line in order to identify those that simultaneously down-regulate the production of both cytokines. The drugs that were selected were further studied in vivo in a wistar rat model of adjuvant-induced arthritis to analyze their potential anti-inflammatory properties. The in vivo experiments revealed that two of the selected drugs, celastrol and gambogic acid, have anti-inflammatory and anti-proliferative properties and are able to effectively treat arthritic rats, by an inhibitory effect of IL-1 $\beta$  and TNF, induced by a down-regulation of caspase-1 and NF-kB activation. Finally, to distinguish between the direct role for IL-1 $\beta$  as an effector or as an upstream initiator, by driving the differentiation of Th17 cells in the inflammatory process, a drug which inhibits retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma (ROR $\gamma$ )T transcriptional activity (digoxin) was also tested in vivo in the same animal model in order to observe its anti-inflammatory effects. We found that digoxin was able to ameliorate the inflammatory signs of the arthritic rats only if administered in the early phase of arthritis development, albeit with a slower and less efficient effect on disease progression compared with the drugs above mentioned. In contrast to digoxin, celastrol and gambogic acid are also effective if administered in the later phase of arthritis development, which is crucial for rheumatoid arthritis management. These results suggest that the isolated inhibition of Th17 cells polarization might be a strategy with limited efficacy, at least in the established phase of the disease.

Overall, the results of the present thesis support the hypothesis that IL-1 $\beta$  plays a more relevant role in the early rather than late phase of rheumatoid arthritis. Thus, these original results have important clinical implications, by suggesting that an earlier intervention of therapies targeting IL-1 $\beta$  pathways might be of beneficial clinical use to induce early remission and this strategy should be evaluated in rheumatoid arthritis patients.

**Key-words:** Rheumatoid arthritis, Inflammasome, Caspase-1, NF-kB, IL-1 $\beta$ , TNF, IL-17A, AIA rat model, Drugs