Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Farmacologia
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Participação do *Nlrp12* na diferenciação de linfócitos Th17 e no desenvolvimento da artrite
experimental

Douglas da Silva Prado

Ribeirão Preto

2016

DOUGLAS DA SILVA PRADO

Participação do *Nlrp12* na diferenciação de linfócitos Th17 e no desenvolvimento da artrite
experimental

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Farmacologia, da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
da Universidade São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciência.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof: Dr. José Carlos Farias Alves Filho

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER
MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA,
DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

Prado, Douglas da Silva

Participação do *Nlrp12* na diferenciação de linfócitos Th17 e no desenvolvimento da
artrite experimental. / Douglas da Silva Prado; Orientador: José Carlos Farias Alves Filho. –
Ribeirão Preto, 2016.

87 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, 2016.

1. Nlrp12 2. Linfócito Th17 3. Artrite experimental 4. Stat3

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: PRADO, Douglas da Silva

Título: Participação do *Nlrp12* na diferenciação de linfócitos Th17 e no desenvolvimento da artrite experimental.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo,
Para obtenção do grau de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Farmacologia

Aprovado em: ____ / ____ / 2016

Banca examinadora

Prof. Dr.: José Carlos Farias Alves Filho Instituição: FMRP – USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: Dario Simões Zamboni Instituição: FMRP – USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: Niels Olsen Saraiva Câmara Instituição: ICB-USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq.

*Dedico este trabalho a minha família, em especial,
aos meus pais, Geova e Clarice.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Geova e Clarice, pela educação, incentivo e por me ensinarem a importância da família na formação pessoal. Muito obrigado por tudo e desculpa por esse tempo longe. Vocês são os melhores pais do mundo.

Aos meus irmãos Lindaure, Giliard, Rafael e Cíntia, pela amizade e por sempre estarem dispostos a me ajudar, amo vocês.

Ao Prof. Dr. José Carlos Farias Alves Filho, pela paciência, por ter me aceitado no grupo e pela orientação.

Aos professores Fernando e Thiago Cunha, por terem ajudado no desenvolvimento desse projeto.

Aos professores Dario e Niels por terem aceitado o convite de participar da minha banca examinadora em um período que não é muito agradável.

Aos meus colegas do laboratório de inflamação e dor (LID), Alexandre Kanashiro, Alexandre Lopes, André, Andressa Freitas, Andreza Urba, Annie, Arthur, Bárbara, Bruno, Caio, Cássia, Cindy, Cláudia, Daniele Nascimento, David Cólón, David Ferreira, Erivan, Fábio, Fernanda, Flávia, Flávio, Gabriel, Guilherme, Jaqueline, João Paulo, Juliana, Larissa, Letícia, Marcela, Marcelo, Miriam, Paula Barbim, Paula Viacava, Paulo, Priscila, Rangel, Raphael Ferreira, Raphael Peres, Ricardo, Silvia, Taty, Vanessa e Verena, pela convivência e companheirismo durante esse período.

Aos meus colegas do LID que auxiliaram na execução desse projeto, Flávio, Raphael e Paulo, muito obrigado pela ajuda. Eu não teria conseguido realizar esse trabalho sem a ajuda de vocês.

Aos meus colegas da pós-graduação em Farmacologia, Alice, Andreza, Carla, Cassiano, Dani, Davi, Deidi, Juliana, Leandro, Manuh, Mayara, Naielly, Nicole e Téó, pelo convívio e pelos momentos divertidos que tive com vocês.

Aos meus colegas Mikhael, Pedro e Raphael Peres pela convivência e amizade diária nesse último ano de mestrado.

Aos técnicos Adriana, André, Cristina, Denise, Diva, Eliane, Giu, Ieda, Inês, Kátia, Marquinhos, Orlando, Roberta, Serginho e Stella pelo apoio técnico e companheirismo durante esse período.

Ao Laboratório Multiusuário de Imagem e Biofotônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, pelo uso do aparelho IVIS Spectrum.

As competentes secretárias do departamento de farmacologia, Fátima e Soninha e ao brilhante técnico de finanças Ramon pelo suporte, disponibilidade e atenção durante esses dois anos.

Ao professor Enilton Camargo, pelas aulas de Farmacologia na graduação e pelo incentivo em fazer pós-graduação.

Aos meus amigos da graduação, Anderson Ferreira, Anderson Wagner, Bruno, Denyson e Jadiel pela amizade que possui mais de 7 anos.

Ao meu grande amigo Vinícius pela amizade e companheirismo em diversos momentos da minha vida.

Ao meu amigo Carlos, pelo pela amizade e incentivo aos estudos desde quando eu era uma criança.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro, apesar de insuficiente e pouco pontual na fase final do mestrado.

*“O Dinheiro faz homens ricos, o conhecimento faz
homens sábios e a humildade faz grandes homens”*

Mahatma Gandhi

PRADO, D.S. **Participação do *Nlrp12* na diferenciação de linfócitos Th17 e no desenvolvimento da artrite experimental.** 2016. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Resumo

A Artrite reumatoide é uma doença autoimune que acomete cerca de 1% da população mundial adulta, sendo caracterizada pela participação de linfócitos Th17 no seu desenvolvimento. Na busca por novos alvos terapêuticos e pela compreensão da fisiopatologia, se destacam os inflamassomas que são plataformas proteicas, caracterizados pela produção de citocinas pró-inflamatórias por células do sistema imune inato. De forma interessante, foi demonstrado que linfócitos T CD4 também expressam alguns sensores dessas plataformas, como o *Nlrp12*. Adicionalmente, este sensor é responsável pela modulação negativa do NF-κB, demonstrando outra característica atípica em relação aos outros inflamassomas. Nesse sentido, foi avaliada a participação do *Nlrp12* no desenvolvimento da artrite experimental e na diferenciação linfócitos Th17. Foi verificado nesse estudo que o *Nlrp12* é regulado positivamente durante o desenvolvimento da artrite experimental, sendo um modulador negativo desse processo. Isso se deve a uma redução na resposta inflamatória inata do modelo e pela modulação negativa na resposta Th17. Nesse sentido, o controle da resposta Th17 e o desenvolvimento da artrite experimental ocorre por um mecanismo dependente da fosforilação do fator de transcrição Stat3, que é crítico na diferenciação de linfócitos Th17. Desta forma, este estudo demonstra uma nova função para o sensor *Nlrp12* no desenvolvimento da artrite experimental, por modular a resposta imune adaptativa de forma direta nos linfócitos T CD4.

Palavras-Chaves: *Nlrp12*, Linfócitos Th17, Artrite e Stat3.

PRADO, D.S. **Role of *Nlrp12* on Th17 differentiation and experimental arthritis development.** 2016. Dissertation (Master). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Abstract

Rheumatoid Arthritis is an autoimmune disease that occurs in approximately 1% of the adult population worldwide, with critical role of Th17 cells in your development. In the search for new therapeutic targets and the understanding of the pathophysiology, there are inflammasomes which are protein platforms, characterized through pro-inflammatory cytokines production by innate immune system cells. Interestingly, it was demonstrated that CD4 T cells express some inflammasome sensors, as *Nlrp12*. Additionally, this sensor is responsible for downregulation of NF- κ B, showing another atypical feature in relation to other inflammasomes. Thereby, it was evaluated the role of *Nlrp12* on experimental arthritis development and Th17 differentiation. It was found in this study that *Nlrp12* is upregulated during experimental arthritis development, working as negative regulator of this process. Thus, *Nlrp12* downregulates innate inflammatory response from experimental model and Th17 response. Therefore, experimental arthritis development and Th17 differentiation control occurs in a Stat3 phosphorylation dependente-manne, which is a critical transcription factor on Th17 differentiation. Thus, this study demonstrates a new function for *Nlrp12* on experimental arthritis development, by directly to modulate adaptive immune response in CD4 cells.

Keywords: *Nlrp12*, Th17 cells, Arthritis and Stat3.

Índice de Figuras

Figura 1.....	08
Figura 2.....	13
Figura 3.....	19
Figura 4.....	38
Figura 5.....	39
Figura 6.....	40
Figura 7.....	41
Figura 8.....	42
Figura 9.....	44
Figura 10.....	46
Figura 11.....	47
Figura 12.....	48
Figura 13.....	49
Figura 14.....	50
Figura 15.....	51
Figura 16.....	52
Figura 17.....	53
Figura 18.....	54
Figura 19.....	55
Figura 20.....	56
Figura 21.....	57
Figura 22.....	58

Sumário

1. Introdução.....	3
1.1 Papel crucial dos linfócitos Th17 no desenvolvimento da artrite reumatóide.....	3
1.2 <i>Nlrp12</i> , um possível alvo no controle da autoimunidade	166
2. Objetivos	24
2.1 Objetivos específicos:.....	24
2.1.1. Avaliar o papel do <i>Nlrp12</i> no desenvolvimento da artrite experimental;.....	24
2.1.2. Determinar o papel dos linfócitos CD4 ⁺ <i>Nlrp12</i> ^{-/-} no desenvolvimento da artrite experimental;	24
2.1.3. Avaliar o papel do <i>Nlrp12</i> na diferenciação de linfócitos Th17 <i>in vitro</i> ;.....	24
2.1.4. Determinar por qual mecanismo o <i>Nlrp12</i> modula a diferenciação de linfócitos Th17 e o desenvolvimento da artrite experimental;.....	25
3. Material e Métodos.....	27
3.1 Animais.....	27
3.2 Modelo experimental de Artrite induzida por antígeno.....	27
3.3 Modelo experimental de Artrite induzida por Zymosan	27
3.4 Determinação do infiltrado de neutrófilos na articulação	28
3.5 Mensuração de citocinas por ELISA	28
3.6 <i>Recall</i> no modelo de Artrite induzida por antígeno.....	29
3.7 Transferência de linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁻	30
3.8 Marcação intracelular para citometria de fluxo	30
3.9 Cultura de linfócitos T CD4 ⁺	30
3.10 Ensaio de marcação intracelular de proteínas fosforiladas (<i>Phosflow</i>)	32
3.11 <i>Western Blot</i>	32
3.12 PCR em Tempo Real	33
3.13 Análise estatística	35
4. Resultados	37
5. Discussão.....	60
6. Conclusão.....	66
Referências	68

Introdução

1. Introdução

1.1 Papel crucial dos linfócitos Th17 no desenvolvimento da artrite reumatóide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune com presença de um processo inflamatório nas articulações, com destruição da cartilagem e hiperplasia da sinóvia. A sintomatologia dessa doença é caracterizada por dor, edema nas articulações, fadiga, anorexia, problemas psicológicos, etc, com importância epidemiológica, em virtude da incidência de cerca de 1% de incidência em adultos. Além disso, a taxa de mortalidade em indivíduos com artrite é maior quando comparada a pessoas saudáveis, sendo que essa situação encontra-se praticamente constante nas últimas décadas (BRENNAN; MCINNES, 2008; CHOY, 2012; SATO et al., 2006; TALBOT et al., 2015).

A fisiopatologia da AR possui a participação de diversas células do sistema imune inato (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e adaptativo (células T e B), com produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17, que induzem intenso infiltrado leucocitário, com consequente dano na região intra-articular (BRENNAN; MCINNES, 2008; CHOY, 2012; SATO et al., 2006). Além de possuir um mecanismo fisiopatológico complexo, a AR não possui uma causa bem definida, sendo o desenvolvimento atribuído a causa genética, influência de fatores ambientais e exacerbação da resposta imune (CHOY, 2012).

A maior parte das alterações genéticas nos pacientes com AR são em genes que encodam o TNF- α , no complexo de histocompatibilidade humano e genes associados a MAPK. Em relação aos fatores ambientais, é bem estabelecido que o tabagismo e infecções podem influenciar o desenvolvimento e gravidade da doença. Enquanto que a resposta imune exacerbada é mediada pelo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, infiltrado celular na região intra-articular, com posterior proliferação dos sinoviócitos e degradação da

cartilagem por osteoclastos e neutrófilos (KLARESKOG; PADYUKOV; ALFREDSSON, 2007; SMOLEN; STEINER, 2003).

De forma interessante, além dos fenômenos intra-articulares, há manifestações extra-articulares ou até mesmo sistêmicas, as quais acometem cerca da metade dos pacientes com AR. As principais complicações extra-articulares são vasculite, pericardite, uveíte, nódulos reumatoides e pulmão reumatoide. Enquanto que dentre as manifestações clínicas sistêmicas se destacam anemia, doença cardiovascular, fadiga, depressão, produção de proteínas de fase aguda e osteoporose (CHOY, 2012; HOCHBERG; JOHNSTON; JOHN, 2008; POLLARD; CHOY; SCOTT, 2005).

A terapia farmacológica para o tratamento da AR consiste no uso de anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDS) e de drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDS). Enquanto que os primeiros atenuam alguns eventos inflamatórios mediados pela produção de prostaglandinas, via enzima ciclooxigenase (COX), a segunda classe de drogas modula o desenvolvimento da doença, dispensando o uso de NSAIDS no tratamento sintomático em alguns casos. Os DMARDS podem ser classificados em pequenas moléculas e agentes biológicos, classificação que obedece uma questão temporal do desenvolvimento dessas drogas (SMOLEN; STEINER, 2003). O uso dessas drogas se iniciou na primeira metade do século XX, com sais de ouro e a cada década foram lançadas outras alternativas terapêuticas, com consequente surgimento dos agentes biológicos. Os principais DMARDS do grupo das pequenas moléculas são os sais de ouro, sulfasalazina, azatioprina, ciclosporina A, leflunomida e metotrexato. Dentre os agentes biológicos se destacam o infliximabe, etanercepte, adalimumabe, rituximabe, anakinra e tocilizumabe (EMERY; DÖRNER, 2011; SMOLEN; STEINER, 2003).

O padrão ouro no tratamento da AR é o metotrexato (MTX), o qual possui como mecanismo de ação a inibição do metabolismo do ácido fólico pela diidrofolato redutase. Posteriormente, observando que essa droga aumenta os níveis extracelulares de ATP, o qual é convertido em ADP e AMP, pela ectonucleotidase CD39, o qual em seguida é degradado para a formação de adenosina pela ectonucleotidase CD73. Desta forma, os efeitos atenuantes do MTX sobre o desenvolvimento da artrite reumatóide ocorrem de maneira dependente da expressão dessas ectonucleotidasas e dos receptores de adenosina (MONTESINOS et al., 2003, 2007; SANCHES et al., 2015).

O uso dos agentes biológicos no tratamento da AR está relacionado a compreensão da fisiopatologia da doença. Desta forma, iniciou-se o tratamento da doença com anticorpos neutralizantes contra algumas citocinas que estão elevadas na sinóvia de pacientes em relação a indivíduos saudáveis, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, as quais são cruciais no desenvolvimento da AR. Além dessas citocinas, outros alvos no desenvolvimento dos agentes biológicos são as células do sistema imune adaptativo (linfócitos T e B), devido a sua participação na fisiopatologia da AR (CHOY, 2012; SIEBERT et al., 2015).

Os agentes neutralizantes da citocina TNF- α são divididos em anticorpos monoclonais (infliximabe, adalimumabe e golimumabe), anticorpo humanizado (certolizumabe) e o receptor solúvel (etanercepte) que prejudicam a ligação dessa citocina com os seus receptores, sendo utilizados em monoterapia ou em conjunto com o MTX, apresentam uma melhora significativa em relação a monoterapia com esta droga. (CHOY, 2012; SIEBERT et al., 2015). Os principais eventos adversos associados ao uso dessas drogas estão relacionados a suscetibilidade a infecções, recorrência de casos de tuberculose, infecções virais e casos de desenvolvimento de melanoma (CONTRIBUTION, 2011; FERRI et al., 2008; KEANE J, GERSHON S, WISE RP, MIRABILE-LEVENS E, KASZNICA J,

SCHWIETERMAN WD, SIEGEL JN, 2001; RAASCHOU et al., 2013). Além disso, o alto custo desses agentes biológicos dificulta a sua utilização (SULLIVAN et al., 2013).

O bloqueio das citocinas IL-1 α e β é feito com o agente anakinra, que é um recombinante do antagonista endógeno (IL-1Ra) do receptor IL-1R, que também possui eficácia terapêutica. O bloqueio da IL-1 β promovido por drogas como o anakinra é importante na redução do processo inflamatório e da progressão radiológica. Adicionalmente, o uso de agentes biológicos anti-TNF- α em combinação com o anakinra não apresenta melhora no prognóstico dos pacientes com AR, o que está associada aos efeitos redutores promovidos por essas drogas (SIEBERT et al., 2015; SMOLEN; STEINER, 2003). As principais desvantagens no seu uso são a ocorrência mais frequente de infecções e o seu regime terapêutico que consiste na injeção diária por via subcutânea, reduzindo a sua aceitação clínica (FLEISCHMANN et al., 2003).

Outros agentes biológicos utilizados para a modulação da progressão da doença são anticorpos anti-IL-6, como o tocilizumabe que se liga o IL-6R, reduzindo a ligação da IL-6 em seu receptor e inibindo a sua via de sinalização que é crítica para a diferenciação de linfócitos Th17, via fosforilação de Stat3. Nesse sentido, foi observado em pacientes com AR que o tratamento com tocilizumabe reduziu a frequência de linfócitos Th17, além de aumentar a de células T reguladoras, que são importantes na homeostasia da resposta imune (SAMSON et al., 2012). Assim como os outros agentes biológicos, um dos principais eventos adversos são as infecções, sendo a principal para o uso de tocilizumabe a pneumonia bacteriana (SCHIFF et al., 2011). Os anticorpos neutralizantes para IL-17 são os secukinumabe e ixekizumabe, que encontram-se em fase III e II dos testes clínicos, respectivamente, com resultados promissores na terapia farmacológica como adjuvante do MTX e agentes biológicos anti-TNF- α (GIZINSKI; FOX, 2014). Assim como os outros agentes biológicos, o

aumento nos casos de infecção (infecção fúngica para os anticorpos anti-IL-17) e o alto preço dificultam a sua utilização (SIEBERT et al., 2015).

Na tentativa de compreender a fisiopatologia da AR e promover o desenvolvimento de novos alvos farmacológicos, em virtude da irresponsividade de alguns pacientes as drogas disponíveis, são utilizados modelos animais de artrite experimental, dentre eles se destacam: artrite induzida por zymosan (ZIA), por antígeno (AIA) e colágeno (CIA), que possuem similaridades e diferenças com as características da doença em pacientes (ASQUITH et al., 2009). Apesar de nenhum dos modelos representar de forma idêntica a fisiopatologia da doença, várias observações e intervenções farmacológicas ou genéticas correlacionam com alguns dados obtidos em pacientes (BEVAART; VERVOORDELDONK; TAK, 2010). A figura 1 demonstra as alterações articulares que acontecem durante o desenvolvimento da artrite experimental.

Fig. 1. Micro tomografias computadorizadas de animais na:ives ou submetidos ao protocolo de artrite induzida por colágeno. A) e C) representam a pata anterior e a articulação tíbio-femoral de um animal *naïve*, B) e D) demonstram a pata anerior e a articulação tíbio-femoral de um animal submetido ao protocolo de CIA (MELO et al., dados não publicados).

O modelo de artrite induzida por zymosan consiste na injeção intra-articular desse composto, sendo este um polissacarídeo presente no fungo *Sacchoaromyces cerevisiae*, que se liga os receptores TLR-2. A administração desse composto leva a um processo inflamatório intenso na articulação do animal, com edema, nocicepção e infiltrado de células. A ligação do zymosan no receptor TLR-2 leva a ativação do NF- κ B, com consequente

produção das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8. Esse modelo tem envolvimento de células do sistema imune inato e tem características agudas, não mimetizando características mais complexas da AR, como a destruição da articulação, degradação da cartilagem e hiperplasia da sinóvia, mas representa um quadro de inflamação articular (ASQUITH et al., 2009; FRASNELLI et al., 2005).

Diferente do modelo anterior, a artrite induzida por antígeno possui participação do sistema imune adaptativo, com função crucial dos linfócitos T (Th17) no desenvolvimento da doença. Esse modelo é dependente da produção de IL-17, uma vez que animais tratados com um anticorpo neutralizante dessa citocina desenvolve uma forma muito atenuada da doença (PINTO et al., 2010). Diferente da AR, o AIA produz menor degradação da cartilagem e não há produção do fator reumatóide. De forma semelhante a AR, o AIA produz hiperplasia na sinóvia, um processo inflamatório na articulação e produção de anticorpos (ASQUITH et al., 2009).

O melhor modelo experimental é o de artrite induzida por colágeno, uma vez que possui várias semelhanças com a AR. O CIA possui várias características em comum com a AR, como envolvimento simétrico das articulações, inflamação na sinóvia e destruição da cartilagem. Assim como o modelo de AIA, o CIA é dependente da resposta Th17, uma vez que o tratamento com anticorpo neutralizante para IL-17 reduz o desenvolvimento da doença. No entanto, este modelo possui algumas diferenças em relação a AR, como o fato dele não ser caracterizado por remissões e a formação de anticorpos contra colágeno. De forma interessante, os animais utilizados nesse modelo são os DBA/1, que desenvolvem de forma “espontânea” a artrite, uma vez que não é necessário um desafio na região intra-articular de algum composto. (ASQUITH et al., 2009; LUBBERTS et al., 2004). Assim, uma das limitações desse modelo é no uso de animais modificados geneticamente, uma vez que esses

possuem com maior frequência o *background* em animais C57BL/6, e como citado anteriormente esse modelo é realizado em outra linhagem de animais.

A modulação da resposta imune adaptativa em doenças autoimunes é protagonizada por dois tipos celulares, os linfócitos T reguladores (Tregs) e Th17. Enquanto que as Tregs são responsáveis pelo controle da tolerância imunológica, as células Th17 estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças autoimunes ou imuno mediadas, como: artrite reumatoide, encefalomielite, psoríase, lúpus eritematoso, etc. De forma interessante, é observado nessas doenças o aumento da frequência de linfócitos Th17 e da sua estabilidade, enquanto há redução da função supressora de Tregs. Desta forma, o controle da tolerância imunológica é perdido nessas condições inflamatórias, com a perda do equilíbrio entre a função inibidora que uma célula exerce na outra (GIZINSKI; FOX, 2014; KLEINWIEFELD; HAFLER, 2014; NOACK; MIOSSEC, 2014).

Os linfócitos Th17 são um subtipo efetor de célula T que estão associadas com inflamação e autoimunidade. Essas células são caracterizadas pela produção de IL-17A (ou simplesmente IL-17), IL-17F, IL-21 e IL-22, além dos outros subtipos da IL-17 (que não possuem funções bem definidas). Os diversos subtipos de IL-17 (A, B, C, D, E e F) irão se ligar em receptores que possuem afinidade diferente para esses ligantes, que são os IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD e IL-17RE. De forma interessante, as principais células que expressam esses receptores (ou seja, que são os alvos de ação da IL-17) são macrófagos, células endoteliais, fibroblastos, sinoviócitos, queratinócitos, etc, não sendo expressos nas células Th17, ou seja, a produção de IL-17 por estas células não possui função autócrina (GAFFEN, 2011; IWAKURA et al., 2011).

Dentre os subtipos de IL-17, as citocinas IL-17A e IL-17F são as que possuem melhor caracterização em relação aos efeitos produzidos por elas. Essas duas citocinas possuem alta

homologia, se ligando aos mesmos receptores (IL-17RA e IL-17RC), seja na forma de homodímeros ou heterodímeros (CHANG; DONG, 2007). Sendo os efeitos pró-inflamatórios destas citocinas estão relacionados a indução de citocinas (IL-1 β , TNF α e IL-6) e quimiocinas (CXCL1, CXCL8 e MCP-1) pró-inflamatórias, além de metaloproteinases. As outras citocinas produzidas pelos linfócitos Th17 são IL-21 que atua na amplificação da resposta Th17 e a IL-22 que na função efetora, sendo associada a uma célula Th17 com fenótipo mais patogênico dependente da IL-23 (BETTELLI et al., 2008; FOSSIEZ et al., 1996; PARK et al., 2006).

O principal fator de transcrição dos linfócitos Th17 que regula a sua diferenciação é o ROR γ t (recptor órfão relacionado com o receptor do ácido retinóico - *retinoic acid receptor-related orphan receptor*), apesar de células deficientes para esse fator de transcrição produzirem baixa quantidade de IL-17. De forma interessante, esta produção está relacionada a outro fator de transcrição, ROR α . Ambos fatores de transcrição são expressos preferencialmente por células Th17 e possuem como principais indutores a combinação de TGF- β e IL-6, uma vez que atuando separadamente a expressão dos genes *Rora* e *Rorc* que codificam o ROR α e ROR γ t, respectivamente, é muito menor. Nesse sentido, a transfecção de ROR γ t em células *naïves* induz a produção de IL-17, enquanto animais deficientes para *Rora* ou *Rorc* desenvolvem de maneira atenuada ou não apresentam o desenvolvimento de encefalomielite autoimune experimental (EAE) (IVANOV et al., 2006; YANG et al., 2008).

Durante a diferenciação do subtipo Th17, o TGF- β em conjunto com a IL-6 possuem função essencial na expressão dos fatores de transcrição principais destas células (ROR γ t e ROR α), levando a produção das citocinas características desse padrão, como a IL-17 (Fig. 2). De forma interessante, animais deficientes para Smad2-3 não possuem alteração na expressão de *Rorc* e *Rora*, acreditando-se que a via de sinalização do TGF- β para a diferenciação de células Th17 é independente das proteínas da família Smad. No entanto, foi demonstrado que

linfócitos T CD4 deficientes para Smad3 possuem um pequeno comprometimento na diferenciação para o padrão Th17, enquanto que na deficiência de Smad2, há uma crítica redução. De forma interessante, a diferenciação é abolida em linfócitos T deficientes para as duas proteínas. A justificativa para esse efeito está na modulação negativa da produção de citocinas pró-inflamatórias que reduzem a diferenciação para o padrão Th17, como IFN- γ e IL-2, pelo complexo Smad2-3. Desta forma, ao se utilizar um anticorpo anti-IL-2 a diferenciação para Th17 é totalmente restaurada em animais deficientes para Smad2 ou Smad3 (BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007; IVANOV et al., 2006; TAKIMOTO et al., 2010; YANG et al., 2008). Além disso, o TGF- β é crucial na diferenciação de linfócitos Th17 por um mecanismo dependente da redução da expressão de SOCS3, a qual é uma fosfatase que desfosforila o fator de transcrição Stat3, descrito abaixo (QIN et al., 2009).

Outras três citocinas são importante na diferenciação de linfócitos Th17, que são IL-1 β , IL-21 e IL-23. A IL-1 β é importante na fase inicial da diferenciação, sendo crítica para a expressão de ROR γ t e na amplificação da fosforilação de Stat3, que como citado anteriormente são dois fatores de transcrições que promovem a diferenciação de linfócitos Th17 (BASU et al., 2015; CHUNG et al., 2009). A IL-21 promove amplificação da resposta Th17, atuando em seu receptor (IL-21R), sendo importante na produção de IL-17 e expressão de ROR γ t. Adicionalmente, estes efeitos são mediados pela sinalização do fator de transcrição Stat3 e de forma independente da IL-6 (KORN et al., 2007; NURIEVA et al., 2007; WEI et al., 2007). Diferente da IL-1 β e IL-21, a IL-23 aumenta a resposta Th17 por ser importante na estabilidade dos linfócitos Th17, os quais passam a expressar o receptor IL-23R após a diferenciação. Além disso, a sinalização promovida pela ligação da IL-23 em seu receptor é importante na assinatura patogênica (expressão diferente de alguns genes relacionados a resposta Th17) dos linfócitos Th17 (LANGRISH, 2005; LEE et al., 2012; ZHOU et al., 2007).

Fig. 2. Processo de diferenciação dos diferentes subtipos de linfócitos T *helper*. Adaptado: (CRAFT, 2012; LEUNG et al., 2010).

Outro fator de transcrição importante na indução do Rora e Rorc é o Stat3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3) que é fosforilado após a ligação da IL-6 em seu receptor (CD126 e Gp130, cadeia α e β do receptor, respectivamente) por enzimas da família *janus kinase*. Após essa ativação, ocorre dimerização, translocação para o núcleo e ligação em alguma região promotora para modulação da transcrição gênica. Assim, a diferenciação para o padrão Th17 promovido pelo Stat3 é mediada pela indução dos fatores de transcrições característicos dessas células (HARRIS et al., 2007) .

O fator de transcrição Stat3 é indispensável para a diferenciação de linfócitos Th17, uma vez que células T CD4 deficientes para Stat3 não diferenciam para esse subtipo, e a

deleção desse fator de transcrição está relacionada com a proteção no desenvolvimento de encefalomielite autoimune experimental. Além disso, a super expressão de Stat3 aumenta a diferenciação para Th17, demonstrando a importância deste para o desenvolvimento desse tipo celular. O possível mecanismo para isso estar relacionado a ligação do Stat3 na região promotora do gene *Il17a* (BETTELLI et al., 2008; HARRIS et al., 2007; KORN et al., 2009; YANG et al., 2007). De forma interessante, além de ser crucial na transcrição de IL-17A, o fator de transcrição Stat3 é importante na expressão de outros genes relacionados com a diferenciação, estabilidade ou função das células Th17, como: IL-21, IL-23R, IL-17F e IL-22. Com isso, a sinalização da citocina IL-6, via Stat3, é indispensável para diferenciação e função dos linfócitos Th17 (YANG et al., 2007).

Durante muito tempo foi atribuído demasiada importância para os linfócitos Th1 no desenvolvimento de doenças autoimunes, incluindo a AR. Aparantemente, os efeitos observados estavam relacionados com o fato de IL-12 e IL-23 compartilharem uma subunidade dos seus receptores, denominada de cadeia p40. Apenas em 2000 foi descoberta a cadeia p19 que em conjunto com a p40 compõe a citocina IL-23, fundamental na resposta Th17, por promover estabilidade e consequentemente caráter patogênico a essas células (OPPMANN et al., 2000). Desta forma, foi demonstrado que animais deficientes para p19 (IL-23^{-/-}) são protegidos do desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE), devido há uma menor resposta Th17, o que não acontece com os animais deficientes apenas para IL-12 (p35^{-/-}) (CUA et al., 2003; LANGRISH, 2005). Corroborando esse dado, já havia sido demonstrado que animais deficientes para IFN- γ são suscetíveis ao desenvolvimento de modelos experimentais que mimetizam doenças autoimunes, como EAE, CIA e AIA. Isso confirma a participação da resposta Th17 em detrimento da Th1 no desenvolvimento de doenças autoimunes (FERBER et al., 1996; IRMLER; GAJDA; BRAUER, 2007; LEE et al., 2013; WILLENBORG et al., 1996).

De forma interessante, altos níveis de IL-17 são encontrados no fluido sinovial de pacientes com AR, a qual está associada com maior desenvolvimento da doença (LUBBERTS, 2015). A IL-17 contribui para a migração de neutrófilos e ativação de células dendríticas (que possuem o receptor IL-17RA), produzindo mais IL-6 que é crucial na diferenciação de linfócitos T *naïve* para o padrão Th17, e atua diretamente na infiltração de neutrófilos durante o processo inflamatório. Além disso, os linfócitos Th17 promovem destruição do tecido ósseo e da cartilagem da sinóvia, uma vez que ativa sinoviócitos e osteoclastos, via indução de RANKL, que é importante na osteoclastogênese (KOTAKE et al., 1999; YANG et al., 2014). Assim, a descoberta das células Th17 alterou a compreensão da progressão da AR, tendo sido desenvolvidas várias ferramentas farmacológicas que possuem como alvo os linfócitos Th17, como os anticorpos neutralizantes citados anteriormente (GIZINSKI; FOX, 2014). Em modelos de artrite experimental, é bem definido o papel da IL-17 sobre a severidade da doença, uma vez que o tratamento com anticorpo anti-IL-17 e a deficiência desta citocina reduzem o desenvolvimento do modelo experimental. Além disso, a administração de IL-17 na articulação dos animais leva ao desenvolvimento da artrite experimental (LUBBERTS et al., 2004; NAKAE et al., 2003; PINTO et al., 2010).

Outra citocina produzida pelas células Th17 que é importante no desenvolvimento da AR é a IL-22. Os níveis séricos e intra-articulares desta citocina estão elevados em pacientes com artrite reumatóide em relação a indivíduos saudáveis, além de existir uma associação entre a produção de IL-22 com o *score* da doença e concentração de RANKL, que é crucial na diferenciação osteócitos para osteoclastos, como citado anteriormente (DA ROCHA et al., 2012; KIM et al., 2012; LEIPE et al., 2011; XIE; HUANG; LI, 2015). Dados de modelos de artrite experimental confirmam o crucial papel da IL-22 na fisiopatologia da artrite, uma vez que animais deficientes para essa citocina desenvolve de forma mais atenuada a doença, com

atenuação na migração de neutrófilos, edema, nocicepção e produção de citocinas pró-inflamatórias (GEBOES et al., 2009; PINTO et al., 2015).

1.2 *Nlrp12*, um possível alvo no controle da autoimunidade

Receptores de reconhecimento padrão (PRR) são responsáveis pela defesa do organismo através da detecção de micróbios patogênicos, com a indução de uma resposta inflamatória mediada por células do sistema imune inato. Há diversos grupos de PRRs, como: receptores Toll-Like, NOD-Like, RIGs, Lectina do tipo C, *scavengers*, etc. Esses receptores estão localizados em diversos compartimentos celulares, como a membrana plasmática e o citoplasma, possuindo expressão tecido-dependente, e com afinidade diferente para os diversos tipos de patógenos (IWASAKI; MEDZHITOV, 2015; SELLGE; KUFER, 2015).

Dentre os PRRs, os receptores da família NOD (NLR - *Nucleotide binding oligomerization domain-like receptor*) são receptores citosólicos responsáveis pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógeno (PAMP) e padrões moleculares associados a dano (DAMP), sendo constituídos de uma região amino terminal que é a região de interação proteína-proteína, importante na função efetora, o domínio NOD na região central (importante na ativação e oligomerização do receptor) e uma cauda carboxila terminal, a qual possui repetições ricas em leucina (*LRR*), sendo responsável por reconhecimento do antígeno (CARUSO, R., WARNER, N., INOHARA, N., NÚÑEZ, 2014).

Esses receptores estão presentes na maioria dos inflamassomas, que são complexos multi-proteicos responsáveis pelos mecanismos de defesa contra agentes infecciosos. Desta forma, os inflamassomas são formados por um sensor (receptores da família NOD), uma proteína adaptadora (ASC) e uma molécula efetora que é uma caspase-1 ou caspase-11 (responsável pela clivagem de citocinas em formas imaturas para suas formas ativas). A sua função está relacionada com a produção de citocinas pro-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18,

as quais levam a morte celular por piroptose (LATZ; XIAO; STUTZ, 2013; RATHINAM; VANAJA; FITZGERALD, 2012).

Desta forma, os inflamassomas são importantes na defesa do hospedeiro frente a infecções desencadeadas por vírus, bactérias, protozoários e fungos. Assim, diversos agentes infecciosos como *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia pestis*, vírus da hepatite, *Leishmania*, *Toxoplasma gondi*, *Candida albicans*, etc., levam a ativação do inflamassoma, promovendo proteção do organismo. Demonstrando que diversos patógenos ou moléculas liberadas por esses levam a ativação do inflamassoma, que possui um amplo espectro de ação no combate a infecções (RATHINAM; VANAJA; FITZGERALD, 2012).

Durante ativação do inflamassoma, o reconhecimento desses PAMPs ou DAMPs pelo sensor e consequente produção de citocinas pró-inflamatórias (forma imatura), constitui a primeira etapa. O próximo passo é a liberação de várias moléculas como ATP, espécies reativas de oxigênio (ROS) e catepsina B ou alteração iônica da célula (segundo estímulo), como efluxo de potássio e influxo de cálcio, sendo deflagrados em virtude do acúmulo dos agentes infecciosos. A resposta desencadeada após esse segundo estímulo é a ativação da plataforma, caracterizada por recrutamento da proteína adaptadora e da região efetora e posterior clivagem de pro-IL-1 β e pro-IL-18 nas suas respectivas formas ativas (NEGASH, A., GALE, 2015)

O sensor de cada inflamassoma é responsável pela especificidade do complexo, designando o nome para este. A maioria dos inflamassomas é composta do sensor NOD-Like (NLR), um região carboxila terminal, contendo repetições de leucina e uma N-terminal, que pode ser constituído de um domínio pyrin: *Nlrp1-14*, domínio CARD (*Caspase activation and recruitment domain*): *Nlrc3-5*, domínio ácido: *Nlra (CIITA)* e domínio BIR: *Nlrp (Naip)* (LU;

WU, 2015; MAN, 2015; WALSH; MURUVE; POWER, 2014). A nomenclatura dos inflamassomas de acordo com a região N-terminal será descrito a seguir.

Dentre esses sensores se destaca o *Nlrp12* por ter propriedade anti-inflamatórias, o que diverge dos outros inflamassomas, como abordado posteriormente. O gene que codifica o *Nlrp12* foi inicialmente chamado de *rno* (regulado pelo óxido nítrico), uma vez que a incubação com óxido nítrico em células mielóides humanas aumentava a expressão desse sensor, sendo a proteína caracterizada por uma longa repetição de leucina (SHAMI et al., 2001). A seguir, outras denominações foram utilizadas para esse gene, como em 2002, quando outro grupo o designou de *PYPAF7* (Pyrin-containing Apaf1-like proteins), em virtude da semelhança estrutural com uma proteína apoptótica (Apaf1) e pela produção de IL-1 β , por um mecanismo dependente de caspase-1 (WANG et al., 2002). E em 2003, quando foi denominado de *Monarch-1* por outro grupo (WILLIAMS et al., 2003).

Com o objetivo de padronizar a nomenclatura após o uso de vários termos para a descrição de um mesmo gene, foi realizada uma reunião do Comitê de Nomenclatura de Genes (HGNC), atribuindo o termo “*nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing*”, para o nome da família e a nomenclatura para as subfamílias baseada na região N-terminal. Portanto, foram criadas quatro subfamílias, nomeadas de: *Nlra*, *Nlrab*, *Nlrcl* e *Nlrp* (TING et al., 2008), sendo esses domínios designados de ácido, baculoviral, CARD e Pyrin, respectivamente (Fig. 3).

Fig. 3. Membros da família NLR de acordo com a região N-terminal. Adaptado: (ZHONG; KINIO; SALEH, 2013).

Inicialmente, foi descrito que o *Nlrp12* interage com ASC ativando caspase-1, com consequente ativação do NF- κ B e liberação de IL-1 β , possuindo essa característica comum as outras plataformas do inflamassoma (WANG et al., 2002). Assim como outras plataformas, o inflamassoma de *Nlrp12* é importante na resposta a algumas infecções causadas por bactérias gram-negativas e protozoários. O controle dessas infecções é divergente entre as espécies de agente patogênicos, por exemplo, enquanto o *Nlrp12* tem função protetora contra *Yersinia pestis* por ser importante na produção de IL-18, o mesmo é prejudicial na infecção por *Samonella typhimurium* por reduzir a ativação do NF- κ B e na infecção por *Plasmodium*, por aumentar a produção de elevados níveis de IL-1 β (ATAIDE et al., 2014; VLADIMER et al., 2012; ZAKI et al., 2011).

No entanto, os dados posteriores na literatura divergem desse achado, demonstrando que diferentemente dos outros inflamassomas, o *Nlrp12* atua como um regulador negativo da ativação do fator de transcrição NF- κ B, com redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (LICH et al., 2007; TUNCER; FIORILLO; SORRENTINO, 2014). Nesse sentido, foi demonstrado que o aumento da expressão de *Nlrp12* reduz a sinalização dos receptores Toll-Like, sendo que a ativação destes receptores reduz a expressão de *Nlrp12*. Além disso, foi demonstrado o *Nlrp12* reduz a sinalização dependente dos receptores toll-like por um mecanismo que é dependente da redução da fosforilação de IRAK-1 (Kinase associada ao receptor de IL-1) e consequentemente de NF- κ B. Nesse sentido, o *Nlrp12* demonstra um papel importante na regulação da resposta inflamatória ao reduzir a ativação de vias clássicas na indução e manutenção do processo inflamatório (LICH et al., 2007; WILLIAMS et al., 2005).

Os trabalhos posteriores reafirmaram a capacidade regulatória do *Nlrp12* sobre o NF- κ B, demonstrando que essa regulação ocorre por redução da expressão de NIK (kinase induzida por NF- κ B), p100 e p52 (via não canônica), com consequente redução da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IL-1 β e IL-6. A regulação de NIK pelo *Nlrp12* ocorre por um processo dependente do aumento da expressão de TRAF-3 que leva a degradação de NIK, uma vez que células deficientes para *Nlrp12* apresentam maior expressão de NIK e menor de TRAF-3, sugerindo que *Nlrp12* atenua a atividade do NF- κ B por degradar NIK, pelo aumento da expressão de TRAF-3 (ALLEN et al., 2012; ZAKI et al., 2011).

De forma interessante, pacientes com mutação (perda de função) no gene *Nlrp12* apresentam maior produção de IL-1 β e IL-6 por monócitos e apresentam uma síndrome de febre periódica. Esses sintomas estão associados com a redução da capacidade supressora do *Nlrp12* sobre o NF- κ B devido a essas mutações. Esses dados corroboram o papel importante

do *Nlrp12* em atenuar a produção de citocinas pró-inflamatórias por um mecanismo relacionado a inibição da atividade do NF- κ B (JÉRU et al., 2008, 2011).

A maioria das definições para os inflamassomas estão relacionadas com a função destes com as células do sistema imune inato, no entanto, tem sido demonstrado que células do sistema imune adaptativo também expressam componentes dessas plataformas. Por exemplo, células T possuem maior expressão de *Nlrp12* do que macrófagos e células dendríticas, que são comumente associadas à expressão dos inflamassomas (ZAKI et al., 2011). Desta forma, este inflamassoma pode ser um alvo promissor no controle da imunidade adaptativa, modulando doenças autoimunes, por sua expressão em células T e possível função reguladora (como em macrófagos e dendríticas).

Em virtude da dificuldade na terapia de pacientes com AR com baixo índice de sucesso no tratamento farmacológico, cujo principal tratamento são os anticorpos anti-TNF- α ou o metotrexato, busca-se compreender a fisiopatologia da doença e sugerir novos alvos terapêuticos para atenuar o desenvolvimento desta. Assim, os inflamassomas são alvos interessantes no controle de doenças autoimunes pela modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que estão associados a diversas doenças autoimunes, incluindo as síndromes inflamatória relacionado ao frio, Muskel-Wells e febre periódica (EMERY; DÖRNER, 2011; JHA; TING, 2009; MAN, 2015).

Desta forma, como o sensor *Nlrp12* é caracterizado pela redução da resposta pró-inflamatória, por redução da produção de citocinas pró-inflamatórias e é expresso em linfócitos T CD4, que controlam o desenvolvimento de doenças autoimunes. Buscou-se avaliar o papel do *Nlrp12* no desenvolvimento da artrite experimental e na diferenciação de linfócitos

Th17.

Objetivos

2. Objetivos

Avaliar a participação do *Nlrp12* no desenvolvimento da artrite experimental e na modulação da resposta de linfócitos Th17;

2.1 Objetivos específicos:

2.1.1. Avaliar o papel do *Nlrp12* no desenvolvimento da artrite experimental;

Racional: Consistente com o papel do *Nlrp12* no desenvolvimento de doenças inflamatórias e sua propriedade anti-inflamatória, foi avaliada o papel desse sensor no desenvolvimento da artrite experimental (JÉRU et al., 2008; WANG et al., 2002; WILLIAMS et al., 2005; ZAKI et al., 2011). **Experimental:** Para isso foi realizado o modelo de artrite induzida por antígeno (AIA), sendo mensurado a nocicepção, edema, migração de neutrófilos, atividade da enzima mieloperoxidase, produção de citocinas e frequência de linfócitos Th17. Além disso, foi avaliada a expressão de *Nlrp12* durante o processo de imunização (indução) da artrite experimental;

2.1.2. Determinar o papel dos linfócitos CD4⁺ *Nlrp12*^{-/-} no desenvolvimento da artrite experimental;

Racional: Os linfócitos T CD4 naíve podem se diferenciar para diferentes subtipos, dentre eles, o subtipo Th17 que é crítico no desenvolvimento da artrite experimental e reumatoide (LUBBERTS, 2015; PINTO et al., 2010). Sendo possível demonstrar por esse objetivo, se há relação entre o desenvolvimento da AIA e a deficiência de *Nlrp12* em linfócitos T CD4. **Experimental:** Para tanto, foram transferidos linfócitos T CD4⁺ WT ou *Nlrp12*^{-/-} para animais WT, com consequente realização do modelo de artrite induzida por antígeno;

2.1.3. Avaliar o papel do *Nlrp12* na diferenciação de linfócitos Th17 *in vitro*;

Racional: A diferenciação para o padrão Th17 é dependente da expressão dos fatores de transcrição ROR γ t e ROR α , os quais são induzidos pelas citocinas TGF- β e IL-6, em conjunto

(IVANOV et al., 2006; YANG et al., 2008) (essa expressão pode ser induzida por outras citocinas, como IL-6, IL-1 β e IL-23) (LANGRISH, 2005; LEE et al., 2012). Com o objetivo de demonstrar se o *Nlrp12* está agindo diretamente no linfócitos T CD4 para aumentar a resposta Th17, foi realizado esse experimento. **Experimental:** Para demonstrar o papel do *Nlrp12* na diferenciação de linfócitos Th17 *in vitro*, linfócitos T CD4⁺ de animais WT e *Nlrp12*^{-/-} foram isolados e deixados em cultura sob condições polarizantes para os padrões Th17 (TGF- β + IL-6);

2.1.4. Determinar por qual mecanismo o *Nlrp12* modula a diferenciação de linfócitos Th17 e o desenvolvimento da artrite experimental;

Racional: Durante o processo de diferenciação de linfócitos Th17, a IL-6 induz fosforilação da proteína Stat3 que é crítica na diferenciação destas células (YANG et al., 2007)

Experimental: Para tanto, foi avaliado o nível de fosforilação da proteína Stat3, em linfócitos T CD4 após o estímulo com IL-6, bem como a contribuição da fosforilação de Stat3 na diferenciação de linfócitos T CD4 *Nlrp12*^{-/-} para o padrão Th17 e o desenvolvimento da artrite experimental.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos WT isogênicos da linhagem C57BL/6 e animais deficientes para *Nlrp12* (*Nlrp12*^{-/-}), machos, com 6 semanas de idade, pesando entre 20-23 g, obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) e do Departamento de Bioquímica e Imunologia, respectivamente. Sendo acondicionados no biotério do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, com temperatura ambiente 23-25°C, com ciclo claro-escuro de 12 horas e com acesso livre a comida e água. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, com o protocolo n° 137/2015.

3.2 Modelo experimental de Artrite induzida por antígeno

Os camundongos (WT e/ou *Nlrp12*^{-/-}) foram imunizados com mBSA (Albumina sérica bovina metilada) por via subcutânea (500 µg/animal), em 200 µl de uma emulsão contendo 100 µl de salina e o mesmo volume de CFA (Adjuvante completo de Freund) no dia 0, e receberam outras duas imunizações da mesma preparação, em IFA (Adjuvante incompleto de Freund) nos dias 7 e 14. Vinte e um dias após a primeira imunização, os animais receberam o desafio intra-articular (articulação tíbio-femoral) de 10µg de mBSA. Os animais foram anestesiados com isoflurano (2%) antes da imunização e desafio. Seis horas após o desafio na região intra-articular, foi avaliada a nocicepção, o edema, a migração de neutrófilos e a frequência de células Th17 nos linfonodos drenantes das imunizações (TALBOT et al., 2015).

3.3 Modelo experimental de Artrite induzida por Zymosan

Os camundongos (WT e *Nlrp12*^{-/-}) foram desafiados na região intra-articular (articulação tíbio-femoral) com 30 µg de Zymosan proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*, diluído em PBS. Seis horas após o desafio, foi realizado o lavado da região intra-articular, para obtenção do infiltrado celular e mensuração do edema da articulação. Além disso, uma das articulações foi retirada para mensuração da produção de citocinas (IL-10, TNF- α , IL-1 β e IL-17).

3.4 Determinação do infiltrado de neutrófilos na articulação

Seis horas após os desafios com mBSA ou zymosan, os camundongos foram eutanasiados com dose letal de anestésico (quetamina-xylazina 100 e 10 mg/kg, respectivamente), e a cavidade articular foi lavada duas vezes com 10 µl de PBS, contendo 1 mM de EDTA e diluídos para o volume de 50 µl com PBS/EDTA. Para determinar a atividade da mieloperoxidase *in vivo*, camundongos WT e *Nlrp12*^{-/-} foram anestesiados com isoflurano e receberam, por via intraperitoneal (100 mg/kg), a administração de uma solução para determinação da atividade da enzima mieloperoxidase por bioluminescência (*XenoLight Rediject Inflammation Probe*). A aquisição das imagens foi realizada utilizando o aparelho *IVIS Spectrum System* (Caliper Life Sciences). Os resultados foram expressos em intensidade de bioluminescência (*radiance: p/sec/cm²/sr*) (VERAS et al., 2015).

3.5 Mensuração de citocinas por ELISA

A determinação dos níveis de KC, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17 e IL-22 murinos foram feitas pelo método imunoenzimático (ELISA) utilizando kits DuoSet ELISA Development Systems (R&D Systems) de acordo com as informações do fabricante. Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 µl/ poço do anticorpo específico anti-KC, anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IL-17 e anti-IL-22, nas concentrações

descritas pelo fabricante diluídos em PBS e incubados overnight a 4 °C. As placas foram lavadas com PBS/Tween-20 (0,05% - *Sigma Aldrich*), sendo as ligações não específicas foram bloqueadas com 100 µL de PBS contendo BSA 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente as placas foram lavadas com PBS/T e então adicionou-se as amostras e o padrão (curva-padrão) contendo as concentrações conhecidas de KC (4000 pg/mL), TNF- α (4000 pg/ml), IL-1 β (4000 pg/ml), IL-6 (4000 pg/mL), IL-10 (4000 pg/ml), IL-17 (4000 pg/mL) e IL-22 (4000 pg/mL), sendo incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas e adicionou-se 50µL dos anticorpos biotinilados específicos para cada citocina. Após duas horas, as placas foram lavadas e o conjugado estreptavidina-peroxidase, na diluição de 1:40 foi adicionado a cada poço e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente, as placas foram lavadas e foi adicionado 100µL do substrato TMB. A densidade ótica foi medida a 630 nm no espectrofotômetro *SpectraMAX 190 Microplate Reader* (*Molecular Devices*) e os dados foram analisados usando o software *SoftMax Pro 5*. A concentração de citocinas contidas nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão com 11 pontos obtidos por diluição seriada. O resultados foram expressos em pg/mL. Nas amostras de articulação dos animais, o valor obtido no *software* foi corrigido pelo massa da articulação e expresso em pg/mg (VERAS et al., 2015).

3.6 *Recall* no modelo de Artrite induzida por antígeno

Os linfonodos dos animais foram retirados após seis horas do desafio, processados e reestimulados *in vitro* (2×10^5 células por poço) com mBSA, mBSA+IL-23 ou Con A (mBSA: 100 µg/ml; IL-23: 20 ng/ml; Con A: 5 µg/ml), sendo deixados em cultura em RPMI-C durante 96h a 37° C, 5% de CO₂. Após isso, o sobrenadante da cultura foi coletado e avaliada a produção de citocinas (IL-17 e IL-22) por ELISA (*R&D Systems*) (CHALISE et al., 2013)

3.7 Transferência de linfócitos T CD4⁺CD25⁻

Os linfócitos T CD4⁺ foram isolados de animais WT e *Nlrp12*^{-/-} e transferidos por via intravenosa (5X10⁶ células por animal) em dois grupos WT. Assim, foram utilizados 6 grupos experimentais: WT *naïve*, WT AIA, WT que recebeu linfócitos T WT, WT que recebeu linfócitos T *Nlrp12*^{-/-}, *Nlrp12*^{-/-} *naïve* e *Nlrp12*^{-/-} AIA. Um dia após a transferência dos linfócitos T, foi iniciado o processo de imunização com mBSA, utilizando o protocolo descrito anteriormente (TALBOT et al., 2015).

3.8 Marcação intracelular para citometria de fluxo

As células dos linfonodos drenantes das imunizações ou linfócitos T diferenciados *in vitro* foram estimulados com 12-myristato-13-acetato (PMA- 50 ng/ml, *Sigma Aldrich*), ionomicina (500 ng/ml-*Sigma Aldrich*) e um inibidor de transporte proteico (*Stop Golgi-Monensin* 1,5 µl/ml-*BD Biosciences*) por 4 horas sob as condições de 37° C e 5% CO₂ em RPMI-C. A marcação extracelular foi realizada com anti-CD4 (*BD Biosciences*) e/ou com marcador de viabilidade celular (*Dye fixable viability-Ebioscience*), por 10 minutos. Após a marcações extracelular as células foram centrifugadas (450G, 8 min, 4° C) e fixadas (*Cytoperm/Cytofix*) por 15 minutos. Após isso, as células foram novamente centrifugadas e permeabilizadas com *Perm/wash buffer* (*BD Biosciences*) e marcadas com anticorpo anti-IL-17A ou Anti-IL-22 por 15 minutos. Todas as incubações foram realizadas a temperatura ambiente e com as amostras protegidas da luz. Após esse período, as células foram centrifugadas e ressuspensas em PBS para posterior leitura no *Facs Verse BD Biosciences* (SANCHES et al., 2015; TALBOT et al., 2015; VERAS et al., 2015).

3.9 Cultura de linfócitos T CD4⁺

Foram obtidos os baços e linfonodos dos animais WT e *Nlrp12*^{-/-}, sendo os mesmos processados em uma *cell strainer* (100 µm) com o auxílio de uma seringa de 3 ml, em RPMI-I. Foi adicionado tampão de lise (para lise de hemácias) e as células foram centrifugadas (450g, 8 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em RPMI-C, sendo colocadas em uma garrafa de cultura, e deixadas na estufa (37° C, 5% CO₂ e 8% de umidade por 30 minutos, para aderência de células aderentes, como macrófagos e células dendríticas). Posteriormente, as células foram centrifugadas e incubadas com o kit para separação de linfócitos T CD4⁺ por 10 minutos (CD4⁺ T Cell Isolation Kit - *Miltenyi Biotec*), que irá marcar células que não são CD4⁺, realizando assim uma seleção negativa dessas células, com posterior incubação com anticorpo anti-biotina por 10 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas, ressuspensas em 500 µl e levadas ao aparelho (*AutoMacs pro Separator* - *Miltenyi Biotec*), sendo utilizado o programa *deplete*. Após a obtenção dos linfócitos T CD4, os mesmos foram centrifugados e marcados com o anticorpo anti-CD25 (αCD25-PE – *BD Bioscience*), por 10 minutos. Depois disso as células foram centrifugadas e incubadas sob as mesmas condições descritas acima com o anticorpo Anti-PE (*Miltenyi Biotec*). No próximo passo as células foram centrifugadas e ressuspensas em 500 µl para separação no *AutoMacs* (*posseld* program). Após a separação, foi realizada a marcação com anticorpo anti-CD4, para avaliar a qualidade da separação por citometria de fluxo. Em todos os experimentos a pureza de linfócitos T CD4⁺ foi maior que 90%. Todas as incubações foram realizadas a 4 °C, com as amostras protegidas da luz. Após isso, as células foram deixadas em cultura em RPMI-C (10% de soro bovino fetal, 200 mM de glutamina, 10.000 unidades de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina, 250 µg/ml de anfotericina B e 275 nM de β-mercaptoetanol), com estímulos de proliferação (anti-CD3 e anti-CD28 *BD Biosciences* – 1 µg/ml) durante 96 horas, sob 37° C, 5% de CO₂, em condições polarizantes para a diferenciação de linfócitos Th17 (2,5 ng/ml de TGF-β e 20 ng/ml de IL-6).

Posteriormente, foi realizado o protocolo de marcação intracelular para IL-17A e IL-22 sendo os resultados obtidos por citometria de fluxo (*Facs Verse BD Biosciences*) e analisados utilizando o *software Facs Express v.5* (LEE et al., 2012).

3.10 Ensaio de marcação intracelular de proteínas fosforiladas (*Phosflow*)

Foram isolados linfócitos CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais WT ou *Nlrp12*^{-/-}, como descrito anteriormente, deixadas em *resting* durante 3h em RPMI-I a 4 °C. Após esse período, as células foram estimuladas com IL-6 (100 ng/ml - *R&D Systems*) durante 15 minutos a 37° C. Após o estímulo, as células foram fixadas com PFA (para-formaldeído) 2% durante 10 minutos a 37° C. Foram adicionados 2 ml de PBS gelado, com posterior centrifugação (450G, 8 min, 4° C) e permeabilização com metanol (90%, diluído em água destilada), durante 30 minutos a 4 °C. Após isso, as amostras foram centrifugadas e realizada marcação com os anticorpos anti-CD4 (*BD Biosciences*) e pStat3 (*BD Biosciences*) por 40 minutos a temperatura ambiente, sendo as amostras analisadas por citometria de fluxo imediatamente (MANGOLINI et al., 2013).

3.11 *Western Blot*

Para avaliar a expressão de Stat3 e pStat3, linfócitos T CD4⁺ WT ou *Nlrp12*^{-/-} foram estimulados em RPMI-I com IL-6 (10 ng/ml), durante 5, 10, 15 e 20 minutos. As células foram coletadas com PBS 1x, centrifugadas e lisadas em tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NP-40 1%, desoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM pH 7,4) contendo os inibidores de protease (Roche) e fosfatase (Calbiochem), com posterior centrifugação (600G, 10 min, 4°C), sendo obtido o sobrenadante. Uma alíquota do lisado foi separada para dosagem de proteínas pelo método colorimétrico *Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit* (*Sigma Aldrich*).

As amostras proteicas, correspondentes a 20 ug de proteína foram incubadas com tampão de amostras na proporção de 1:2, a 95°C por 10 minutos (condição desnaturante). Posteriormente, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida de 10% na presença de SDS (SDS-PAGE) para separação por eletroforese (*Mini-Protean II Electrophoresis Cell, Bio-Rad Laboratories, Hercules CA*). As proteínas separadas foram transferidas para membrana de nitrocelulose 0.2µm (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK), utilizando o sistema de transferência Trans Blot Turbo (Bio-Rad Laboratories, Hercules CA, USA). Após transferência as membranas foram lavadas em água deionizada e o bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado pela incubação das membranas com TBST (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween20 0,05%) com 5% de leite em pó desnatado ou BSA por 2 h. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com TBST, por 10 minutos. Em seguida foram incubadas com anticorpos primários por 18h sob leve agitação a 4° C. Anticorpos secundários apropriados (*Anti-rabbit* ou *anti-mouse - Cell Signaling*) conjugados a HRP foram adicionados e incubados por 1h à temperatura ambiente. Após esta incubação as membranas foram novamente lavadas com TBST por 30 minutos. Para revelar as membranas, foi utilizado substrato Luminata (Millipore) para a detecção por quimiluminescência utilizando o equipamento ChemiDoc™ XRS com o software ImageLab 3.0 (Bio-Rad). Foi utilizado a β -actina como controle de carregamento proteico (QIN et al., 2009).

3.12 PCR em Tempo Real

Para analisar a expressão gênica, o RNA total, de linfócitos T CD4⁺ ou células totais dos linfonodos drenantes, foi extraído usando RNeasy Mini Kit 250 (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantidade de 500 ng de RNA total foi então convertido em cDNA usando o kit High-CapacitycDNA Reverse Transcription (AppliedBiosystems) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

O PCR quantitativo em tempo real foi realizado usando kit SYBR Green (Life Technologies) e o sistema Viia7 Real-Time PCR (Life Technologies). O protocolo de ciclagem térmica foi: 1 x 95°C durante 1 minuto (Holdingstage); 40x: desnaturação a 95°C, 15 segundos e anelamento 60°C, 1 minuto (Cyclingstage); obtenção da curva de melting (*Melting curve stage*). A curva é obtida após três passos, sendo o primeiro a 95°C, 15 segundos; o segundo a 60°C, 1 minuto e o terceiro a 95°C, 15 segundos; para verificar se apenas um produto foi amplificado. Os resultados foram analisados através do método *comparative cycle threshold* (CT).

Para realizar os qPCRs foram usados pares de primers SYBR Green (*Sigma Aldrich*) mostrados na tabela 1. Nenhum dos *primers* utilizados produziu amplificação no branco, ou apresentou mais de um pico na curva de *melting*. Além disso, todos apresentaram eficiência maior que 90%. Todos dados foram normalizados em relação aos valores de *Gapdh*, e a quantificação das diferenças entre os grupos foi calculada de acordo com o método $\Delta\Delta C_t$. A expressão gênica foi apresentada baseada na quantidade de vezes que aumentou em relação às células *fresh* ou ao grupo *naïve* (calibrador) (MANGOLINI et al., 2013).

Tabela 1 – Primers utilizados nas reações de RT-PCR e suas respectivas sequências *forward* e *reverse*:

<i>Primers</i>	Forward	Reverse
<i>Nlrp12</i>	5'-GGATTACAGGAAGGACCTG-3'	5'-TTGGGAGAGACATCCAAAGG-3'
<i>Rora</i>	5'-TCTCCCTGCGCTCTCCGCAC-3'	5'-TCCACAGATCTTGCATGGA-3'
<i>Rorc</i>	5'-GAGTTTGCCAAGCGGCTTT-3'	5'-TCCATTGCTCCTGCTTTCAGT-3'
<i>Il17a</i>	5'-GCTCCAGAAGGCCCTCAG-3'	5'-CTTCCCTCCGCATTGACA-3'
<i>Il21</i>	5'-TCATTGACCTCGTGGCCC-3'	5'-ATCGTACTTCTCCACTTGCAATCC-3'
<i>Il22</i>	5'-CAGCTCCTGTACATCAGCGGT-3'	5'-AGGTCCAGTTCCCAATCGCCT-3'
<i>Il23r</i>	5'-GCCAAGAAGACCATTCCCGA-3'	5'-TCAGTGCTACAATCTTCTTCAGAGGACA-3'
<i>Gapdh</i>	5'-CATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3'	5'-CGGCCAAATCCGTTTCAC-3'

3.13 Análise estatística

Foi utilizado o teste t de Student ou análise de variância ANOVA (*one Way*, seguido do teste de Bonferroni, ou *Two Way*) para comparação entre os grupos WT e *Nlrp12*^{-/-}. Os dados foram expressos em Média $\pm$ E.P.M., sendo representativos de 2-3 experimentos, considerando diferença estatística para $p < 0,05$. Sendo esta diferença representada pelo símbolo “*”. Os dados foram analisados com o programa *Graph Pad prism 5.0*.

Resultados

4. Resultados

Com o objetivo de avaliar a participação de *Nlrp12* na indução da artrite experimental, foi avaliada a expressão desse sensor durante o processo de imunização em células dos linfonodo drenantes, no modelo de artrite induzida por antígeno, que como citado acima é dependente da resposta imune adaptativa, com o papel crucial dos linfócitos Th17 no seu desenvolvimento.

Desta forma foi avaliada a expressão de *Nlrp12* (Fig. 4A) durante o processo de imunização (7, 14 e 21 dias, após a primeira imunização com mBSA+CFA), bem como a expressão dos genes *Il17a* e *Il22* (Fig. 4B e C) para validar o resultado, uma vez que há aumento da resposta Th17 nos animais submetidos ao protocolo de AIA. Assim, a expressão de *Nlrp12* encontra-se aumentada durante o processo de imunização (Fig. 4A), o que pode provavelmente estar associado ao controle do desenvolvimento da AIA. De forma interessante, a expressão de *Il17a* e *Il22* são praticamente constantes durante a imunização.

Fig. 4. O sensor *Nlrp12* está regulado positivamente durante o processo de indução da AIA. Foram retirados os linfonodos inguinais dos animais *naïve* e AIA durante o período de imunização (Dias: 0-*naïve*; 7, 14 e 21 dias após a imunização). O RNA foi extraído das amostras como descrito na metodologia (*RNeasy Mini Kit 250 - Qiagen*), seguido da conversão a cDNA (*Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription - Applied Biosystems*). O resultado foi corrigido pela expressão de *Gapdh* e foi escolhido como calibrador o grupo *naïve*. A) A expressão de *Nlrp12* encontra-se elevada após o início do processo de indução da AIA. B) e C) Sendo o experimento validado pela maior expressão de *Il17a* e *Il22*. Os dados foram analisados através da teste ANOVA (one Way, seguido do teste de Bonferroni). * $P < 0,05$.

Para confirmar o papel de *Nlrp12* no desenvolvimento da artrite induzida por antígeno, animais WT e *Nlrp12*^{-/-} foram submetidos a esse modelo, sendo avaliado diversos parâmetros, tais como nocicepção, edema, migração de neutrófilos, atividade da enzima mieloperoxidase e frequência de linfócitos Th17. Nesse sentido, os animais *Nlrp12*^{-/-} apresentaram maior hipernocicepção, infiltrado leucocitário e edema quando comparados aos animais WT (Fig. 5A, B e C), desenvolvendo uma forma mais severa da artrite experimental. Para confirmar esse resultado, foi realizado um ensaio para avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase *in vivo*, o qual consiste na administração de uma probe que produz um sinal bioluminescente, podendo ser observado uma maior atividade da enzima mieloperoxidase no grupo *Nlrp12* (Fig. 5D). Assim, o maior comportamento de “dor” e edema estão relacionados com a maior migração de neutrófilos para a região intra-articular e a deficiência de *Nlrp12* levou ao

desenvolvimento de um quadro mais grave de artrite. Em conjunto, esses dados demonstram que o *Nlrp12* regula negativamente o desenvolvimento da artrite experimental, sendo sua expressão aumentada após a imunização com mBSA.

Fig. 5. Animais *Nlrp12*^{-/-} desenvolvem artrite de forma mais severa. A artrite experimental foi induzida pelo desafio com mBSA na região intra-articular, após o período de imunização com esse antígeno. A) e B) camundongos deficientes para *Nlrp12* apresentam maior hipernocicepção e edema da região articular, sendo a mensuração realizada com o auxílio do *von Frey* digital e de um paquímetro, respectivamente. C) Foi realizado o lavado da cavidade articular com PBS/EDTA e feita a contagem de leucócitos na câmara de Neubauer, confirmando que os animais *Nlrp12*^{-/-} apresentam maior desenvolvimento da artrite experimental, com maior migração de neutrófilos. D) O resultado da migração é confirmado pelo ensaio de bioluminescência após a administração por via intraperitoneal de uma *probe* para avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase na cavidade articular, sendo os dados representados no gráfico ao lado. Os dados foram analisados através do teste T de Student, ANOVA (one Way, seguida do teste de bonferroni) ou ANOVA Two Way. * P < 0,05.

Consistente a importância de citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento da artrite reumatoide e experimental, foi avaliada a produção dessas citocinas (KC, IL-6 e IL-17) na região intra-articular dos animais. Como demonstrado na figura 6, houve maior produção dessas citocinas nos animais deficientes para *Nlrp12* do que nos WT. Estes resultados confirmam o maior desenvolvimento da artrite experimental nesses animais e o papel do *Nlrp12* como regulador negativo do desenvolvimento da artrite, por redução da produção de citocinas pró-inflamatórias.

Fig. 6. O *Nlrp12* regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias. Seis horas após o desafio com mBSA, foi retirada a articulação tíbio-femoral dos animais submetidos ao protocolo de AIA e dos seus controles, sendo as amostras processadas e o sobrenadante utilizado para quantificação dessas citocinas por ELISA. A), B) e C) Animais *Nlrp12*^{-/-} apresentam maior produção de KC, IL-6 e IL-17, que estão relacionadas com o desenvolvimento do modelo da AIA. Os dados foram analisados através do teste T de Student. * $P < 0,05$, na comparação entre os grupos AIA (WT e *Nlrp12*^{-/-}).

Uma vez que animais *Nlrp12*^{-/-} demonstraram maior desenvolvimento da artrite experimental, associada a maior produção de IL-17 e que a resposta Th17 é crucial nesse processo (HIROTA et al., 2007; PINTO et al., 2010; VAN DEN BERG; MIOSSEC, 2009), foi avaliada a expressão de genes relacionados a esse subtipo de linfócito T CD4⁺. Foi observada maior expressão de *Il17a* e *Il22* (Fig. 7A e B) nos animais *Nlrp12*^{-/-} em relação aos

WT, no entanto, o mesmo não foi observado em relação a *Il21* (Fig. 7C), provavelmente isso se deve ao tempo de análise, uma vez que expressão desse gene ocorre em fases iniciais da diferenciação de linfócitos Th17. Em conjunto, estes dados sugerem que o *Nlrp12* é um regulador negativo da resposta Th17, sendo assim um modulador negativo do desenvolvimento da artrite experimental.

Fig. 7. O *Nlrp12* regula negativamente a expressão de citocinas do padrão Th17. Foram retirados os linfonodos inguinais dos animais *naïve* (WT e *Nlrp12*^{-/-}) e AIA (WT e *Nlrp12*^{-/-}) 21 dias após o início do protocolo de imunização. O RNA foi extraído das amostras como descrito na metodologia (*RNeasy Mini Kit 250* - *Qiagen*), seguido da conversão a cDNA (*Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* - *Applied Biosystems*). O resultado foi corrigido pela expressão de *Gapdh* e foi escolhido como calibrador o grupo WT *naïve*. A) A expressão de *Il17a* encontra-se elevada nos animais submetidos ao protocolo de imunização em relação aos *naïves*, e naqueles houve maior expressão no grupo *Nlrp12*^{-/-}. B) A expressão de *Il22* encontra-se elevada nos animais submetidos ao protocolo de imunização em relação aos *naïves*, e naqueles houve maior expressão no grupo *Nlrp12*^{-/-}. C) A expressão de *Il21* encontra-se elevada nos animais submetidos ao protocolo de imunização em relação aos *naïves*, no entanto, não houve diferença na expressão entre os animais imunizados. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido do teste de bonferroni. * $p < 0,05$ (comparação entre os grupos AIA), # $p < 0,05$ (comparação entre o grupo WT AIA e WT *naïve*).

Com a finalidade de confirmar esses dados de expressão gênica, foi avaliada por citometria de fluxo a frequência e número absoluto de linfócitos $CD4^+IL-17^+$, nos linfonodos drenantes (inguinais) das imunizações. Como ilustrado na figura 8, houve aumento da frequência e número absoluto de linfócitos Th17 nos animais submetidos ao protocolo de AIA, e adicionalmente, os mesmos parâmetros estão aumentados nos animais $Nlrp12^{-/-}$ em relação aos WT (Fig. 8A e B).

Fig. 8. O *Nlrp12* regula negativamente a diferenciação de células Th17 *in vivo* durante a artrite experimental. Foi induzida artrite experimental pelo modelo de AIA em animais WT e $Nlrp12^{-/-}$, sendo retirados os linfonodos drenantes das imunizações seis horas após o desafio com mBSA. As células foram estimuladas em RPMI-C, com PMA, Ionomicina e um inibidor do transporte de proteínas (*Stop golgi*), durante quatro horas. Após esse período foi realizado o ensaio de marcação intracelular para IL-17A, com posterior análise por citometria de fluxo. A) e B) Animais WT e $Nlrp12^{-/-}$ submetidos ao protocolo de AIA possuem maior frequência e número absoluto de linfócitos Th17 em relação aos respectivos controles *naïves*, sendo que os deficientes para *Nlrp12* apresentam maior diferenciação para o padrão Th17 do que os animais WT. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * $P < 0,05$ (comparação entre os grupos AIA WT e $Nlrp12^{-/-}$). # $P < 0,05$ (comparação entre os grupos WT *naïve* e AIA).

Com o objetivo de confirmar a maior resposta Th17 nas células provenientes dos animais *Nlrp12^{-/-}*, além de uma resposta antígeno-específica, foi utilizado um protocolo de reestimulação dessas células. Para tanto, elas foram reestimuladas *in vitro* com o antígeno da imunização (mBSA), com antígeno mais IL-23, que é essencial na estabilização da resposta Th17, e por isso está associada a uma célula Th17 patogênica ou com Con A, que promove um estímulo não específico no complexo TCR. Após 96 horas foi avaliada a produção de citocinas do padrão Th17 no sobrenadante das culturas (IL-17A e IL-22).

Como demonstrado na figura 9, há maior produção das citocinas IL-17 e IL-22 quando as células provenientes dos linfonodos drenantes são reestimuladas com mBSA, mBSA mais IL-23 ou com Con A. Esses dados confirmam a maior resposta Th17 nas células provenientes dos animais *Nlrp12^{-/-}*. Assim, este efeito pode ser atribuído a uma ação direta nos linfócitos T CD4⁺ ou a uma maior ativação destes pelas células apresentadoras de antígeno.

Fig. 9. O *Nlrp12* regula negativamente a produção de IL-17 e IL-22 após reestímulo *in vitro*. As células dos linfonodos drenantes, dos animais submetidos ao modelo de AIA e seus controles, foram reestimuladas *in vitro* com mBSA, mBSA+IL-23 ou Con A durante 96 horas, sendo avaliada a produção de citocinas do padrão Th17 no sobrenadante da cultura por ELISA. A) e D) A produção de IL-17 e IL-22 foi maior em células provenientes dos animais *Nlrp12*^{-/-} quando estimulados com mBSA, B) e E) mBSA+IL-23 e C) e F) Con A. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * P < 0,05 (comparação entre os grupos AIA WT e *Nlrp12*^{-/-}).

Nossos resultados demonstram que o sensor *Nlrp12* é um modulador negativo de um modelo de artrite experimental, cujo desenvolvimento é dependente da resposta imune adaptativa. No entanto, alguns parâmetros avaliados são respostas dependentes do sistema imune inato, como a migração de neutrófilos, edema e produção de citocinas, os quais encontravam-se elevados no grupo *Nlrp12*^{-/-}, sendo estes parâmetros importantes na gravidade

da doença, uma vez que são encontrados em pacientes com AR. Estes sinais clínicos são deflagrados através da modulação de células do sistema imune adaptativo (como linfócitos Th17) sob células do sistema imune inato, como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos. Com a finalidade de demonstrar se o *Nlrp12* é capaz de modular o desenvolvimento da artrite experimental por um mecanismo dependente apenas de células do sistema imune inato, foi realizado um modelo experimental inato (artrite induzida por Zymosan, o qual não possui participação de linfócitos T *helper*). De forma interessante, o *Nlrp12* não modula o desenvolvimento de um modelo de artrite experimental induzida por zymosan, sendo observado valores similares para edema, migração de neutrófilos e produção de citocinas (Fig. 10). Aparentemente, o *Nlrp12* não possui atividade (migração) sob neutrófilos, apesar de serem as células que mais expressam esta molécula.

Fig. 10. O *Nlrp12* não modula o desenvolvimento de um modelo inato de artrite experimental. Este modelo foi induzida pela injeção de 30 µg de Zymosan na região intra-articular dos animais WT e *Nlrp12*^{-/-}. Após seis horas, foram avaliados edema e migração de neutrófilos, sendo as articulações retiradas para avaliar a produção de citocinas. A) e B) Animais *Nlrp12*^{-/-} e WT apresentam valores similares de edema e migração de neutrófilos. C) A produção de IL-17 na região intra-articular é próximo a zero, não aumentando a sua produção após o desafio com zymosan. D) e E) A produção de IL-10 e TNF-α é similar entre o grupo WT e *Nlrp12*^{-/-}. F) A produção de IL-1β encontra-se reduzida no grupo *Nlrp12*^{-/-}. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * P < 0,05 (comparação entre os grupos zymosan WT e *Nlrp12*^{-/-}).

O maior desenvolvimento da artrite experimental nos animais *Nlrp12*^{-/-} foi associada a maior resposta Th17 e não a um efeito direto sobre células do sistema imune inato, como neutrófilos. Assim, para demonstrar que esse efeito se deve a uma modulação do *Nlrp12* em linfócitos T, foi realizado um experimento de transferência de linfócitos T CD4⁺ provenientes de animais WT ou *Nlrp12*^{-/-} para animais WT, sendo esse protocolo seguido do modelo de AIA. Como pode ser observado na figura 11, animais WT que receberam linfócitos T CD4⁺ provenientes de animais *Nlrp12*^{-/-} desenvolveram de forma mais grave a artrite experimental,

com maior edema (Fig. 11A), migração de neutrófilos (Fig. 11B) e aumento da atividade da enzima mieloperoxidase *in vivo* por ensaio de bioluminescência (Fig. 8C).

Fig. 11. Ausência de *Nlrp12* nas células T CD4⁺ contribuiu para o desenvolvimento da artrite experimental.

Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ (5×10^6) provenientes de animais WT ou *Nlrp12*^{-/-} foram transferidos para animais WT por via intravenosa. Um dia após a transferência foi iniciado o protocolo de AIA. A) Animais WT que receberam células *Nlrp12*^{-/-} apresentaram maior formação de edema, B) migração de neutrófilos e C) atividade da enzima mieloperoxidase *in vivo*. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * $P < 0,05$ (comparação entre os grupos AIA WT e *Nlrp12*^{-/-} ou grupos WT AIA que receberam linfócitos T CD4⁺ WT ou *Nlrp12*^{-/-}).

Além disso, a resposta Th17 encontra-se aumentada no grupo que recebeu linfócitos T *Nlrp12*^{-/-}, com maior diferenciação *in vivo* de células Th17 durante a artrite experimental (Fig. 12A), bem como maior produção de IL-17 quando as células foram reestimuladas com mBSA *in vitro* (Fig. 12B). Estes dados confirmam que animais *Nlrp12*^{-/-} apresentam maior desenvolvimento da artrite experimental devido a uma maior direcionamento dos linfócitos T CD4⁺ para o padrão Th17, demonstrando que o *Nlrp12* é um regulador negativo da diferenciação de um linfócitos T naïve para o padrão Th17.

Fig. 12. O *Nlrp12* regula o direcionamento de diferenciação de um linfócito T naïve para o padrão Th17 *in vivo*. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ (5x10⁶) provenientes de animais WT ou *Nlrp12*^{-/-} foram transferidos para animais WT por via intravenosa. Um dia após a transferência foi iniciado o protocolo de AIA. A) Animais WT que receberam células *Nlrp12*^{-/-} apresentaram maior frequência de linfócitos Th17, B) Quando as células provenientes dos linfonodos drenantes foram reestimuladas *in vitro* com mBSA, o grupo que recebeu linfócitos T *Nlrp12*^{-/-} apresentou maior produção de IL-17. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * P < 0,05 (comparação entre os grupos AIA WT e *Nlrp12*^{-/-}. # P < 0,05 (comparação entre os grupos WT AIA que receberam linfócitos T CD4⁺ WT ou *Nlrp12*^{-/-}).

Para avaliar o papel direto do *Nlrp12* sob a diferenciação de linfócitos Th17, foram isolados linfócitos T CD4⁺CD25⁻ e deixados em cultura por 96h sob condições polarizantes

para Th17 (TGF- β : 2,5 ng/ml; IL-6: 20 ng/ml; α CD3/C28: 1 μ g/ml) e avaliada a expressão de *Nlrp12* durante esse processo. A expressão de *Nlrp12* é regulada negativamente durante o processo inicial de diferenciação para o padrão Th17 (Fig. 13), talvez essa redução seja um mecanismo para possibilitar a diferenciação de linfócitos Th17, uma vez que foi observado *in vivo*, que o *Nlrp12* regula negativamente a diferenciação e a resposta dos linfócitos Th17.

Fig. 13. A expressão de *Nlrp12* é reduzida durante a diferenciação de linfócitos Th17 *in vitro*. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ foram isolados e deixados em cultura sob condições polarizantes para Th17 durante diferentes tempos, sendo avaliada a expressão gênica de *Nlrp12* durante esse processo, sendo utilizado como calibrador as células Fresh. A expressão de *Nlrp12* foi reduzida durante o processo inicial de diferenciação (12 às 48h), com reestabelecimento da expressão aos níveis basais após 72h. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * P < 0,05.

Como a expressão de *Nlrp12* foi reduzida durante o processo de diferenciação para o padrão Th17, foi avaliada a expressão de genes relacionados com o processo de diferenciação e com a resposta Th17, para avaliar a função do sensor *Nlrp12* durante esse processo de diferenciação. Dois fatores transcrições característicos dos linfócitos Th17 são ROR α e ROR γ t, transcritos pelos genes *Rora* e *Rorc*, respectivamente. A expressão de ambos está

elevada no início do processo de diferenciação em linfócitos *Nlrp12*^{-/-} (12 e 24h, respectivamente; Fig.14A e B). Estes dados demonstram que o *Nlrp12* regula negativamente a expressão desses fatores de transcrição.

Fig. 14. A expressão de *Rora* e *Rorc* é controlada parcialmente pelo *Nlrp12*. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais WT e *Nlrp12* foram isolados e deixados em cultura sob condições polarizantes para Th17 durante diferentes tempos, sendo avaliada a expressão de *Rora* e *Rorc* durante esse processo, sendo utilizadas como calibrador as células WT Fresh. A) A expressão de *Rora* foi maior nas células *Nlrp12*^{-/-}, 12h após o processo de diferenciação, sendo igualado posteriormente. B) A expressão de *Rorc* está aumentada nos linfócitos T CD4⁺ *Nlrp12*^{-/-} em relação às WT no tempo de 24h após o início do estímulo de diferenciação. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * P < 0,05.

Adicionalmente, a expressão de outros genes característicos dos linfócitos Th17, como *Il17a*, *Il21*, *Il22* e *Il23r* encontram-se com expressão elevadas nos linfócitos T *Nlrp12*^{-/-}, quando comparada com os WT, caracterizando uma maior diferenciação para o padrão Th17 (Fig. 15). A expressão de *Il17a* e *Il22* está relacionada com a capacidade efetora dessas células, sendo mais expressos nos linfócitos T CD4⁺ *Nlrp12*^{-/-} (Fig. 15 A e C). Enquanto a expressão de *Il21* é importante na fase inicial do processo de diferenciação para Th17, uma vez que esta citocina promove amplificação desse processo, atuando de forma autócrina ou

parácrina, sendo que a sua expressão também foi maior nas células deficientes para *Nlrp12* (Fig. 15B). Consistente com a importância da expressão do *Il23r* na estabilidade dos linfócitos Th17, bem como por ser um marcador da diferenciação destas células, a sua expressão encontra-se aumentada nos linfócitos T CD4⁺ *Nlrp12*^{-/-} (Fig. 15D), confirmando a maior diferenciação de linfócitos T CD4⁺ *Nlrp12*^{-/-} para o padrão Th17.

Fig. 15. O *Nlrp12* regula negativamente a expressão de *Il17a*, *Il21*, *Il22* e *Il23r*. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ WT e *Nlrp12* foram isolados e deixados em cultura sob condições polarizantes para Th17 durante diferentes tempos, sendo avaliada a expressão de *Il17a*, *Il21*, *Il22* e *Il23r* durante esse processo. Foi utilizado como calibrador as células WT Fresh. A) A expressão de *Il17a*, B) *Il21*, C) *Il22* e D) *Il23r* foi maior nas células *Nlrp12*^{-/-} do que as WT. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * P < 0,05.

Para confirmar esses dados obtidos por expressão gênica, foi avaliada a nível proteico a produção de IL-17A e IL-22, durante a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ WT ou *Nlrp12*^{-/-} para o padrão Th17. Como demonstrado na figura 13, houve maior diferenciação para o padrão Th17 das células *Nlrp12*^{-/-}, em relação as WT, com maior frequência de linfócitos T CD4⁺IL-17⁺ (Fig. 16A) e CD4⁺IL-22⁺ (Fig. 16C). Adicionalmente, houve maior produção das citocinas IL-17 e IL-22 (Fig. 16B e D, respectivamente) no sobrendante da cultura, confirmando a maior diferenciação para o perfil Th17 dos linfócitos T CD4⁺ *Nlrp12*^{-/-}.

Fig. 16. O *Nlrp12* regula negativamente a diferenciação de células Th17 *in vitro*. Linfócitos T CD4⁺CD25⁺ provenientes de animais WT e *Nlrp12*^{-/-} foram isolados e deixados em cultura sob condições polarizantes para Th17 durante 96h. Após esse período, as células foram estimuladas com PMA, ionomicina e *stop golgi*, durante 4 horas para posterior marcação intracelular. O sobrenadante da cultura foi coletado para dosagem das citocinas IL-17 e IL-22 por ELISA. Houve maior diferenciação para o padrão Th17 nas células *Nlrp12*^{-/-} quando comparadas as WT, A) com maior frequência de células CD4⁺IL-17⁺, B) e maior produção da citocina IL-17, C) maior frequência de linfócitos CD4⁺IL-22⁺ e D) maior produção de IL-22. Os dados foram analisados através do teste t de Student ou ANOVA two Way, seguido pelo teste de bonferroni. * P < 0,05.

Para entender por qual mecanismo o *Nlrp12* é um regulador negativo da diferenciação de linfócitos Th17, foi avaliada a expressão dos receptores das citocinas (IL-6 e TGF-β) utilizadas no processo de diferenciação. No entanto, a expressão da cadeia β do receptor da IL-6 (Gp130) e do receptor II do TGF-β (TGFR II) foi similar entre linfócitos T CD4⁺ WT e *Nlrp12*^{-/-} (Fig. 17 A e B). Desta forma, conclui-se que a maior diferenciação para o perfil Th17 nos linfócitos *Nlrp12*^{-/-} não é por alteração na expressão dos receptores para IL-6 ou TGF-β.

Fig. 17. O *Nlrp12* não altera a expressão dos receptores Gp130 e TGFR II. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais WT e *Nlrp12*^{-/-} foram isolados e realizada a marcação dos receptores TGFR II e Gp130 para posterior análise por citometria de fluxo. A) A expressão do receptor TGFR II foi similar nos linfócitos T CD4⁺ WT e *Nlrp12*^{-/-}. B) Não houve diferença na expressão do receptor Gp130 entre os linfócitos T CD4⁺ WT ou *Nlrp12*^{-/-}. Os dados foram analisados através do teste t de Student.

A próxima hipótese foi que a modulação do *Nlrp12* na diferenciação para o padrão Th17 ocorreria por uma mudança na via de sinalização para esse processo. Desta forma, foi avaliada a expressão de pStat3 em linfócitos T CD4⁺ estimulados com IL-6, uma vez que após ser fosforilada, essa proteína migra para núcleo e se liga na região promotora do gene *Il17a*, bem como é importante na expressão de *Rora* e *Rorc*. De forma interessante, há maior fosforilação nos linfócitos T CD4⁺*Nlrp12*^{-/-} em relação aos WT, além da fosforilação ser mais prolongada nas células *Nlrp12*^{-/-} (Fig. 18).

Fig. 18. O *Nlrp12* regula negativamente a fosforilação de Stat3. Foram isolados linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais WT e *Nlrp12*^{-/-}, com posterior estímulo com IL-6 (10 ng/ml) durante diferentes tempos. As amostras foram submetidas a técnica de *western blot*. Há maior fosforilação da proteína Stat3 e de forma mais prolongada nos linfócitos T *Nlrp12*^{-/-} do que os WT.

Para confirmar esse dado, foi avaliada a fosforilação de Stat3 também por citometria de fluxo (*phosflow*). Assim como observado por *western blot*, houve maior fosforilação dos linfócitos T CD4⁺*Nlrp12*^{-/-} do que os WT (Fig. 19). Adicionalmente, a fosforilação foi inibida pela incubação prévia de um inibidor da fosforilação de Stat3, demonstrando a especificidade do ensaio utilizado.

Fig. 19. A fosforilação de Stat3 é atenuada pelo *Nlrp12*. Foram isolados linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais WT e *Nlrp12*^{-/-}, que foram incubados com um inibidor da fosforilação de Stat3 (Stattic) ou com controle, com posterior estímulo com IL-6 (100 ng/ml) durante 15 minutos, seguido pela análise por citometria de fluxo. Há maior fosforilação da proteína Stat3 nos linfócitos T CD4⁺*Nlrp12*^{-/-} do que os WT. Os dados estão expressos em intensidade fluorescência média e foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * $P < 0,05$ (comparação entre os grupos estimulados com IL-6, linfócitos T CD4⁺ WT ou *Nlrp12*^{-/-}).

Com o objetivo de confirmar que *Nlrp12* regula negativamente a diferenciação de linfócitos Th17 por modular a fosforilação de Stat3, foi utilizado *in vitro* um inibidor da pStat3 (stattic, 3 μ M) sob condições de diferenciação para células Th17. Consistente com o papel desse fator de transcrição na diferenciação de linfócitos Th17, a sua inibição reduziu a diferenciação desse subtipo de linfócitos T CD4, provenientes de animais WT ou *Nlrp12*^{-/-} para níveis semelhantes (Fig. 20A), bem como a produção de IL-17 e IL-22 (Fig. 20B e C).

Fig. 20. O *Nlrp12* modula a diferenciação de linfócitos Th17 por um mecanismo dependente da fosforilação de Stat3. Linfócitos T CD4⁺CD25⁻ provenientes de animais WT e *Nlrp12*^{-/-} foram isolados e deixados em cultura sob condições polarizantes para Th17 durante 96h, na presença de um inibidor da fosforilação de Stat3 ou controle. Após esse período, as células foram estimuladas com PMA, ionomicina e *stop golgi*, durante 4 horas para posterior marcação intracelular. O sobrenadante da cultura foi coletado para dosagem das citocinas IL-17 e IL-22 por ELISA. A) A inibição da fosforilação de Stat3 reduziu para níveis similares a diferenciação para o padrão Th17 (CD4⁺IL-17⁺) em linfócitos WT e *Nlrp12*^{-/-} B) e com redução na produção das citocinas IL-17, C) e IL-22. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * P < 0,05.

Para confirmar o papel do sensor *Nlrp12* na modulação da sinalização da pStat3 *in vivo*, animais foram tratados com um inibidor da fosforilação de Stat3 (Stattic - 10 mg/kg, i.p., a cada 48h) durante o processo de imunização do modelo de AIA. De forma importante, o tratamento com composto reduziu o desenvolvimento da artrite experimental em animais WT e *Nlrp12*^{-/-} para níveis similares, com redução da migração de neutrófilos e edema (Fig 21). Adicionalmente, a frequência e número absoluto de linfócitos Th17, bem como a resposta Th17 (produção das citocinas IL-17A e IL-22 frente ao estímulo com mBSA *in vitro*)

encontram-se reduzidos em ambos os grupos a níveis semelhantes em virtude do tratamento com *stattic* (Fig. 22). Desta forma, estes dados demonstram que a modulação na fosforilação de Stat3 é crucial nos efeitos mediados pelo sensor *Nlrp12* na resposta Th17 e consequentemente no desenvolvimento da artrite experimental.

Fig. 21. O *Nlrp12* modula o desenvolvimento da artrite experimental por um mecanismo dependente da fosforilação de Stat3. A artrite experimental foi induzida pelo desafio com mBSA na região intra-articular, após o período de imunização com esse antígeno. Os animais foram tratados com um inibidor da fosforilação de Stat3 (Stattic, 10 mg/kg, i.p., a cada 48h). A) e B) O tratamento com stattic reduziu a atividade da enzima mieloperoxidase *in vivo* em ambos os grupos (WT e *Nlrp12*^{-/-}), sendo os dados quantificados e representados no gráfico abaixo. C) Corroborando esse dado, a migração de neutrófilos para a cavidade articular (tíbio-femoral) foi reduzida para valores semelhantes nos grupos tratados com esse inibidor. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni. * P < 0,05.

Fig. 22. O *Nlrp12* modula a resposta Th17 *in vivo* de maneira dependente da fosforilação de Stat3. A artrite experimental foi induzida pelo desafio com mBSA na região intra-articular, após o período de imunização com esse antígeno. Os animais foram tratados com um inibidor da fosforilação de Stat3 (Stattic, 10 mg/kg, i.p., a cada 48h). A) e B) A frequência e número absoluto de linfócitos Th17 foram reduzidos nos grupos WT e *Nlrp12*^{-/-} tratados com stattic. C) A inibição da fosforilação de Stat3 reduziu a resposta Th17 *in vitro* após o reestímulo com mBSA. Os dados foram analisados através do teste ANOVA one Way, seguido pelo teste de bonferroni, sendo considerado estatisticamente significativo o * $p < 0,05$.

Discussão

5. Discussão

É comumente atribuído aos inflamassomas uma função na resposta imune inata, principalmente em macrófagos e células dendríticas. O papel dos inflamassomas nessas células está relacionado com a proteção do organismo contra agentes infecciosos, pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18. No entanto, recentemente foi demonstrado que essas plataformas (*Nlrp3* e *Nlrp12*) também são expressas em células do sistema imune adaptativo (BRUCHARD et al., 2015; LUKENS et al., 2015; ZAKI et al., 2011), podendo ser alvos terapêuticos no controle de doenças autoimunes ou inflamatórias. Além disso, outro fato interessante é que o inflamassoma *Nlrp12* tem sido descrito como um modulador negativo da resposta inflamatória, uma vez que animais deficientes para esse receptor possuem aumento da fosforilação do NF- κ B (ALLEN et al., 2012; LICH et al., 2007; LUKENS et al., 2015; WANG et al., 2002; WILLIAMS et al., 2005).

Dados da literatura demonstram que a expressão de *Nlrp12*, na região sinovial de animais submetidos ao modelo de artrite induzida por antígeno, encontra-se aumentada em relação ao grupo *naïve* (KOLLY et al., 2009). Corroborando esse dado, foi encontrado nesse trabalho que a expressão de *Nlrp12* encontra-se aumentada durante o período de imunização (indução do modelo experimental) nos linfonodos drenantes. Diferente do que foi avaliado no trabalho de Kolly e colaboradores, no qual foi avaliada a expressão de *Nlrp12* na região intra-articular, no nosso estudo foi avaliada a expressão desse gene durante o processo de indução da doença, em um órgão que possui uma frequência de aproximadamente 30-40% de linfócitos T CD4⁺, das células totais, demonstrando que a imunização com mBSA induz a expressão de *Nlrp12*.

Nós encontramos que animais *Nlrp12*^{-/-} submetidos ao protocolo de AIA possuem maior migração de neutrófilos para a cavidade articular e aumento da atividade da enzima

mieloperoxidase, o que justifica o aumento da hipernocicepção e edema. Além disso, na artrite reumatoide a migração de neutrófilos é controlada pela produção de citocinas na região intra-articular, nesse sentido, o aumento do infiltrado de neutrófilos na cavidade articular pode estar associada com os maiores níveis de citocinas (KC, IL-6 e IL-17), encontrados no espaço intra-articular dos animais *Nlrp12*^{-/-} em relação aos WT. A migração de neutrófilos é uma das principais características das desordens inflamatórias, como na artrite reumatoide. Os dados sobre a função do sensor *Nlrp12* na migração de neutrófilos são controversos, sendo demonstrado um papel de modulador positivo ou negativo para essa molécula nesse processo *in vitro*, sob estímulo com CXCL1 (ARTHUR et al., 2010; ZAMOSHNIKOVA et al., 2015).

In vivo, foi demonstrado que o *Nlrp12* modula a migração de neutrófilos em um modelo de colite, sendo que este sensor regula negativamente a migração de neutrófilos em períodos tardios da doença, enquanto não possui nenhum efeito na fase inicial, a qual é mediada pelo sistema imune inato (ZAKI et al., 2011). Em congruência, nossos resultados demonstram que o receptor *Nlrp12* modula o desenvolvimento da artrite experimental em um modelo que possui a participação do sistema imune adaptativo, enquanto não possui papel em um modelo de resposta imune inata.

Sabendo que as células Th17 são cruciais no desenvolvimento de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, pelo aumento da infiltração de neutrófilos, diferenciação de osteoclastos e destruição da cartilagem (BETTELLI; OUKKA; KUCHROO, 2007; HIROTA et al., 2007; LANGRISH, 2005; LUBBERTS, 2015; LUBBERTS et al., 2004), foi se questionado se o maior desenvolvimento da artrite experimental encontrada nos animais *Nlrp12*^{-/-} está associado com a maior resposta Th17. De fato, foi observada maior expressão nos animais deficientes para *Nlrp12* de *Il17a* e *Il22*, frequência e número absoluto de células Th17 e maior produção de IL-17 e IL-22 quando as células dos linfonodos drenantes das imunizações são reestimuladas com mBSA, ou seja, foi encontrado que *Nlrp12* modula

negativamente a resposta Th17. Além disso, os linfócitos T CD4⁺*Nlrp12*^{-/-} possuem um direcionamento para o padrão Th17, uma vez que animais WT que receberam essas células apresentaram maior desenvolvimento da artrite experimental em comparação ao grupo que recebeu linfócitos *Nlrp12*^{+/+} (WT), confirmando a maior resposta Th17. Em concordância com nossos resultados, foi demonstrado que linfócitos T CD4 provenientes de animais submetidos ao protocolo de EAE, possuem uma produção maior de IL-6 e IL-17, confirmando o direcionamento para a resposta Th17 (LUKENS et al., 2015).

Diversas proteínas controlam o processo de diferenciação para o padrão Th17, tendo sua expressão alterada durante esse processo (CHEN et al., 2006; DANG et al., 2011; HUBER et al., 2008; KORN et al., 2009; YANG et al., 2007). Foi demonstrado nesse trabalho que a expressão de *Nlrp12* é reduzida durante o início da diferenciação de células Th17, provavelmente a sua expressão é reduzida para indução da diferenciação. De forma interessante, a redução na expressão de *Nlrp12* está associada com aumento na expressão de *Rora*, *Rorc*, *Il17a*, *Il21*, *Il22* e *Il23r*. Além disso, a expressão desses genes encontra-se aumentada nos linfócitos T CD4⁺ *Nlrp12*^{-/-}, confirmando maior diferenciação para o padrão Th17.

Recentemente, foi demonstrado uma função imprecisa do *Nlrp12* no controle da encefalomielite experimental autoimune (EAE). Lukens e colaboradores demonstraram que animais *Nlrp12*^{-/-} apresentam menor gravidade da EAE, por um mecanismo dependente da produção de IL-4, mas com maior produção de IL-6 e IL-17 (LUKENS et al., 2015). Em concordância com nossos resultados, Gharagozloo e colaboradores demonstraram que o *Nlrp12* é regulador negativo do desenvolvimento da EAE, o que foi associada a maior expressão de moléculas pró-inflamatórias, que podem ser induzidas pela resposta Th17. Além disso, foi demonstrado a expressão de *Nlrp12* está aumentada durante o processo de

indução da EAE (GHARAGOZLOO et al., 2015), corroborando nossos resultados, que este sensor funciona como um regulador negativo do desenvolvimento de doenças autoimunes.

Consistente com a importância das citocinas IL-6 e TGF- β no processo de diferenciação para o padrão Th17 (IVANOV et al., 2006; MANGAN et al., 2006), uma vez que ambas são críticas na expressão do fator de transcrição *master* (Roryt) dessas células, foi avaliada a expressão dos receptores dessas citocinas nos linfócitos T CD4⁺ *Nlrp12*^{-/-}, sendo um possível mecanismo para a maior resposta Th17 observada nas células deficientes para *Nlrp12*. No entanto, não foi observada alteração na expressão dos receptores TGFRII e Gp130 nessas células. A próxima hipótese é que o *Nlrp12* poderia estar modulando uma via de sinalização que modula a diferenciação dos linfócitos Th17.

A fosforilação da proteína Stat3 é mediada pela sinalização da IL-6 (CHEN et al., 2006; YANG et al., 2007; ZHONG; WEN; DARNELL, 1994), a qual se liga ao receptor CD126 (IL-6R α) e recruta a cadeia β desse receptor (CD130 ou Gp130), induz autofosforilação das proteínas da família *Janus quinase*, como a Jak2, que por sua vez fosforila a proteína Stat3. Além disso, a sinalização promovida pelo TGF- β também promove aumento da sua fosforilação por modular negativamente a expressão da fosfatase SOCS3, a qual desfosforila a proteína Stat3 (QIN et al., 2009). Esse processo é crítico para a diferenciação de linfócitos Th17, uma vez que células deficientes para Stat3 ou IL-6 possuem uma redução drástica na produção de IL-17, assim como, a inibição da sinalização produzida pelo TGF- β reduz acentuadamente a produção de IL-17 (QIN et al., 2009; YANG et al., 2007).

Nesse sentido, foi demonstrado que em um modelo de colite há maior fosforilação da proteína Stat3 no cólon de animais deficientes para o sensor *Nlrp12* (ZAKI et al., 2011). Nós demonstramos que a fosforilação do fator de transcrição Stat3 encontra-se aumentada em linfócitos T CD4⁺ *Nlrp12*^{-/-}, sendo esse o mecanismo pelo qual essas células possuem uma

maior resposta Th17, e provavelmente por isso que o *Nlrp12* regula negativamente o desenvolvimento da artrite experimental.

Além disso, foi observado que a inibição da fosforilação do fator de transcrição Stat3, reduziu a diferenciação de linfócitos Th17 e o desenvolvimento da artrite experimental de células e animais deficientes para *Nlrp12*, respectivamente, para níveis similares aos observados em linfócitos T CD4 e animais WT. Estes dados confirmam o papel do *Nlrp12* como modulador negativo da fosforilação de Stat3, corroborando os resultados encontrados por Zaki e colaboradores (ZAKI et al., 2011).

Infelizmente, não está claro por qual mecanismo o *Nlrp12* modula negativamente a fosforilação de Stat3. Um dos possíveis seria a expressão do receptor da IL-6, no entanto, nenhuma diferenciação foi observada na expressão desse receptor em Linfócitos T CD4. Em todas as células, o processo de fosforilação é controlado por uma proteína quinase e de uma fosfatase, que fosforilam e desfosforilam, respectivamente, os alvos passíveis de serem regulados por esse processo. Como citato acima, a fosforilação de stat3 ocorre pelas enzimas da família *Janus quinase*, enquanto a desfosforilação é mediada por diferentes proteínas, como SOCS3, SHP2 e PIAS. Desta forma, avaliar a expressão desses proteínas seria um alvo interessante para entender por qual mecanismo *Nlrp12* modula negativamente a fosforilação de Stat3, levando a redução da resposta Th17 e do desenvolvimento da artrite (MURRAY, 2007; SCHMITZ et al., 2000; YASUKAWA et al., 2003; YOSHIMURA; NAKA; KUBO, 2007).

Conclusão

6. Conclusão

O presente estudo demonstrou que o *Nlrp12* modula a resposta imune adaptativa por controlar o processo de diferenciação de linfócitos Th17 e o desenvolvimento da artrite experimental, por um mecanismo dependente da fosforilação de Stat3. Desta forma, o desenvolvimento de drogas que ativem o *Nlrp12* podem ser possíveis ferramentas farmacológicas no tratamento de pacientes com AR e possivelmente outras doenças autoimunes.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- ALLEN, I. C. et al. NLRP12 Suppresses Colon Inflammation and Tumorigenesis through the Negative Regulation of Noncanonical NF- κ B Signaling. **Immunity**, v. 36, n. 5, p. 742–754, 2012.
- ARTHUR, J. C. et al. Cutting edge: NLRP12 controls dendritic and myeloid cell migration to affect contact hypersensitivity. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 8, p. 4515–4519, 2010.
- ASQUITH, D. L. et al. Autoimmune disease : Rheumatoid arthritis Animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 39, p. 2040–2044, 2009.
- ATAIDE, M. A. et al. Malaria-induced NLRP12/NLRP3-Dependent Caspase-1 Activation Mediates Inflammation and Hypersensitivity to Bacterial Superinfection. **Plos One**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2014.
- BASU, R. et al. IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the Th17 cell–iTreg cell balance. **Nature Immunology**, v. 16, n. 3, p. 286–95, 2015.
- BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of Th17 cells. **Nature**, v. 453, p. 1051–1057, 2008.
- BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. Th17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, n. 4, p. 345–350, 2007.
- BEVAART, L.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. Evaluation of Therapeutic Targets in Animal Models of Arthritis How Does It Relate to Rheumatoid Arthritis ? **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 8, p. 2192–2205, 2010.
- BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 11, p. 3537–3545, 2008.
- BRUCHARD, M. et al. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of Th2 differentiation. **Nature Immunology**, v. 16, n. 8, p. 859–870, 2015.
- CARUSO, R., WARNER, N., INOHARA, N., NÚÑEZ, G. NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease. **Immunity**, v. 41, p. 898–908, 2014.
- CHALISE, J. et al. Interferon alpha inhibits antigen-specific production of proinflammatory cytokines and enhances antigen-specific transforming growth factor beta production in antigen-induced arthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 15, n. 4, p. 1–13, 2013.
- CHANG, S. H.; DONG, C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. **Cell research**, v. 17, n. 5, p. 435–440, 2007.

- CHEN, Z. et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 21, p. 8137–8142, 2006.
- CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 51, p. 3–11, 2012.
- CHUNG, Y. et al. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. **Immunity**, v. 30, n. 4, p. 576–587, 2009.
- CONTRIBUTION, O. Risk of Herpes Zoster in Patients with Rheumatoid Arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. **Journal of American Medical Association**, v. 301, n. 7, p. 737–744, 2011.
- CRAFT, J. E. Follicular helper T cells in immunity and systemic autoimmunity. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 8, n. 6, p. 337–347, 2012.
- CUA, D. J. et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 744–748, 2003.
- DA ROCHA, L. F. et al. Increased Serum Interleukin 22 in Patients with Rheumatoid Arthritis and Correlation with Disease Activity. **The Journal of Rheumatology**, v. 39, n. 7, p. 1320–1325, 2012.
- DANG, E. V. et al. Control of TH17/Treg balance by hypoxia-inducible factor 1. **Cell**, v. 146, p. 772–784, 2011.
- EMERY, P.; DÖRNER, T. Optimising treatment in rheumatoid arthritis : a review of potential biological markers of response. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, p. 2063–2070, 2011.
- FERBER, I. A et al. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 1, p. 5–7, 1996.
- FERRI, C. et al. Safety of anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis and chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 10, p. 1944–1949, 2008.
- FLEISCHMANN, R. M. et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 4, p. 927–934, 2003.
- FOSSIEZ, F. et al. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 6, p. 2593–2603, 1996.
- FRASNELLI, M. E. et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. **Arthritis Research and Therapy**, v. 7, n. 2, p. 370–379, 2005.

GAFFEN, S. L. Recent advances in the IL-17 cytokine family. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 5, p. 613–619, 2011.

GEBOES, L. et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 2, p. 390–395, 2009.

GHARAGOZLOO, M. et al. The nod-like receptor, Nlrp12, plays an anti-inflammatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, p. 198, 2015.

GIZINSKI, A. M.; FOX, D. A. T cell subsets and their role in the pathogenesis of rheumatic disease. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 2, p. 204–210, 2014.

HARRIS, T. J. et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in Th17 development and Th17-dependent autoimmunity. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 4313–4317, 2007.

HIROTA, K. et al. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 12, p. 2803–2812, 2007.

HOCHBERG, M. C.; JOHNSTON, S. S.; JOHN, A. K. The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006. **Current Medical Research and Opinion**, v. 24, n. 2, p. 469–480, 2008.

HUBER, M. et al. IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 20846–20851, 2008.

IRMLER, I. M.; GAJDA, M.; BRAUER, R. Exacerbation of Antigen-Induced Arthritis in IFN- γ -Deficient Mice As a Result of Unrestricted IL-17 Response. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 9, p. 6228–6236, 2007.

IVANOV, I. I. et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17 + T Helper Cells. **Cell**, v. 126, p. 1121–1133, 2006.

IWAKURA, Y. et al. Review Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 149–162, 2011.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. **Nature Immunology**, v. 16, n. 4, p. 343–353, 2015.

JÉRU, I. et al. Mutations in NALP12 cause hereditary periodic fever syndromes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 161–1619, 2008.

JÉRU, I. et al. Role of Interleukin-1B in NLRP12 -Associated Autoinflammatory Disorders and Resistance to Anti-Interleukin-1 Therapy. **Arthritis and Rheumatism**, v. 63, n. 7, p. 2142–2148, 2011.

JHA, S.; TING, J. P.-Y. Inflammasome-associated nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat proteins and inflammatory diseases. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 7623–7629, 2009.

KEANE J, GERSHON S, WISE RP, MIRABILE-LEVENS E, KASZNICA J, SCHWIETERMAN WD, SIEGEL JN, B. M. Tuberculosis Associated With Infliximab, a tumor necrosis factor-alpha neutralizing agent. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 15, p. 1098–1104, 2001.

KIM, K.-W. et al. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 4, p. 1015–1023, 2012.

KLARESKOG, L.; PADYUKOV, L.; ALFREDSSON, L. Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 19, n. 1, p. 49–54, 2007.

KLEINewietfeld, M.; HAFLER, D. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 4, p. 305–312, 2014.

KOLLY, L. et al. Inflammatory role of ASC in antigen-induced arthritis is independent of caspase-1, NALP-3, and IPAF. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 4003–4012, 2009.

KORN, T. et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 484–487, 2007.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485–517, 2009.

KOTAKE, S. et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 103, n. 9, p. 1345–1352, 1999.

LANGRISH, C. L. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 2, p. 233–240, 2005.

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. **Nature Reviews**, v. 13, n. June, p. 397–411, 2013.

LEE, J. et al. Interferon Gamma Suppresses Collagen-Induced Arthritis by Regulation of Th17 through the Induction of Indoleamine-2,3-Deoxygenase. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. e60900, 2013.

LEE, Y. et al. Induction and molecular signature of pathogenic Th17 cells. **Nature Immunology**, v. 13, n. 10, p. 991–999, 2012.

LEIPE, J. et al. Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 8, p. 1453–1457, 2011.

LEUNG, S. et al. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 7, n. 3, p. 182–189, 2010.

LICH, J. D. et al. Cutting Edge: Monarch-1 suppresses non-canonical NF- κ B activation and p52-dependent chemokine expression in monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 1256–1260, 2007.

LU, A.; WU, H. Structural mechanisms of inflammasome assembly. **FEBS Journal**, v. 282, n. 3, p. 435–444, 2015.

LUBBERTS, E. et al. Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 2, p. 650–659, 2004.

LUBBERTS, E. The IL-23–IL-17 axis in inflammatory arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 7, p. 415–429, 2015.

LUKENS, J. R. et al. The NLRP12 Sensor Negatively Regulates Autoinflammatory Disease by Modulating Interleukin-4 Production in T Cells. **Immunity**, v. 42, n. 4, p. 654–664, 2015.

MAN, S. M. Regulation of inflammasome activation. **Immunological Reviews**, v. 265, p. 6–21, 2015.

MANGAN, P. R. et al. Transforming growth factor- β induces development of the Th17 lineage. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 231–234, 2006.

MANGOLINI, M. et al. STAT3 mediates oncogenic addiction to TEL-AML1 in t(12;21) acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 122, p. 542–9, 2013.

MONTESINOS, M. C. et al. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, p. 240–247, 2003.

MONTESINOS, M. C. et al. The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. **Arthritis and Rheumatism**, v. 56, p. 1440–1445, 2007.

MURRAY, P. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 2623–2629, 2007.

NAKAE, S. et al. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 11, p. 6173–7, 2003.

NEGASH, A., GALE, M. Hepatitis regulation by the inflammasome signaling pathway. **Immunological Reviews**, v. 265, p. 143–155, 2015.

- NOACK, M.; MIOSSEC, P. Autoimmunity Reviews Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and in inflammatory diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 6, p. 668–677, 2014.
- NURIEVA, R. et al. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 480–483, 2007.
- OPPMANN, B. et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 715–725, 2000.
- PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**, v. 6, n. 11, p. 1133–1141, 2006.
- PINTO, L. G. et al. IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. **Pain**, v. 148, n. 2, p. 247–256, 2010.
- PINTO, L. G. et al. Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1 β production. **Arthritis Research and Therapy**, v. 17, p. 1–13, 2015.
- POLLARD, L.; CHOY, E. H.; SCOTT, D. L. The consequences of rheumatoid arthritis: quality of life measures in the individual patient. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 23, n. 5 Suppl 39, p. 43–52, 2005.
- QIN, H. et al. TGF- β Promotes Th17 Cell Development through Inhibition of SOCS3. **The Journal of Immunology**, n. 23, p. 97–105, 2009.
- RAASCHOU, P. et al. Rheumatoid arthritis, anti-tumour necrosis factor therapy, and risk of malignant melanoma: nationwide population based prospective cohort study from Sweden. **BMJ (Clinical research)**, v. 346, n. April, p. f1939, 2013.
- RATHINAM, V. A. K.; VANAJA, S. K.; FITZGERALD, K. A. Regulation of inflammasome signaling. **Nature Immunology**, v. 13, n. 4, p. 333–342, 2012.
- SAMSON, M. et al. Brief Report: Inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 8, p. 2499–2503, 2012.
- SANCHES, R. et al. Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 8, p. 2509–2514, 2015.
- SATO, K. et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 12, p. 2673–2682, 2006.
- SCHIFF, M. H. et al. Integrated safety in tocilizumab clinical trials. **Arthritis Research and Therapy**, v. 13, p. 1–13, 2011.

- SCHMITZ, J. et al. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 17, p. 12848–12856, 2000.
- SELLGE, G.; KUFER, T. A. Seminars in Immunology PRR-signaling pathways : Learning from microbial tactics. **Seminars in Immunology**, v. 27, n. 2, p. 75–84, 2015.
- SHAMI, P. J. et al. Identification and characterization of a novel gene that is upregulated in leukaemia cells by nitric oxide. **British Journal of haematology**, v. 112, p. 138–147, 2001.
- SIEBERT, S. et al. Cytokines as Therapeutic Targets in Rheumatoid Arthritis and Other Inflammatory Diseases. **Pharmacological Reviews**, v. 67, p. 280–309, 2015.
- SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 6, p. 473–488, 2003.
- SULLIVAN, S. D. et al. Economic consequences of sequencing biologics in rheumatoid arthritis: a systematic review. **Journal of Medical Economics**, v. 16, n. 3, p. 391–396, 2013.
- TAKIMOTO, T. et al. Smad2 and Smad3 Are Redundantly Essential for the TGF- β – Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. **The Journal of Immunology**, v. 185, p. 842–855, 2010.
- TALBOT, J. et al. CCR2 Expression in Neutrophils Plays a Critical Role in Their Migration Into the Joints in Rheumatoid Arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 67, n. 7, p. 1751–1759, 2015.
- TING, J. P. et al. Correspondence The NLR Gene Family : A Standard Nomenclature. **Immunity**, v. 28, p. 285–287, 2008.
- TUNCER, S.; FIORILLO, M. T.; SORRENTINO, R. The multifaceted nature of NLRP12. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 96, p. 991–1000, 2014.
- VAN DEN BERG, W. B.; MIOSECC, P. IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, n. 10, p. 549–553, 2009.
- VERAS, F. P. et al. Fructose 1,6-bisphosphate, a high energy intermediate of glycolysis , attenuates experimental arthritis by activating anti-inflammatory adenosinergic pathway. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–11, 2015.
- VLADIMER, G. I. et al. The NLRP12 Inflammasome Recognizes Yersinia pestis. **Immunity**, v. 37, n. 1, p. 96–107, 2012.
- WALSH, J. G.; MURUVE, D. A.; POWER, C. Inflammasomes in the CNS. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 2, p. 84–97, 2014.
- WANG, L. et al. PYPAF7 , a Novel PYRIN-containing Apaf1-like Protein That Regulates Activation of NF- κ B and Caspase-1-dependent Cytokine Processing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 33, p. 29874–29880, 2002.

WEI, L. et al. IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 48, p. 34605–10, 2007.

WILLENBORG, D. O. et al. IFN- γ Plays a Critical Down-Regulatory Role in the Induction and Effector Phase of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein-Induced Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 157, n. 8, p. 3223–3227, 1996.

WILLIAMS, K. L. et al. Cutting Edge: Monarch-1: A pyrin/nucleotide-binding domain/leucine-rich repeat protein that controls Classical and Nonclassical MHC Class I Genes 1. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 1–6, 2003.

WILLIAMS, K. L. et al. The Caterpillar Protein Monarch-1 is an Antagonist of Toll-like Receptor-, Tumor Necrosis Factor Alpha-, and Mycobacterium tuberculosis-induced Pro-inflammatory Signals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 48, p. 39914–39924, 2005.

XIE, Q.; HUANG, C.; LI, J. Interleukin-22 and rheumatoid arthritis: Emerging role in pathogenesis and therapy. **Autoimmunity**, v. 48, n. 2, p. 69–72, 2015.

YANG, J. et al. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 10, p. 493–500, 2014.

YANG, X. O. et al. STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 13, p. 9358–9363, 2007.

YANG, X. O. et al. T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . **Immunity**, v. 28, p. 29–39, 2008.

YASUKAWA, H. et al. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. **Nature Immunology**, v. 4, n. 6, p. 551–556, 2003.

YOSHIMURA, A.; NAKA, T.; KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 6, p. 454–465, 2007.

ZAKI, H. et al. The NOD-Like Receptor NLRP12 Attenuates Colon Inflammation and Tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 20, n. 5, p. 649–660, 2011.

ZAMOSHNIKOVA, A. et al. NLRP12 is a neutrophil-specific, negative regulator of in vitro cell migration but does not modulate LPS- or infection-induced NF- κ B or ERK signalling. **Immunobiology**, p. 1–6, 2015.

ZHONG, Y.; KINIO, A.; SALEH, M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 1–18, 2013.

ZHONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL, J. E. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. **Science**, v. 264, p. 95–98, 1994.

ZHOU, L. et al. IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature Immunology**, v. 8, n. 9, p. 967–974, 2007.