Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

TESE DE DOUTORADO

A sinalização de TGF-β envolvida na expressão de CD39 em células T reguladoras está associada com a eficácia terapêutica do metotrexato na artrite reumatóide

Raphael Sanches Peres

Ribeirão Preto

2016

Raphael Sanches Peres

A sinalização de TGF-β envolvida na expressão de CD39 em células T reguladoras está associada com a eficácia terapêutica do metotrexato na artrite reumatóide

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada à fonte.

Ficha Catalográfica

Peres, Raphael Sanches

A sinalização de TGF-β envolvida na expressão de CD39 em células T reguladoras está associada com a eficácia terapêutica do metotrexato na artrite reumatóide.

Ribeirão Preto, 2016.

154p.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Área de concentração: Imunologia- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientador: Fernando de Queiroz Cunha

Palavras-chave: artrite reumatóide, auto-imunidade, células Treg, adenosina, CD39, metotrexato.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Raphael Sanches Peres

A sinalização de TGF-β envolvida na expressão de CD39 em células T reguladoras está associada com a eficácia terapêutica do metotrexato na artrite reumatóide

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Aprovado em: __ de _____ de 2016.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Paulo Louzada Junior

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Dario Simões Zamboni

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Instituição: UFMG Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Torres Bozza

Instituição: UFRJ Assinatura: _____

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação e Dor do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco e Maristela, por todo amor, ensinamentos e carinho oferecidos durante toda a minha vida e que me fizeram chegar até este momento. À minha namorada e futura esposa, Tatiana, por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis, por seu amor, compreensão e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Francisco (pai), Maristela (mãe), Elaine (tia) e Aide (vó), que sempre estiveram ao meu lado, proporcionando ensinamentos e carinho.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, pela sua orientação, dedicação e competência. Obrigado pelo incentivo e pela confiança em meu trabalho que foram de fundamental importância para o meu amadurecimento científico. Considero o senhor como um segundo pai de maneira fraternal, mas com certeza é e sempre será meu pai científico.

Ao Prof. Dr. Paulo Louzada-Junior, pela confiança em meu trabalho, ensinamentos e auxílios com a coleta e análise de dados de pacientes.

Aos docentes participantes da minha banca examinadora, pela disponibilidade e por me atenderem prontamente com atenção.

Aos meus amigos e colaboradores Prof. Dr. Thiago M. Cunha e Prof. Dr. José Carlos Alves Filho, pela atenção e competência que foram de fundamental importância na realização deste trabalho. Obrigado também pela amizade e apoio.

Ao grupo da artrite: Paula Barbim, Jhimmy, Larissa, Kalil, Flávio Protásio e André Saraiva, pelo grande auxílio nos experimentos deste trabalho e pela amizade sincera.

À equipe da Reumatologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto-USP, Prof. Dr. Paulo Louzada-Júnior, Dr. Rene Oliveira e Dr. Sérgio Almeida, pela valiosa contribuição na realização deste trabalho através de sugestões e ajuda na coleta das amostras.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Inflamação e Dor: David. C., Guilherme, Douglas, Miriam, Maria Cláudia, Marcela, Caio, Annie, Joana, Ricardo, Adriana, Daniele Nascimento, Fernanda, Bruno, Mateus, Alexandre Kanashiro, Rangel, David W., João Paulo, Paula Viacava, Cássia, Wagner, Andreza Urba, Flávia, Paulo, Carlos Hiroki, Raphael Ferreira, Jaqueline, Artur, Maria Cláudia, Gabriel, Alexandre Lopes, Miriam, Silvia, Rafaela, Fábio, Juliana e Vanessa.

Aos técnicos de laboratório: Ana Katia, Giuliana, Diva, Ieda, Marquinhos, André, Vagner Jesus e Serginho pelo apoio técnico e amizade.

À secretária da Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine, pela sua grande amizade, companheirismo e carinho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira (*in memorian*), pela colaboração neste trabalho, ensinamentos e exemplo de dedicação a ciência.

A todos os funcionários e docentes do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP, pela competência, amizade e também pelo convívio.

À minha sogra (Silvia) e cunhada (Carolina) pelo convívio, carinho e apoio concedidos durante a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada pelo convívio e amizade.

À FAPESP (processo número: 2012/10438-0) pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para este trabalho e também a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante este período.

RESUMO

PERES, RS. **A sinalização de TGF-β envolvida na expressão de CD39 em células T reguladoras está associada com a eficácia terapêutica do metotrexato na artrite reumatóide.** Tese de doutorado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

A Artrite Reumatóide (AR) é uma artropatia autoimune multifatorial com etiologia desconhecida que afeta aproximadamente 1% da população adulta. A estratégia padrão para o tratamento da AR consiste na administração de baixas doses de Metotrexato (MTX), cujo efeito anti-inflamatório está relacionado com a manutenção dos níveis elevados de adenosina (ADO) extracelular. No entanto, uma parte considerável dos pacientes com AR é refratária ao tratamento com MTX e o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre ainda não está totalmente esclarecido. Neste contexto, o presente estudo descreveu que a eficácia terapêutica ao MTX está associada com a expressão em células Tregs da ectoenzima CD39, cuja função biológica é a geração de ADO extracelular via metabolização do ATP. Especificamente, através da realização de um estudo longitudinal, observamos que pacientes respondedores ao MTX (R-MTX) apresentam uma expansão de células Tregs circulantes expressando CD39 após o tratamento com MTX. Por outro lado, identificamos que pacientes não respondedores ao MTX (UR-MTX) possuem uma redução da expressão de CD39 em células Tregs, o que culmina em um comprometimento das suas funções supressoras. Ainda, demonstramos que a expressão de CD39 em células Tregs é um biomarcador apto em predizer a resposta terapêutica ao MTX, visto que pacientes UR-MTX apresentam uma expressão reduzida de CD39 em Tregs mesmo antes do início do tratamento com MTX. Posteriormente, nós investigamos as bases moleculares que acarretam na expressão reduzida de CD39 observada em células Tregs de pacientes UR-MTX. Demonstramos que a estimulação com TGF-β tanto em células Tregs isoladas quanto diferenciadas *in vitro* aumenta a expressão de CD39 através da ativação sequencial da seguinte plataforma molecular: receptores de TGF-β (TGFBRII e TGFBRI), transdutor de sinal SMAD2, fator de transcrição CREB, de modo dependente da atividade de p38. Uma vez identificada a via envolvida com a indução da expressão de CD39, demonstramos que células Tregs diferenciadas de indivíduos que apresentam uma expressão reduzida de CD39 são incapazes de induzir a expressão desta ectoenzima através da estimulação com TGF-β. Por fim, transpondo nossos achados para pacientes com AR, observamos que pacientes UR-MTX apresentam uma redução nos níveis de RNAm para TGFBRII e CREB bem como também uma redução das proteínas fosforiladas SMAD2 e CREB em células $CD4^+$ e Tregs, sugerindo que o comprometimento na cascata de sinalização de TGF-β, envolvida com a indução da expressão de CD39 em células Tregs, está associado com a resistência ao MTX.

Palavras-chave: artrite reumatóide, auto-imunidade, células Tregs, adenosina, CD39, Metotrexato.

ABSTRACT

PERES, RS. **TGF-β signaling involved in the CD39 expression on regulatory T cells is associated with therapeutic efficacy of the methotrexate in rheumatoid arthritis.** Thesis (Doctorate) – Department of Pharmacology. Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune multifactorial arthropathy with unknown etiology that affects approximately 1% of the adult population. The standard strategy for RA treatment comprises the administration of low doses of methotrexate (MTX), whose anti-inflammatory effects are associated with maintenance of high levels of extracellular adenosine (ADO). However, a considerable proportion of RA patients is resistant to MTX treatment and the mechanisms underlying this phenomenon occurs is poorly understood**.** Within this context, the present study showed that therapeutic efficacy of MTX is associated with expression on Treg cells of the ectoenzyme CD39, whose function is related to the generation of extracellular ADO by ATP metabolism. Specifically, we conducted a longitudinal study and observed that responsive patients to MTX (R-MTX) exhibit an increase in the frequency of circulating Treg cells expressing CD39 after MTX treatment**.** On the other hand, we found that non-responsive patients to MTX (UR-MTX) have a reduction of CD39 expression on Treg cells, which culminates in an impairment of Treg function. Furthermore, these findings indicate that CD39 expression on Treg cells is a biomarker for therapeutic response to MTX, since UR-MTX patients had a depressed CD39 expression on Treg cells even before MTX treatment. Subsequently, the present study investigated the molecular mechanisms that would cause the reduction of CD39 expression on Treg cells from UR-MTX patients. For this, we demonstrated that TGF-β stimulation increases CD39 expression in isolated and *in vitro* differentiated Treg cells through participation/activation of the following molecules: receptors of TGF-β, TGFBRII and TGFBRI, signal transducer SMAD2 and transcription factor CREB, through p38 activity dependent-manner. Once identified these molecules involved with CD39 induction, we demonstrated that differentiated Treg cells from healthy individuals with an intrinsic reduction of CD39 expression on circulating Treg cells are unable to increase CD39 expression by TGF-β stimulation. Transposing our findings to RA patients, we found that UR-MTX patients exhibit a reduction of mRNA for TGFBRII and CREB as well as reduction on levels of phospho-SMAD2 and phospho-CREB in $CD4^+$ and Treg cells, suggesting that an impairment in TGF-β signaling pathway, related to induction of CD39 expression on Treg cells, is associated with MTX resistance.

Keywords: Rheumatoid arthritis, auto-immunity, Treg cells, adenosine, CD39, Methotrexate.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACR: Colégio Americano de Reumatologia

ADO: adenosina

ADP: adenosina difosfato

AICAR: ribonucleótido aminoimidazocarboxamida

AMP: adenosina monofosfato

AMPc: adenosina monofosfato cíclica

Anti-CCP: anticorpos contra protéinas citrulinadas

APC: célula apresentadora de antígeno

AR: artrite reumatóide

ATP: adenosina trifosfato

AUC: área sob a curva

CIA: artrite induzida por colágeno do tipo II

CREB: *cAMP response element-binding protein*

DAS28: índice de atividade da doença baseada em 28 articulações

DCs: células dendríticas

DMARD: droga anti-reumática modificadora da doença

DMCD: medicação modificadora do curso da doença

DNA: ácido desoxirribonucléico

EAE: encefalomielite autoimune experimental

ELISA: ensaio imunoenzimático

ENT1: Equilibrative nucleoside transporter 1

ENTP1: ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1

EULAR: Liga Européia contra Reumatismo

FoxP3: forkhead box P3

FR: fator reumatóide

g: grama (s)

h: hora

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

iCD39: inibidor da atividade de CD39

iCREB: inibidor da atividade de CREB

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IFN: interferon

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

iTreg: células Tregs induzidas *in vitro*

Healthy: indivíduos saudáveis

Kg: quilograma (s)

L: litro (s)

LPS: lipopolissacarídeo

mg: miligrama (s)

min: minuto (s)

ηg: nanograma (s)

µ**g:** micrograma (s)

µl: microlitro (s)

ml: mililitro (s)

MMP: metaloproteinases

MTX: Metotrexato

NO: óxido nítrico

NSAID: anti-inflamatório não esteroidal

nTreg: células Treg

PBMC: células mononucleares do sangue periférico

PBS: tampão salina fosfato

Pi: fosfato inorgânico

R-MTX: respondedor ao tratamento com MTX

RNA: ácido ribonucléico

RNAm: RNA mensageiro

ROC: *Receiver operating characteristic*

ROS: espécies reativas de oxigênio

RT-PCR: transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase

SMAD2: *Mothers against decapentaplegic homolog 2*

TBS: tampão salina tris

TCR: receptor de células T

Teff: células T efetoras

Th: T auxiliar (*helper*)

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

Tregs: células T reguladoras

UR-MTX: não respondedor ao tratamento com MTX

VHS: nível da velocidade de hemossedimentação

LISTA DE SÍMBOLOS

α: Alfa

β: Beta

κ: Kappa

μ: Micro

η: Nano

Δ: Delta

®: Marca registrada

™: Trademark

%: Porcentagem

±: mais ou menos

°C: grau Celsius

λ: lambda

SUMÁRIO

1. Introdução..... 24

1.1 Artrite Reumatóide (AR)..... 25

1.1.1. Características cínicas da AR..... 26

1.1.2.Critérios para classificação diagnóstica da AR..... 27

1.1.3.Avaliação da atividade da doença..... 30

1.2. Fatores envolvidos com o desenvolvimento da AR..... 31

1.2.1. Fatores genéticos associados com a AR 32

1.2.2. Fatores ambientais associados com a AR..... 33

1.2.3. Perfil da resposta imunológica da AR..... 33

1.3. Papel das células Tregs na AR..... 36

1.4.Estratégias terapêuticas para AR e utilização do MTX como terapia padrão..... 39

1.5. Expressão de ectonucleotidases em células Tregs e resistência ao MTX..... 45

1.6. Hipóteses do estudo..... 51

2. Objetivos..... 53

3. Metodologia..... 55

3.1. Reagentes..... 56

3.2. Pacientes e indivíduos saudáveis..... 56

3.3. Obtenção de leucócitos do sangue periférico dos pacientes..... 58

3.4. Fenotipagem de células Tregs por citometria de fluxo..... 58

3.5. Separação das subpopulações de células T..... 59

3.6. Ensaio para avaliação da capacidade supressora de células Tregs..... 60

3.7. Cultura celular..... 60

3.8. Dosagem de TGF-β por ELISA..... 61

3.9. Quantificação de genes de interesse por PCR em tempo real..... 62

3.10. Análises de Western Blot..... 63

3.11. Critérios para classificação de indivíduos saudáveis com expressão alta ou reduzida de CD39 em Tregs circulantes..... 64

3.12. Análise estatística..... 64

4. Resultados..... 65

4.1. Frequência de células CD39^{+}Tregs em pacientes com AR antes e após o tratamento com MTX (estudo longitudinal)..... 66

4.2. Expressão de CD39 em células Tregs de pacientes com AR antes e após o tratamento com MTX (estudo longitudinal)…..... 69

4.3. Células Tregs de pacientes UR-MTX apresentam função imunossupressora comprometida…… 73

4.4. Vias de sinalização envolvidas com a indução e modulação da expressão de CD39 em células Tregs…..... 76

4.4.1. TGF-β promove um aumento da expressão de CD39 em células Tregs isoladas de indivíduos saudáveis……..... 76

4.4.2. Efeito da estimulação com TGF-β na indução da expressão de CD39 em células Tregs humanas diferenciadas in vitro..... 80

4.4.3. Moléculas envolvidas na indução/regulação da expressão de CD39 após a estimulação com TGF-β em células Tregs……..... 86

4.4.4. Influência da variabilidade dos níveis basais de expressão de CD39 na diferenciação de células Tregs……..... 96

4.5. Influência da variabilidade dos níveis basais de expressão de CD39 na promoção do aumento de CD39 em Tregs através da estimulação com TGF-β…..... 101

4.6. Análise da expressão de moléculas envolvidas com o aumento da expressão de CD39 em células Tregs de pacientes UR-MTX..... 104

5. Discussão..... 115

6. Conclusão..... 127

7. Referências Bibliográficas..... 130

8. Anexos..... 146

9. Artigos…… 154

1- INTRODUÇÃO

1.1. Artrite reumatóide (AR)

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica de caráter autoimune, debilitante e etiologia desconhecida, que afeta primariamente as articulações (Feldmann et al., 1996). As principais manifestações articulares na AR são dor, edema e rubor articular devido a inflamação no tecido sinovial (Sweeney & Firestein, 2004). Estudos epidemiológicos demonstram que a AR afeta cerca de 1-2% da população mundial (Lubberts, 2008), sendo que sua incidência predomina em pessoas na faixa etária de 35 aos 65 anos, afetando três vezes mais mulheres do que homens (Symmons et al., 1994). No Brasil, a prevalência da AR varia entre 0.2 a 1% da população adulta (Marques Neto et al., 1993). Nos países desenvolvidos, como nos Estados Unidos da América (EUA), há levantamentos mais detalhados sobre a epidemiologia da AR indicando que a incidência anual da doença entre 1995 e 2007 foi de 41/100,000 pessoas por ano, sendo diretamente proporcional à idade do grupo populacional. De fato, a incidência da AR em indivíduos acima de 65 anos é de 89/100,000 pessoas por ano, enquanto que em indivíduos mais jovens, pessoas entre 18-34 anos, é de 8.7/100,000 pessoas por ano (Myasoedova et al., 2010). Assim, o atual envelhecimento das populações terá como consequência um aumento na prevalência da AR.

A AR gera um alto impacto socioeconômico, pois com a progressão da doença, os pacientes desenvolvem restrições para realizar atividades diárias básicas e profissionais, o que ocasiona um impacto significativo na qualidade de vida do paciente e prejuízos econômicos individuais e ao sistema de saúde (Riise et al., 2001; Silman & Pearson, 2002; Kobayashi et al., 2008). De fato, um estudo mostra que nos EUA a AR é a 19º causa mais comum de perda de anos de trabalho relacionada com incapacidade, o que é notável devido a baixa prevalência da AR frente à outras comorbidades (Michaud & Wolfe, 2007). Curiosamente, em relação aos gastos que a AR gera no Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) gastou entre 2003 a 2006 aproximadamente R$75.000.000,00 somente com o

fornecimento de medicamentos, não incluindo gastos com serviços hospitalares e profissionais (Costa et al., 2014).

Além do impacto econômico e na qualidade de vida, estudos têm demonstrado uma redução da expectativa de vida em indivíduos com AR em comparação com a população geral (Humphreys et al., 2014). Indivíduos com AR têm uma razão de mortalidade padronizada (SMR) de 2.3 comparada à população geral, o que significa que pacientes com AR possuem mais que o dobro de chances de óbito do que uma pessoa de mesma idade sem AR (Wolfe et al., 1994). Ainda, estas mortes estão associadas não somente com o fato de o individuo ter a doença, mas com a gravidade da AR, o que indica a importância da implementação de um tratamento eficaz e adequado para modular esta condição (Wolfe et al., 1994).

1.1.1. Características cínicas da AR

A AR é caracterizada clinicamente por ser uma poliartrite crônica e simétrica, aditiva, e com envolvimento de pequenas e grandes articulações periféricas. Nesta condição, o processo inflamatório afeta primariamente a sinóvia, uma fina membrana que delimita fisicamente o espaço articular, promovendo a ativação e consequente proliferação das células que a compõe. Posteriormente, ocorre a formação de um tecido originado por um aumento da espessura da sinóvia inflamada conhecido como *pannus* (Sweeney & Firestein, 2004), que por sua vez, pode invadir e destruir a cartilagem e o tecido ósseo (Tarner et al., 2005). A combinação entre atrofia e destruição tecidual promove as deformidades características da doença, em especial nas articulações interfalangeanas proximais de mãos (IFP) e pés, nas metacarpofalangenas (MCF), nas metatarsofalangenas (MTF), nos punhos e nos tornozelos (Tarner et al., 2005). Na maioria dos pacientes as manifestações clínicas da AR são bem definidas, constituindo-se principalmente de alterações músculo-esqueléticas, porém alguns pacientes sofrem manifestações extra-articulares e, praticamente todos, experimentam algum sintoma geral inespecífico, tais como fadiga,

astenia, hiporexia, febre baixa e mialgias (McInnes & Schett, 2011). Deste modo, sabendo que o dano tecidual é uma consequência de um processo inflamatório crônico das articulações, o diagnóstico e o tratamento precoce da AR são fatores fundamentais para evitar as deformidades e incapacidade de locomoção resultantes desta doença.

1.1.2. Critérios para classificação diagnóstica da AR

Até setembro de 2010, o diagnóstico de AR era feito utilizando os critérios de classificação estabelecidos em 1987 pelo Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology – ACR*) (Arnett et al., 1988). Esses critérios (Tabela 1) servem como um guia, mas são insuficientes em algumas ocasiões, como em casos oligoarticulares, com inflamação menos evidente, fator reumatóide [FR, IgM, IgA ou IgG contra a porção Fc de uma IgG humana (Holers, 2013)] negativo e quando as alterações radiológicas ainda não se manifestaram. Os critérios contemplam indivíduos com quadro clínico bem estabelecido e típico para AR.

Tabela 1. Critérios Revisados do *American College of Rheumatology* (ACR) de 1987 para Classificação de Artrite Reumatóide

Rigidez matinal	Rigidez matinal da articulação, durando pelo menos 1 hora antes de ocorrer a melhora máxima
Artrite de mãos	No mínimo uma área articular edemaciada
Artrite simétrica	Envolvimento simultâneo das mesmas áreas articulares (como definido acima) nos dois lados do corpo
Nódulos reumatóides	Nódulos subcutâneos sobre as proeminências ósseas ou superfícies extensoras ou em regiões justa-articulares
Fator reumatóide sérico	Demonstração de quantidades anormais de fator reumatóide sérico por qualquer método que tenha sido positivo em menos de cinco por cento dos controles normais
Alterações radiográficas	Alterações radiográficas típicas de artrite reumatóide em raio-X póstero-anterior de mãos e punhos, que podem incluir erosões ou descalcificação óssea inequívoca localizada ou mais acentuada em área adjacente às articulações envolvidas

Para fins de classificação, pode-se dizer que um paciente apresenta AR se tiver no mínimo 4 dos critérios acima. Os primeiros quatro devem estar presentes por no mínimo 6 semanas.

Em uma significativa parcela dos indivíduos que desenvolvem sintomas articulares inflamatórios não é possível o diagnóstico nos primeiros três meses de doença. Desta forma, as sociedades internacionais para doenças reumáticas (o ACR e o EULAR – Liga Européia contra o Reumatismo) elaboraram novos critérios para o diagnóstico de AR, visando diminuir o tempo para o diagnóstico e conduta terapêutica (Aletaha et al., 2010). Estes critérios são baseados na extensão do envolvimento articular, duração da inflamação na sinóvia (sinovite), presença de auto-anticorpos e de marcadores sorológicos como valor da velocidade de hemossedimentação (VHS) e Proteina C-reativa (PCR) (Tabela 2). Para

cada critério é estabelecido um valor numérico e o diagnóstico da AR é definido por um somatório maior ou igual a 6 pontos.

Tabela 2. Novos critérios para diagnóstico de AR (*EULAR/ACR*, 2009)

Envolvimento articular	
1 articulação média ou grande	0
2 a 10 articulações médias ou grandes	1
1 a 3 pequenas articulações	2
4 a 10 pequenas articulações	3
Mais que 10 pequenas articulações	5
Sorologia	
FR ou ACPA negativo	0
FR ou ACPA baixos títulos (não maior que 3 vezes limite superior)	1
FR ou ACPA altos títulos	3
Duração da sinovite	
Menor que 6 semanas	0
Maior que 6 semanas	1
Reagentes de fase aguda	
VHS ou Proteína C-reativa não elevados	0
VHS ou Proteína C-reativa elevados	1

Diagnóstico de AR definido por resultado maior ou igual a 6 pontos.

Como pode ser notado na tabela anterior, a detecção de autoanticorpos é uma ferramenta importante no auxílio do diagnóstico da AR. De fato, atualmente é utilizada na clínica a detecção de dois autoanticorpos para o seu diagnóstico, o fator reumatóiide (FR) e a presença de anticorpos contra peptídeos citrulinados (ACPAs) (Chaiamnuay & Bridges, 2005). O FR é caracterizado por uma IgM, IgA ou IgG contra a porção Fc de uma IgG humana, sendo a classe IgM a que se detecta sorologicamente com maior frequência (Holers, 2013). O FR reage com os anticorpos produzidos nas articulações sinoviais, gerando imuno-complexos que promovem a ativação do complemento e posterior dano tecidual. Embora a presença de FR em pacientes com AR esteja relacionada à maior atividade da doença, outras doenças, como lúpus eritematoso, síndrome de Sjögren, hepatite crônica ativa, hanseníase e algumas infecções parasitárias, podem mostrar positividade para esse anticorpo (Harty & Veale, 2010). Em adição, os ACPAs são produzidos localmente por células B presentes na membrana sinovial inflamada e no líquido sinovial de pacientes com AR (Reparon-Schuijt et al., 2001; Kinloch et al., 2008) e são capazes de reagir com diversos peptídeos citrulinados (Alessandri et al., 2008). Embora a maioria dos pacientes ACPA positivos também apresentam FR positivo, os ACPAs são mais específicos para o diagnóstico e parecem ser melhores preditores de pior prognóstico. Entre 50 a 80% dos pacientes com AR apresentam positividade para FR, ACPAs, ou para ambos (Chaiamnuay & Bridges, 2005; Vossenaar et al., 2004). Indivíduos com AR com FR e ACPAs positivos diferem dos indivíduos com autoanticorpos ausentes, pois apresentam doença mais grave, com maior índice de destruição articular e pior resposta à terapia convencional (Manivelavan & Vijayasamundeeswari, 2012).

1.1.3. Avaliação da atividade da doença

Além de determinar o diagnóstico da AR na fase inicial da doença, é importante também realizar a avaliação do grau de atividade da doença no início do tratamento e, posteriormente, em todas as visitas clínicas, a fim de acompanhar a eficácia terapêutica. A avaliação da atividade da doença auxilia no direcionamento das condutas clinicas na AR

com o intuito de obter o principal objetivo da terapêutica: controlar a inflamação articular e eliminar ou retardar o progresso da doença, prevenindo assim a incapacitação física devido ao dano articular.

Para determinar a atividade da doença, foram elaborados pelo Colégio Americano de Reumatologia e pela Liga Européia contra o Reumatismo (EULAR) alguns critérios de classificação da atividade, como o escore DAS28, que consiste na contagem de articulações dolorosas (NAD) e articulações edemaciadas (NAE) entre 28 possíveis (2 IFPs dos polegares, 8 IFPs proximais das mãos, 10 MCF, 2 punhos, 2 cotovelos, 2 ombros e 2 joelhos), na escala visual analógica de avaliação global de saúde (AGS) pelo próprio paciente (em mm) e no valor da velocidade de hemossedimentação (VHS) (em mm/1ªhora) (Prevoo et al., 1995). Após a determinação dos valores dos parâmetros analisados, a seguinte fórmula é empregada para o cálculo do índice DAS28:

$$\boxed{DAS28 = 0.56 \times \sqrt{(NAD28)} + 0.28 \times \sqrt{(NAE28)} + 0.70 \times \log_{nat}(VHS) + 0.014 \times AGS}$$

Deste modo, a atividade da doença é designada de acordo com os valores de DAS28: DAS28 ≤ 2,6 remissão; DAS28 ≤ 3,2 baixa; DAS28 ≤ 5,1 moderada; DAS28 > 5,1 elevada. Ressalta-se que o DAS28 é um índice composto, o qual inclui medidas subjetivas como a avaliação global de saúde pelo próprio paciente. Alguns trabalhos têm sugerido que o índice de atividade da doença em um indivíduo deve ser interpretado de forma crítica, visto que os valores de DAS28 podem permanecer elevados na ausência de inflamação, particularmente em indivíduos com dor persistente secundária decorrente de um dano estrutural articular (Pincus et al., 2011).

1.2. Fatores envolvidos com o desenvolvimento da AR

Apesar da exata etiologia ainda permanecer desconhecida, a AR possui uma gênese multifatorial, cujo desencadeamento está associado com uma quebra de tolerância imunológica, em outras palavras, o sistema imunológico ataca moléculas do próprio organismo, não as reconhecendo como próprias, mas como corpos estranhos ou patógenos

(auto-antígenos)(Rose & Bona, 1993). Ainda, outros fatores estão relacionados com o desenvolvimento da AR: predisposição genética e influência de fatores ambientais modulando a resposta imune, principalmente o tabagismo e exposição ocupacional (Olsson et al., 2004).

1.2.1. Fatores genéticos associados com a AR

A predisposição para o desenvolvimento da AR tem uma estreita relação com a presença de variantes genéticas (Silman & Pearson, 2002). Esta predisposição genética é evidente em estudos envolvendo gêmeos, visto que foi relatado que gêmeos monozigóticos demonstram uma concordância quatros vezes maiores no desenvolvimento de AR do que gêmeos dizigóticos (MacGregor et al., 2000). Ainda, os riscos relativos para o desenvolvimento da AR são de 2 a 4 vezes maiores em pessoas em grau de parentesco de primeiro grau com pacientes com AR do que o risco relativo para a população geral (Jones et al., 1996; Hemminki et al., 2009).

Os principais fatores genéticos de risco para a AR são as variantes alélicas no gene que codifica a cadeia beta do HLA-DR, (HLA-DRB1) (del Junco et al., 1984; Raychaudhuri, 2010). O HLA-DR é um receptor heterodímero da família de moléculas de MHC II (Das et al., 1983), ou seja, do complexo de apresentação de antígenos responsável por apresentar peptídeos e se ligar ao receptor de células T (TCR). A maioria das variantes gênicas do HLA-DRB1 associadas com a AR codifica um motivo comum de aminoácidos, conhecido como epítopo compartilhado, o qual está associado com uma maior susceptibilidade à AR (Gregersen et al., 1987). Indivíduos homozigotos de alelos que codificam o epítopo compartilhado têm uma maior chance de desenvolver AR do que indivíduos que não possuem estes alelos (Saruhan-Direskeneli, 1998). Ainda, polimorfismos em outros *loci*, que codificam as proteínas PTPN22, PADI4, CTLA-4, citocinas, como TNF-α, IL-1β, IL-10 e IL-18, outros receptores, têm sido relacionados com desenvolvimento e/ou prognóstico da doença (van der Helm-van Mil et al., 2005; McInnes & Schett, 2007). Além disso, foi

demonstrada uma forte associação entre os alelos HLA-DRB1 e o desenvolvimento de ACPAs (Klareskog et al., 2011).

1.2.2. Fatores ambientais associados com a AR

Fatores ambientais também são sugeridos como fatores de risco para o desenvolvimento da AR, dentre eles se destacam o tabagismo, exposição a solventes orgânicos, a poeira orgânica, óleos minerais, fertilizantes e aerossóis poluentes (Olsson et al., 2004; Hoovestol & Mikuls, 2011). De fato, trabalhos na literatura mostram que a exposição de indivíduos aos poluentes presentes na fumaça do cigarro acelera processos de citrulinização de proteínas (Makrygiannakis et al., 2006). Além disso, estudos epidemiológicos descrevem que o risco de desenvolvimento de AR em indivíduos fumantes é maior do que pessoas que não fumam (Heliovaara et al., 1993; Stolt, 2003). Adicionalmente, algumas infecções virais, como por Epstein–Barr vírus (EBV), e bacterianas também são descritas como fatores de risco para o surgimento da doença (Toussirot & Roudier, 2007; Francis et al., 2002; Dissick et al., 2010).

1.2.3. Perfil da resposta imunológica da AR

Como mencionado anteriormente, a AR é uma doença de caráter autoimune, ou seja, causada por uma resposta imune exacerbada e disfuncional contra antígenos próprios, afetando células e tecidos próprios (Rose & Bona, 1993). Na AR ainda não há um consenso de qual auto-antígeno seria crítico para o desenvolvimento do fenômeno autoimune, porém algumas evidências sugerem que a doença está relacionada ao reconhecimento específico de proteínas citrulinadas próprias como antígenos (Szekanecz et al., 2008). De fato, auto-anticorpos contra essas proteínas (ACPAs) estão presentes no plasma em aproximadamente 70% de pacientes com AR (Nishimura et al., 2007), tornando a detecção de ACPAs uma teste fundamental para o auxílio do diagnóstico da AR (Aggarwal et al., 2009). Em adição, estudos clínicos e em modelos experimentais de AR sugerem que outros possíveis auto-antígenos também possam estar relacionados com o surgimento desta

condição, como colágeno tipo II e a proteína de cartilagem GP39 (Trentham et al., 1993; Rantapää-Dahlqvist et al., 2003; Baeten et al., 2000). Ainda, vale ressaltar que outras evidências circunstanciais sugerem que a AR é uma doença autoimune, como o fato da arquitetura genética da AR se agrupar com a de outras doenças autoimunes e também pelo fato de que a indução de imunossupressão bem como o bloqueio da sinalização de vias imunológicas efetoras são estratégias favoráveis para a terapia da AR (Suzuki et al., 2011; Yocum, 1994; Meier et al., 2013). Por fim, é claramente demonstrada por vários estudos que a imunização com estes auto-antígenos mencionados anteriormente reproduz as características clínicas da artrite em animais geneticamente susceptíveis (Brand et al., 2007), e ainda, a transferência de linfócitos T *helper* $CD4^+$ de animais com artrite é capaz de induzir a doença para animais não susceptíveis (Kadowaki et al., 1994; Shahrara et al., 2008).

Adicionalmente, existem ainda várias demonstrações da importância de um subtipo de linfócito T $CD4^+$ responsável pela montagem da resposta autoimune na AR(Leipe et al., 2010). Este subtipo de célula T $CD4^+$ (T *helper*) é caracterizado pela produção da citocina pró-inflamatória IL-17A e é denominado linfócito Th17 ou células Th17 (Harrington et al., 2005). As células Th17 estão presentes em níveis elevados na circulação sanguínea periférica e no fluido sinovial de pacientes com AR (Shahrara et al., 2008). Além disso, vários estudos mostram que não somente o desenvolvimento da AR, mas também seu o agravamento está associado com estas células (Arroyo-Villa et al., 2012). De fato, a frequência destes linfócitos em pacientes com AR correlaciona positivamente com marcadores de atividade da doença, como o DAS28 (Arroyo-Villa et al., 2012).

Uma vez produzida pelas células Th17, a IL-17A pode ativar e amplificar todos os mecanismos relacionados com a injúria tecidual os quais têm sido descritos na AR. Em particular, a IL-17A pode aumentar e/ou sinergizar com os mediadores inflamatórios presentes no local da inflamação, tais como: IL-6, IL-1β e TNF-α (Chabaud et al., 2001; Katz et al., 2001; LeGrand et al., 2001); pró-oxidantes como óxido nítrico (Lubberts, 2015) além

de promover a injúria da matriz extracelular através da ativação de metaloproteinases (MMP) e da inibição dos componentes envolvidos no reparo tecidual como proteoglicanos e colágeno (Jovanovic et al., 1998). A IL-17A também estimula fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e macrófagos a produzirem RANTES, GM-CSF, IL-1, IL-6, ICAM-1, PGE_2, metaloproteinases, NOS-2, dentre outros mediadores que também estão envolvidos com a migração neutrofílica (Pelletier et al., 2010). Além disso, a IL-17A induz a expressão de RANKL, o qual é crucial para a diferenciação de osteoclastos funcionais, atuando como promotor da degradação óssea na articulação (Kikuta et al., 2013). Curiosamente, além da citocina IL-17A, células Th17 também secretam outras citocinas pro-inflamatórias como IL-21 e IL-22, as quais já foram descritas como importantes mediadores para o desenvolvimento da sinovite na artrite experimental (Ouyang et al., 2008).

Em suma, é bem aceito que o fenômeno autoimune é desencadeado por uma falha geral nos mecanismos envolvidos com a manutenção da tolerância imunológica. Porém, ainda não está claro se os estados fisiológicos de tolerância dependem da ausência de células auto-reativas ou da supressão ativa por células supressoras antígeno-específicas (Sinha et al., 1990). A tendência pronunciada para exacerbação espontânea e remissão da AR nos sugere que haja um balanço entre fatores regulatórios positivos e negativos (Noack & Miossec, 2014). Dois tipos de linfócitos T $CD4^+$ têm sido associados a este balanço da resposta imune na AR: os linfócitos Th17 (auxiliadores, pró inflamatórios), mencionados anteriormente, cuja ativação e migração para o compartimento articular são fundamentais para os danos teciduais articulares, e os linfócitos “T reguladores” (Tregs, supressores), responsáveis por modular negativamente a resposta imune pró-inflamatória da AR (Boissier et al., 2009; Noack & Miossec, 2014).

1.3. Papel das células Tregs na AR

As células T reguladoras (Tregs) consistem em uma sub-população de células $CD4^+$ capaz de controlar o processo inflamatório além de possuir um papel essencial na

manutenção da tolerância imunológica, evitando assim o desencadeamento de desordens autoimunes, como a AR (Cooles et al., 2013). As células Tregs são divididas em dois grupos distintos, as células Tregs naturais (nTregs) e células Tregs induzidas na periferia. As células nTregs constituem uma população celular derivada do timo (Suri-Payer et al., 1998), que necessitam da ativação via TCR para se tornarem supressoras (Thornton & Shevach, 2000). Uma vez ativadas, suas funções supressoras são dependentes do contato célula-célula e/ou de fatores solúveis como TGF-β e IL-10 e independem de antígeno (Thornton & Shevach, 2000; Levings et al., 2002), embora existam algumas evidências de regulação antígeno-específica (Nishimura et al., 2007; Tanchot et al., 2004). As citocinas que compartilham o receptor α, tais como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, são necessárias para o desenvolvimento tímico das nTregs, sendo que a IL-2 é essencial para sua sobrevivência e manutenção na periferia (Maloy & Powrie, 2005). É importante ressaltar que a IL-6 inibe o desenvolvimento de Tregs em detrimento de Th17 (Kleinschek et al., 2007). Com relação as Tregs induzidas, essas células consistem em células Tregs diferenciadas na periferia à partir de células $CD4^+$ *naives*, apresentando funções e mecanismos supressores similares às nTregs (Curotto de Lafaille et al., 2004). Para que ocorra a diferenciação de Tregs induzidas é necessário a presença de mediadores no microambiente, principalmente o TGF-β, que norteia o processo de diferenciação (Lu et al., 2010). Além disso, durante este processo é demonstrado que a presença de IL-2 e estimulação do TCR também possuem um papel essencial (Zheng & Rudensky, 2007). Vale destacar que tanto células nTreg quanto Tregs induzidas na periferia compartilham da expressão de um fator de transcrição que confere suas funções reguladoras, o qual será discutido em detalhes mais adiante.

Outros subtipos de células com função reguladora também diferenciam-se a partir de células T convencionais e têm características fenotípicas distintas das nTregs. As Tr1 e Th3 são diferenciadas a partir de linfócitos $CD4^+$ *naives* e dependem de IL-10 e TGF-β, respectivamente (Mills, 2004). As nTregs também podem exercer suas atividades supressoras de modo indireto (Mills, 2004), induzindo a diferenciação de células Tregs

específicas a um antígeno. Como a presença de TGF-β e IL-10 é comum nas populações de Tregs, a caracterização de marcadores fenotípicos é a ferramenta mais apropriada para distinguir tais populações.

Várias moléculas de superfície tais como CD103, CD62L, $CD127^{low}$, CD45RO e $CD45RB^{low}$ são utilizadas para caracterizar as células Tregs (Vignali et al., 2008). A molécula CTLA-4 é expressa em todas as sub-populações de Tregs e sua interação com CD80 ou CD86 resulta na indução de atividade supressora. De fato, a população de células $CD4^{+}CD25^{+}CTLA\text{-}4^{+}$ apresenta forte atividade reguladora *in vitro* e o bloqueio de CTLA-4 reduz sua atividade (Birebent et al., 2004; Tang & Bluestone, 2008; Tang et al., 2004; Sakaguchi et al., 2008; Takahashi et al., 2000). Quando ocorre a interação CTLA-4 com CD80 e/ou CD86 em células dendríticas (DC) há a ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), secreção de imunossupressores, bloqueio da resposta proliferativa e inibição da produção de citocinas por células T efetoras (Sakaguchi et al., 2008; Vignali et al., 2008). Outra molécula presente na superfície das Tregs é o receptor induzido por glicocorticóide (GITR) da família do TNFR, que regula a produção de citocinas e a proliferação celular (Ronchetti et al., 2002), sendo que seu bloqueio compromete a função reguladora das Tregs (Shimizu et al., 2002).

Apesar de todos os marcadores descritos anteriormente, a função supressora das células Tregs é descrita por ser orquestrada pela expressão do gene FoxP3, o qual codifica um fator de transcrição pertencente à família FOX ("forkhead box"), necessário para a diferenciação de células Tregs bem como para modular a expressão de outros genes que codificam moléculas e mediadores imunossupressores (Coffer & Burgering, 2004; Rudensky, 2011). A expressão de FoxP3 não se restringe apenas às nTreg (Josefowicz & Rudensky, 2009), visto que células $TCD4^{+}CD25^{-}$, na presença de TGF-β, também podem expressar FoxP3, promovendo a diferenciação em Tregs induzidas na periferia e com função similar às nTregs. No entanto, a expressão de FoxP3 em células $TCD4^{+}CD25^{-}$ é cerca de 100 vezes menor que em nTregs (Hori et al., 2003; Fontenot et al., 2003). Desta

maneira, pelo fato de ambas as populações de Tregs expressarem o fator de transcrição FoxP3, estudos descrevem outros marcadores capazes de diferenciar Tregs naturais e induzidas na periferia. Assim, Thornton et al. mostraram que *Helios*, um fator de transcrição membro da família I*karos*, é um potencial marcador para células nTregs (Helios^{+}). Ainda, Yadav et al. descreveram também a presença na superfície de neuropilina-1 (Nrp-1) como um marcador importante para distinguir células nTregs (Nrp-1^{+}) e Tregs induzidas na perfiferia (Nrp-1^{-}).

Devido ao papel relevante das células Tregs em promover a indução e manutenção de tolerância, a manipulação das células Tregs tem obtido grande destaque como um possível caminho para o desenvolvimento de novos tratamentos para a AR (Esensten et al., 2009). Dentro deste contexto, Kelchtermans et al. purificaram células Tregs, expandiram *in vitro,* e as injetaram em animais DBA/1J imunizados com colágeno tipo II. Desse modo, os autores demonstraram que a transferência de Tregs em animais DBA1/J preveniu o desenvolvimento de artrite induzida por colágeno (CIA). Em relação aos pacientes com AR, alguns trabalhos demonstraram que células Tregs de pacientes com AR com doença em atividade apresentam um comprometimento na sua capacidade em suprimir a proliferação de células T efetoras (Teff) *in vitro* (Nadkarni et al., 2007; Nie et al., 2013; Cribbs et al., 2014). Por exemplo, Nie et al. demonstraram que os altos níveis de TNF-α circulantes no compartimento articular e no sangue de pacientes com AR ativa são responsáveis por induzir um comprometimento na capacidade supressora de células Tregs, visto que o TNF-α induz uma defosforilação de FoxP3, causada por um aumento da expressão da enzima fosfatase PP1 induzida pelo TNF-α. De modo interessante, a defosforilação de FoxP3 é descrita na literatura por estar associada com uma redução da atividade transcricional do FoxP3 e, consequentemente, da função supressora destas células (Nie et al., 2013).

Além do comprometimento funcional das Tregs, estudos mostram que existe um desbalanço em termos quantitativos nos níveis de Tregs circulantes em pacientes com AR comparados com indivíduos saudáveis (Brusko et al., 2008). Este fato contribui para uma

polarização da resposta inflamatória tornando-a crônica e ainda mais exacerbada, como ocorre na AR. Ainda, ressalta-se que a transferência adotiva de células Tregs falha em curar doenças autoimunes bem estabelecidas, indicando que dentro de certas condições inflamatórias crônicas, as células Tregs são incapazes de exercer sua função. Logo, embora ainda pouco seja conhecido sobre os mecanismos envolvidos com o comprometimento da capacidade supressora das Tregs, certamente este é um dos fatores preponderantes na patogênese da AR. Assim, estratégias farmacológicas que reforcem e/ou restabeleçam a função supressora e/ou indução de Tregs podem representar um avanço no arsenal terapêutico disponível para o tratamento da doença.

1.4. Estratégias terapêuticas para AR e utilização do MTX como terapia padrão

As estratégias farmacológicas convencionais para o tratamento da AR utilizam combinações de anti-inflamatórios não estereoidais (NSAIDs), analgésicos, glicocorticóides e de drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs), como o Metotrexato (MTX). Recentemente, a implementação de inibidores e/ou bloqueadores da atuação de citocinas, como TNF-α e IL-6, e de outras moléculas envolvidas na patogênese da AR trouxe novas opções e perspectivas para o tratamento da doença (Curtis & Singh, 2011). Estes fármacos são denominados de agentes biológicos. Neste sentido, há uma variedade de agentes biológicos aprovados para uso clínico e muitos ainda estão em testes em ensaios em fase II e III.

Os inibidores de TNF compreendem os agentes biológicos mais utilizados na prática clinica atualmente (van Schouwenburg et al., 2013). O primeiro a ser introduzido para tratamento da AR foi o infliximabe, seguido posteriormente pelo etanercepte, adalimumabe e certolizumabe. O infliximabe, adalimumabe e certolizumabe são anticorpos monoclonais contra o TNF-α enquanto que o etanercepte é uma construção recombinante de dois receptores de TNF (receptores p75) ligados a porção Fc de uma IgG1, dando origem a uma molécula “imunoglobulina-like”. Todos esses inibidores de TNF foram aprovados para uso

em pacientes com AR na década passada com resultados significativos na prevenção dos danos articulares e atenuação da resposta inflamatória da AR (Lipsky et al., 2000; Genovese et al., 2002; Navarro-Sarabia et al., 2006; Smolen et al., 2009). Além disso, a administração dos inibidores de TNF também é aprovada em vários países para tratamento de outras doenças, tais como espondilite anquilosante, artrite psoriásica e doença de Crohn (Coates et al., 2010; Mease, 2005; Peyrin-Biroulet et al., 2013).

Entretanto, sabendo que a resposta aos inibidores de TNF é inadequada em aproximadamente 40% dos indivíduos com AR, outros agentes biológicos foram implementados como terapia alternativa ou adjuvante aos inibidores de TNF (Bansard et al., 2009). Dois deles foram desenvolvidos e testados há cerca de 10 anos, o rituximabe e o abatacepte (Cohen et al., 2006; Kremer et al., 2005). O rituximabe é um anticorpo monoclonal contra um antígeno, no caso o CD20, molécula presente na superfície de linfócitos B e pré-B, onde exerce seu efeito causando lise celular por mecanismos dependentes da ativação do complemento e de citoxicidade celular mediada por anticorpos (Edwards et al., 2004). Com relação ao abatacepte, este biológico consiste em uma proteína recombinante composta pelo domínio extracelular humano de CTLA-4 ligado a porção Fc de uma IgG1 humana. A funcionalidade e o efeito imunossupressor do abatacepte são decorrentes da competição pela ligação entre o CD28 das células T e o CD80/86 presentes nas células apresentadoras de antígeno (APC), um importante sinal co-estimulatório para a ativação de linfócitos T (Kremer et al., 2005). O abatacepte é indicado em pacientes que tiveram uma resposta inadequada ao MTX e pelo menos um dos inibidores de TNF (Kremer et al., 2006).

Adicionalmente, outros agentes biológicos foram introduzidos mais recentemente para o tratamento da AR, dentre eles se destacam o tocilizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado contra o receptor de IL-6 (Shima et al., 2011), e o tofacitinibe, um inibidor da sinalização mediada pelas proteínas JAK (*janus* quinase) (Lee et al., 2014; Curtis et al., 2015). Os levantamentos de dados sobre a eficácia e segurança destes agentes biológicos

em pacientes com AR apontam para uma eficácia terapêutica satisfatória, tornando-os novas opções viáveis de tratamento, principalmente para pacientes refratários à uma variedade de terapias convencionais, embora estes pacientes sejam mais susceptíveis à infecções bacterianas e virais (Burmester et al., 2013).

Apesar das várias opções terapêuticas mencionadas anteriormente para a AR, devido sua eficácia satisfatória por longos períodos de tratamento, baixo custo e efeitos colaterais moderados, a utilização do Metotrexato (MTX) em baixas doses (10-20 mg/semana) ainda é atualmente a terapia de primeira linha e padrão ouro para o tratamento da AR em qualquer lugar do mundo, principalmente para os pacientes recém-diagnosticados (Curtis & Singh, 2011; Kumar & Banik, 2013; Singh et al., 2016). Brevemente, o MTX é um clássico antagonista do ácido fólico, cujo mecanismo de ação foi descrito primeiramente por estar associado com a inibição da via relacionada com a síntese *de novo* de purinas, formação de poliaminas, transmetiliação de DNA, RNA, fosfolípideos e de proteínas (Seitz, 1999). Inicialmente, em meados da década de 50, a administração de MTX em humanos foi primeiramente empregada para o combate de neoplasias devido aos seus efeitos anti-proliferativos (Black & Livingston, 1990). Porém, há cerca de 30 anos, estudos mostraram uma significativa eficácia terapêutica do MTX em baixas doses para o tratamento de desordens inflamatórias crônicas, como a AR (Weinblatt et al., 1985). Os mecanismos que participam do efeito anti-inflamatório do MTX na atenuação dos sintomas clínicos e parâmetros imunológicos na AR ainda não são totalmente esclarecidos, porém várias evidências sugerem que o MTX está envolvido na indução de apoptose em células inflamatórias, redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, promoção de alterações intracelulares nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e, por fim, e de nosso interesse, na manutenção de elevados níveis de adenosina (ADO) no compartimento extracelular (Cronstein, 1997, 2005).

De fato, diversos trabalhos demonstram que a eficácia terapêutica observada com a administração de MTX é decorrente de sua capacidade em manter e aumentar os níveis de

ADO extracelular (Cronstein et al., 1993; Morabito et al., 1998). Para que isto ocorra, no compartimento intracelular o fármaco promove um acúmulo de AICAR (ribonucleotídeo aminoimidazocarboxamida), composto envolvido na biossíntese *de novo* de purinas, devido à inibição da enzima AICAR transformilase. Por sua vez, este acúmulo de AICAR acarreta também em um acúmulo no compartimento intracelular de seu metabolito defosforilado, denominado AICAR-secundário (*AICA-side*), responsável pela inibição direta da adenosina deaminase (ADA), enzima que converte ADO em inosina, ocasionando então, um aumento dos níveis de ADO no citoplasma. A ADO pode ser transportada para o compartimento extracelular através de um transportador de nucleosídeos conhecido como ENT1 (*Equilibrative nucleoside transporter 1*) e desencadear seu efeito imunomodulador ao interagir prinicipalmente com os receptores A2a e A2b, membros da família de receptores acoplados a proteína G, expressos na membrana dos leucócitos (Haskó et al., 2008; Cronstein, 2005). Em adição, em vez de ser transportada para o compartimento extracelular, a ADO também pode sofrer ação da adenosina kinase (AK), a qual a refosforila e a converte em ATP, que por sua vez, também pode ser transportado para o compartimento extracelular. No espaço extracelular, o ATP sofre ação de duas ectonucleotidases, a ATP difosfoidrolase (CD39) que hidrolisa o ATP em ADP e AMP e posteriormente o AMP é degradado pela 5'nucleotidase (CD73) gerando ADO (Cronstein, 2005) (Figura 1).

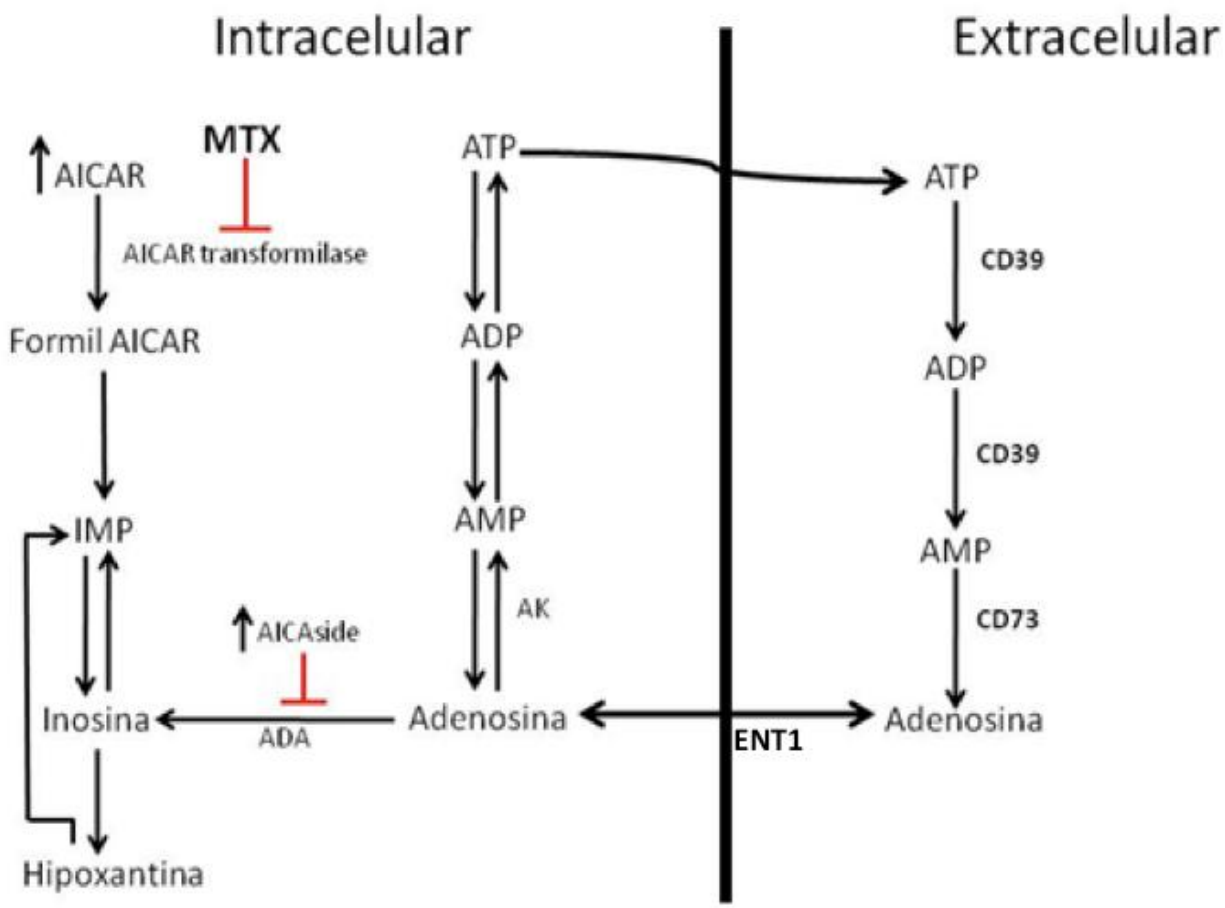


Figura 1 – Mecanismo de ação do MTX na manutenção dos níveis elevados de ADO extracelular. AICAR, 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleosídeo; IMP, monofosfato de inosina; AMPDA, AMP deaminase; ADA, adenosina deaminase; AICAside, aminoimidazol carboxamidoribonucleosídeo; AK, adenosina kinase; CD39, ATP difosfoidrolase; CD73, ecto-5´nucleotidase; ENT1, transportador de nucleosídeo equilibrativo 1. Adaptado de Cronstein, 2005.

Uma vez no compartimento extracelular, a ADO exerce suas atividades atuando principalmente nos leucócitos do infiltrado inflamatório e/ou em tecidos injuriados. Para isso, é necessário que a ADO ative seus receptores acoplados a proteína G, A1, A2a, A2b e A3, que por sua vez, são responsáveis por mediar os efeitos anti-inflamatórios da ADO (Hasko et al., 2008). A ADO pode proteger o endotélio dos polimorfonucleares por inibir a expressão de β2 integrinas (Thiel et al., 1996), adesão (Cronstein et al., 1990), produção dos radicais de oxigênio (Cronstein et al., 1985), degranulação (Richter, 1992) e produção de TNF-α (Haskó et al., 2000). Trabalhos demonstram que os linfócitos T expressam o

receptor A2a (A2aR), cuja ativação é capaz de bloquear a proliferação celular, liberação de grânulos citotóxicos, expressão de FasL e a secreção de citocinas, principalmente IFN-γ (Koshiba et al., 1997; Naganuma et al., 2006; Lappas et al., 2006). A interação entre ADO com o receptor A2a suprime e atenua doenças inflamatórias intestinais e artrite (Sullivan, 2003; Mazzon et al., 2011; Flögel et al., 2012). A administração do agonista suprime a resposta inflamatória por inibir a proliferação de células CD45RBhigh e a liberação de citocinas no tecido inflamado, atenuando o quadro clínico e a gravidade destas doenças (Naganuma et al., 2006; Deaglio et al., 2007). De maneira geral, os efeitos anti-inflamatórios mediados pela ADO são mais descritos por ativar os receptores A2a e A2b, mas também existem estudos que mostram que a ativação dos receptores A1 e A3 resulta em efeitos anti-inflamatórios (Chen et al., 2013), visto que é bem estabelecido que a administração de agonistas destes receptores apresenta papel um protetor em isquemia-reperfusão, artrite reumatóide e psoríase (Sun et al., 2005; Silverman et al., 2008; Fishman et al., 2012).

As demonstrações de que o efeito anti-inflamatório mediado pelo MTX é dependente de ADO e da via de sinalização deflagrada por este mediador são bem evidentes na literatura, visto que o bloqueio do receptor A2a através da administração de antagonistas (teofilina e cafeína) ou a utilização de animais geneticamente deficientes para este receptor revertem o efeito anti-inflamatório mediado pelo MTX em diversos modelos experimentais de inflamação (Cronstein et al., 1993; Montesinos et al., 2003, 2006, 2007; Benito-Garcia et al., 2006). Além disso, estudos sugerem que há um envolvimento da atividade das ectonucleotidases CD39 e CD73 na geração de ADO com a eficácia terapêutica do MTX. De fato, Montesinos et al demonstraram que as ectonucleotidases são essenciais para a ação do MTX, visto que em camundongos deficientes destas ectoenzimas o MTX perde seus efeitos anti-inflamatórios em modelo de inflamação induzida por carragenina.

Embora uma parte dos pacientes com AR seja responsiva ao tratamento com MTX, cerca de 30-40% dos indivíduos não respondem ao tratamento (Bansard et al., 2009). Esse fato faz com que outras medidas terapêuticas sejam aplicadas para o controle da AR, como

a administração de agentes biológicos, que consiste um tratamento de custos mais elevados para os sistema de saúde (Fan & Leong, 2007). Os mecanismos de refratariedade ao tratamento com MTX ainda não estão totalmente esclarecidos e vários esforços ainda estão sendo empregados para a identificação de um possível biomarcador apto em predizer a resposta terapêutica do MTX na AR. Alguns achados também sustentam o fato de que níveis reduzidos de anticorpos anti-CCP estão relacionados com uma melhor resposta clínica a terapia com MTX (Braun-Moscovici et al., 2006; Bobbio-Pallavicini et al., 2007). Porém, no momento, ainda não há biomarcadores descritos para serem utilizados na prática clínica como preditivos de resposta ao MTX. Desta maneira, atualmente o método mais rápido e eficaz de determinar a resposta terapêutica de um individuo ao MTX é através apenas de observações clínicas, sem testes laboratoriais disponíveis, em que o individuo deve ser tratado com MTX por pelo menos três meses na dose efetiva mínima de 15 mg/semana (De Rotte et al., 2013; Plant et al., 2014). Se por acaso a resposta do individuo for inadequada, isto é, se mesmo após o tratamento com MTX o individuo apresentou doença em atividade, certamente houve uma progressão dos danos articulares, que são irreversíveis e favorecem a um quadro de incapacidade locomotora. Portanto, a identificação de biomarcadores preditivos de resposta clínica pode proporcionar grandes benefícios tanto para a qualidade de vida dos pacientes com AR, devido ao fato de se evitar uma exposição desnecessária do paciente à droga bem como facilitar o acesso a tratamentos mais efetivos, quanto para o sistema de saúde, devido a uma diminuição considerável dos custos com medicamentos e serviços hospitalares oferecidos durante o tratamento.

1.5. Expressão de ectonucleotidases em células Tregs e resistência ao MTX

Estudos demonstram que células Tregs expressam altos níveis de CD39 e CD73 em sua superfície e que estes marcadores estão funcionalmente ativos e possuem ação como indutores da ADO extracelular (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007). A alta expressão de CD39 e CD73 observada em Tregs é descrita por ser um dos mecanismos

relevantes de supressão associados com a função supressora destas células (Deaglio et al., 2007; Vignali et al., 2008). De fato, Tregs provenientes de camundongos geneticamente deficientes de CD39 apresentam uma perda da sua atividade supressora *in vitro* e falham para bloquear a rejeição do alo-enxerto *in vivo* (Deaglio et al., 2007). Nesse contexto, levando em consideração também que o efeito anti-inflamatório do MTX está envolvido com a atividade das ectonucleotidases (Montesinos et al., 2007), nosso grupo demonstrou em meados de 2012 que pacientes não respondedores ao MTX (UR-MTX) apresentam uma redução significativa da expressão de CD39, determinada por média de intensidade de fluorescência (MFI), em células Tregs circulantes (Figura 2A, 2B) (Peres, 2012 - dissertação de mestrado). Além disso, esta expressão reduzida de CD39 em Tregs de pacientes UR-MTX culmina em um comprometimento da capacidade destas células incubadas com ADP (1 mM) em gerar ADO extracelular quantificada no sobrenadante de cultura celular (Figura 3) (Peres, 2012 - dissertação de mestrado).

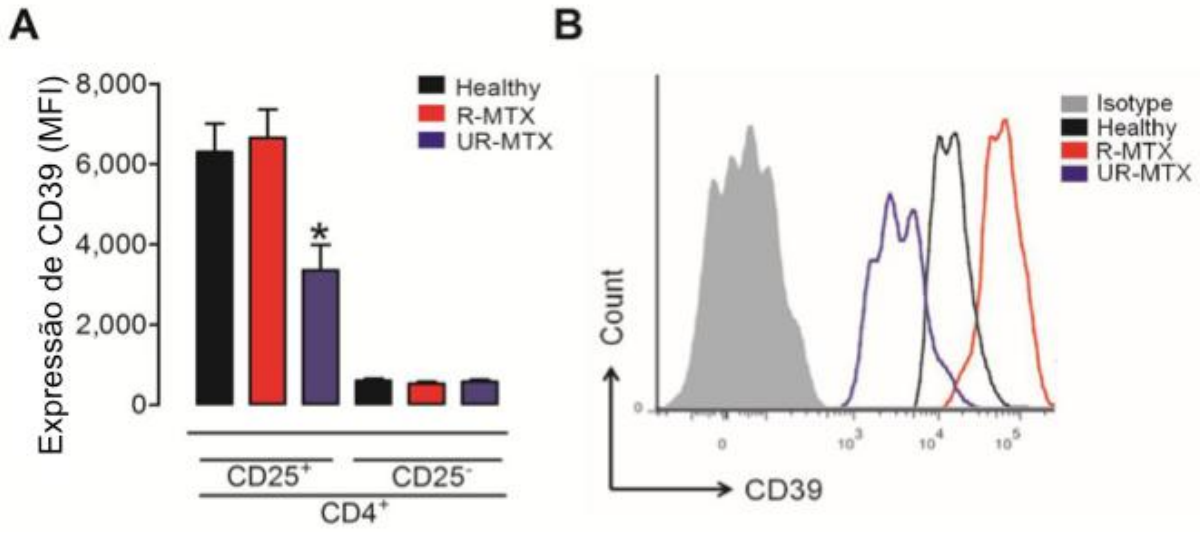


Figura 2- Expressão de CD39 em células TCD4$^+$ de pacientes com AR. (A) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD39 em células CD4$^+$CD25$^+$ e CD4$^+$CD25$^-$ de indivíduos saudáveis (healthy) (n=10), pacientes R-MTX (n = 13) e UR-MTX (n = 20). (B) Histograma representativo da expressão de CD39 em células CD4$^+$CD25$^+$ de indivíduos saudáveis (healthy), pacientes R-MTX e UR-MTX. Dados representam a média ± DPM. *P < 0.05.

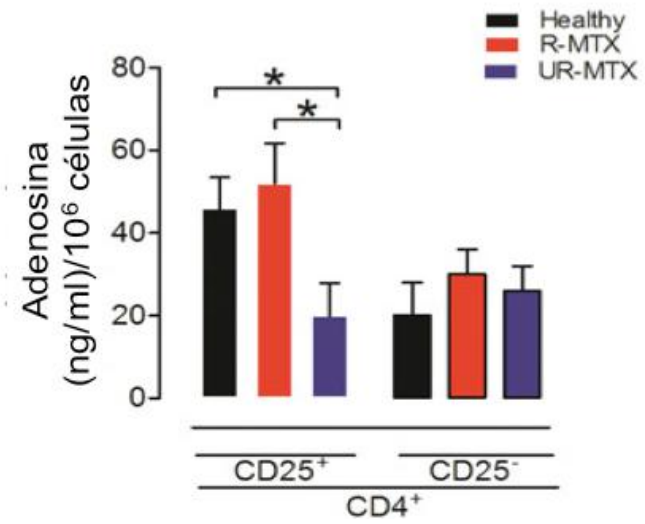


Figura 3- Produção de adenosina extracelular por células $CD4^+$ de pacientes com AR. Concentração de adenosina no sobrenadante de células $CD4^+CD25^+$ e $CD4^+CD25^-$ incubadas com ADP (1 mM) por 1h de indivíduos saudáveis (healthy, n = 5), pacientes R-MTX (n = 6) e UR-MTX (n = 6). Dados representam a média ± DPM. *P < 0.05.

Simultaneamente, foi observado que pacientes respondedores ao MTX (R-MTX) apresentam um aumento na frequência de células circulantes Treg $CD4^+CD25^+$ e Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ expressando a ectoenzima CD39 (Figuras 4A e 4B, respectivamente), quando comparados com pacientes UR-MTX e indivíduos saudáveis (healthy). Entretanto, não houve diferença na frequência de células expressando CD39 dentro da população de linfócitos T efetores ($CD4^+CD25^-$) (Figura 4C).

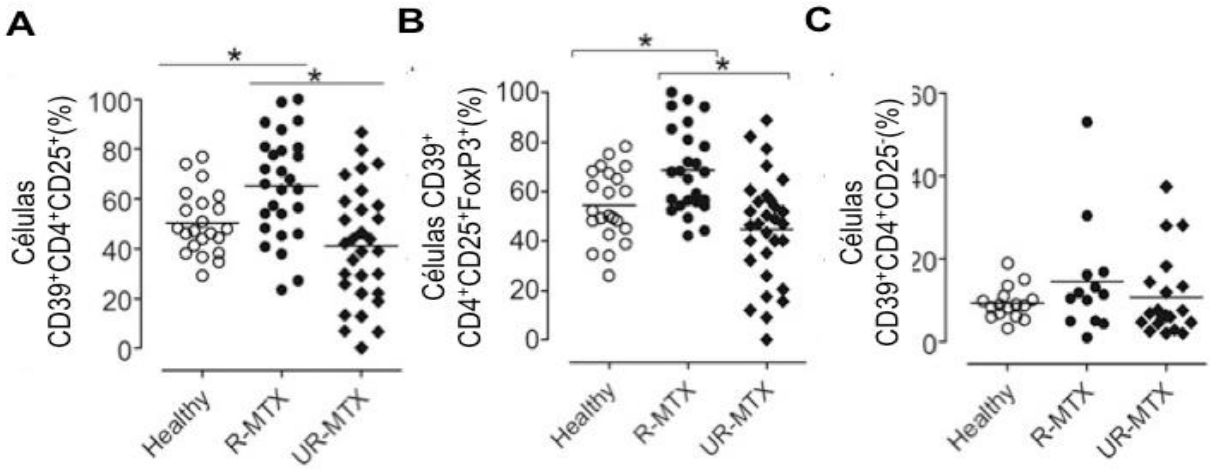


Figura 4- Frequência de células Treg expressando CD39 em pacientes com AR. (A - C) Frequência de células $CD4^+CD25^+$(A), $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (B) e $CD4^+CD25^-$ (C) expressando CD39 em indivíduos saudáveis (*healthy*, ○, n = 22), pacientes R-MTX (●, n = 27) e UR-MTX (♦, n = 30). Dados representam a média ± DPM. *P < 0.05.

Portanto, com base nestas essas informações prévias, é necessário esclarecer se o aumento identificado anteriormente na população de Tregs expressando CD39 em pacientes R-MTX é uma consequência do tratamento com MTX ou alguma característica intrínseca destes pacientes com AR. Ainda, a questão mais relevante é se a expressão reduzida de CD39 observada em células Tregs circulantes de pacientes UR-MTX é uma característica biológica presente neste grupo de pacientes, tornando-os não responsivos ao tratamento com MTX. Deste modo, é necessário realizar um estudo longitudinal com pacientes AR avaliando a expressão de CD39 em Tregs circulantes. Para isso, pacientes com AR recém-diagnosticados e submetidos a nenhum tratamento prévio devem ser avaliados para a determinação da expressão de CD39 em células Tregs circulantes antes e após o tratamento com MTX. A realização de um estudo nesse âmbito poderá trazer grandes perspectivas para a identificação de um possível biomarcador apto a predizer a resposta terapêutica ao MTX e esclarecer em detalhes os mecanismos imunológicos envolvidos com a resistência ao MTX.

Adicionalmente, uma das questões mais intrigantes geradas a partir destes achados seria o motivo pelo qual pacientes UR-MTX apresentam uma redução da expressão de CD39 em células Tregs, e consequentemente, uma deficiência na capacidade de produção de ADO extracelular, responsável por mediar os efeitos anti-inflamatórios do MTX. Para isso, primeiramente é necessário determinar os mecanismos moleculares envolvidos com a indução/regulação da expressão de CD39 em células Tregs. Neste contexto, Liao et al. demonstraram que a ativação do fator de transcrição CREB (*cAMP response element-binding*), o qual possui um papel relevante na proliferação, diferenciação e sobrevivência de células do sistema imune (Shaywitz & Greenberg, 1999; Mayr & Montminy, 2001; Wen et al., 2010), induz a transcrição do gene que codifica o CD39 em macrófagos. Especificamente, foi observado que a fosforilação de CREB pela proteina quinase A (PKA) induz o aumento do RNAm de CD39 neste tipo celular. Assim, é importante determinar se mecanismo semelhante participa da expressão de CD39 nas

células Tregs. Neste sentido, o TGF-β, uma citocina crucial para o processo de diferenciação e manutenção das células Tregs (Hori et al., 2003), é capaz de induzir a ativação de CREB em células Tregs (Kamiya et al., 2007; Kochetkova et al., 2011).

A ativação da cascata de sinalização de TGF-β é iniciada quando o TGF-β interage com os receptores do tipo II (TGFBRII) e tipo I (TGFBRI), membros da família dos receptores serina/treonina quinase, formando um complexo hetero-tetramérico com o ligante em que os receptores estão na forma dimérica (Derynck & Zhang, 2003). Na ausência do ligante, tanto TGFBRII quanto TGFBRI permanecem como homodímeros na superfície celular (Huang & Chen, 2012). Após a formação do complexo hetero-tetramérico com o TGF-β, ocorre um rearranjo dos receptores de modo que os domínios citoplasmáticos quinase são reorganizados para favorecer um mecanismo de transfosforilação. De fato, o TGFBRII fosforila resíduos de serina da porção citoplasmática do TGFBRI, culminando na sua ativação e posterior fosforilação de seus alvos intracelulares denominados de SMADs (*Mothers against decapentaplegic homolog*) (Massagué, 2000; Derynck & Zhang, 2003).

As SMADs são transdutores de sinais intracelulares que ao serem ativados translocam para o núcleo, onde induzem diretamente ou interagindo com outros fatores de transcrição, como CREB, a transcrição de seus genes alvo (Warner et al., 2003; Schmierer & Hill, 2007; Yan et al., 2009). Para isso, ocorre a fosforilação via receptor TGFBRI de SMAD2 e SMAD3, classificadas como R-SMADs (SMADs reguladas pelo receptor), e que formam posteriormente um complexo com SMAD4, pertencente ao grupo das co-SMADs (SMADs comuns) (Attisano & Wrana, 2002). Assim, este complexo (SMAD2/SMAD3/SMAD4) é o responsável por entrar no núcleo e regular a transcrição dos genes alvo (Attisano & Wrana, 2002; Yan et al., 2009) (Figura 5). Ainda, tanto TGFBRI quanto as SMADs podem ativar PKA, e que por sua vez, também pode fosforilar e ativar CREB (Moustakas & Heldin, 2005; Warner et al., 2003; Yang et al., 2013; Kramer et al., 1991). Por outro lado, outras quinases também podem fosforilar e ativar CREB, como p38, Erk e PI3K/AKT (Steven & Seliger, 2015; Xing et al., 1996; Peltier et al., 2007).

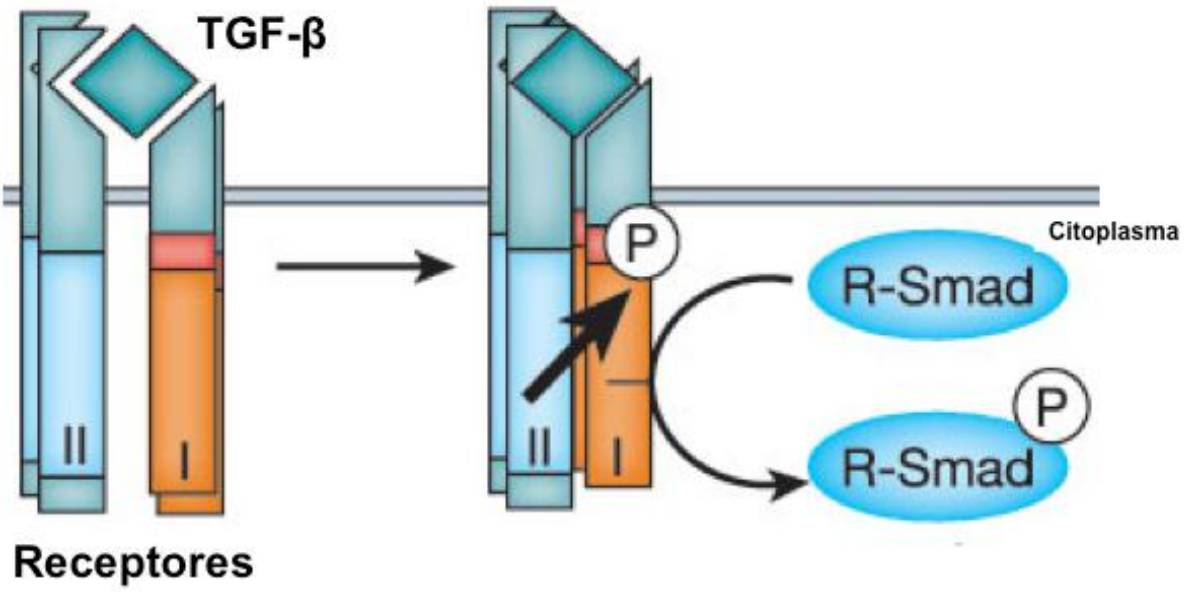


Figura 5- Representação esquemática da ativação das cascata de sinalização mediada pela interação de TGF-β e seus receptores TGFBRII e TGFBRI. P, resíduo de fosforilação; R-SMAD, SMAD regulada pelo receptor (ex: SMAD2). Adaptado de Derynck & Zhang, 2003.

Além da cascata de sinalização canônica de ativação de SMADs, é bem descrito na literatura que outras moléculas *downstream* podem ser ativadas pela estimulação com TGF-β (Zhang, 2009). De fato, é demonstrado que os receptores TGFBRI ativados por TGF-β são capazes também de ativar direta ou indiretamente Erk, p38, GTPases e PI3K/AKT (Lee et al., 2007; Engel et al., 1999; Bhowmick et al., 2001; Bakin et al., 2000). Estas moléculas ativadas por TGF-β e a posterior ativação da cascata de sinalização decorrente da ativação destas moléculas compreendem as vias não canônicas da sinalização de TGF-β, sendo que a combinação da ativação tanto das vias dependentes quanto independentes de SMADs norteiam a resposta celular final frente à estimulação com TGF-β (Zhang, 2009). Assim, ambas as vias (canônica e não-canônica) podem induzir a ativação de CREB e também possivelmente podem ter uma papel relevante na indução de CD39 por TGF-β.

De modo complementar ao exposto, Chalmin et al. demonstraram que o TGF-β pode aumentar a expressão do CD39 em células T pela inibição do fator de transcrição GFI-1, o

qual por sua vez regula negativamente a expressão de CD39. O GFI-1 age como um fator repressor, inibindo diretamente a transcrição do CD39 por se ligar aos promotores do gene codificador da molécula. Ainda, é descrito também que outras proteínas podem regular a sinalização mediada por TGF-β, como é o caso das I-SMADs (SMADs inibitórias), tais como SMAD7, que compreendem um grupo de SMADs capazes de inibir a atividade do complexo R-SMAD/co-SMAD de promover a transcrição dos seus alvos moleculares no núcleo (Yan et al., 2009).

Em conjunto, estas informações sugerem que a sinalização de TGF-β pode estar envolvida na indução e regulação da expressão do CD39 em células Tregs. Assim, é plausível que o TGF-β induz a expressão da CD39 em células Tregs por possivelmente ativar as seguintes plataformas moleculares: TGFBRII/TGFBRI/PKA/CREB ou TGFBRII/TGFBRI/SMAD2/CREB. Ainda, é possível que pacientes UR-MTX apresentam alterações quanto à expressão e/ou ativação das moléculas participantes da cascata de sinalização mediada por TGF-β, as quais estariam associadas com a redução da expressão de CD39 em Tregs circulantes.

1.6. Hipóteses do estudo

Em resumo, baseado nas informações descritas anteriormente, o presente estudo possui as seguintes hipóteses:

1) Nossa primeira hipótese é que os níveis de expressão de CD39 em células Tregs possam ser um biomarcador não-invasivo apto em predizer a eficácia terapêutica do MTX na AR;
2) Nossa segunda hipótese é que células Tregs de pacientes UR-MTX apresentam função supressora comprometida;
3) Nossa terceira hipótese é que a estimulação com TGF-β ativa as plataformas moleculares TGFBRII/TGFBRI/SMAD2/CREB ou TGFBRII/TGFBRI/PKA/CREB e induza a expressão de CD39 em células Tregs;

4) Por fim, nossa última hipótese é que existem alterações quanto à expressão e/ou ativação de moléculas relacionadas com a sinalização de TGF-β em células Tregs de pacientes UR-MTX, as quais estão associadas com a expressão reduzida de CD39 nestas células.

2- OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo investigar se a expressão de CD39 em células Tregs circulantes podem ser um biomarcador apto em predizer a resposta terapêutica ao MTX na AR. Adicionalmente, propomos identificar a razão pela qual pacientes UR-MTX apresentam uma redução da expressão de CD39 em células Tregs, investigando a participação da cascata de sinalização mediada por TGF-β na indução da expressão de CD39.

Objetivos Específicos

1. Investigar os efeitos do tratamento com MTX na frequência e número absoluto de células $CD39^{+}$Tregs circulantes em pacientes com AR;

2. Determinar a expressão de CD39 em células Tregs circulantes antes e após ao tratamento com MTX em pacientes com AR (possível aplicabilidade como biomarcador apto em predizer a resposta terapêutica ao MTX);

3. Avaliar a capacidade supressora de células Tregs circulantes oriundas de pacientes R-MTX e UR-MTX;

4. Investigar o papel do TGF-β na indução da expressão de CD39 em células Tregs isoladas de indivíduos saudáveis, Tregs diferenciadas *in vitro* (iTreg) e em outros tipos de leucócitos;

5. Identificar a cascata de sinalização deflagrada por TGF-β que possivelmente está associada com a indução da expressão de CD39 em células Tregs;

6. Determinar possíveis alterações em células Tregs circulantes de pacientes UR-MTX relacionadas com a expressão e/ou ativação das moléculas identificadas por participar da cascata de sinalização que induz a expressão de CD39;

7. Determinar o papel da atividade do CD39 na diferenciação de células Tregs.

3- METODOLOGIA

3.1. Reagentes

Os seguintes reagentes foram utilizados: agonista do receptor A2a, NECA (5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine, Tocris Bioscience); inibidor de CD39 (ARL67156, Sigma-Aldrich); inibidor de CREB (Naphthol AS-E phosphate, Sigma-Aldrich); inibidor de PKA (H89, Sigma-Aldrich); inibidor de TGFBRI (SB431542, Sigma-Aldrich); anti-CD3 e anti-CD28 (BD Biosciences); albumina bovina sérica (BSA) (Sigma-Aldrich); RPMI 1640 (Sigma-Aldrich); inibidor de p38 (SB203580, Calbiochem) e inibidor de AKT (AKT inhibitor IV, Calbiochem).

3.2. Pacientes e indivíduos saudáveis

No presente estudo, o sangue periférico (16 ml) foi coletado por punção venosa de pacientes (n = 88) diagnosticados com AR, classificados de acordo com os critérios do estabelecidos em 2010 pelo Colégio Americano de Reumatologia e Liga Européia contra o reumatismo (Aletaha et al., 2010), com tempo de doença inferior a dois anos. Os pacientes foram provenientes do ambulatório de doenças reumáticas da Disciplina de Reumatologia do Hospital das Clínicas-FMRP-USP e foram divididos em dois grupos de acordo com a resposta terapêutica ao MTX, classificados como respondedores (n = 50, R-MTX) ou não respondedores ao MTX (n = 38, UR-MTX). Pacientes UR-MTX foram aqueles que estavam utilizando MTX na dose mínima de 15 mg/semana por pelo menos três meses e que ainda apresentavam doença ativa. A atividade da doença foi definida neste estudo pelo índice de atividade da doença – DAS28 (*Disease Activity Score- 28 joints*). Valores do DAS28 superiores a 4.0 são definidores de doença ativa. Por outro lado, os pacientes R-MTX foram classificados como aqueles com DAS28 inferior a 3.0 e utilizando MTX por mais de três meses. Nenhuma outra medicação modificadora do curso da doença (DMCD), como leflunomida, sulfassalazina, ciclosporina e agentes biológicos (Anti-TNF e anti-CD20) será permitida o uso no momento da coleta das amostras. Os pacientes também não poderiam utilizar doses de prednisona superiores a 10 mg/dia. Todos os pacientes foram avaliados

previamente a coleta por um médico reumatologista, que se incumbiu de classificar os pacientes como R-MTX ou UR-MTX e avaliou os critérios de inclusão e exclusão do estudo. No anexo A consta o protocolo clínico para coleta de dados.

Para o estudo longitudinal, amostras do sangue periférico de pacientes recém-diagnosticados com AR foram coletadas dos mesmo paciente em dois períodos: 1ª coleta - Paciente recém-diagnosticado, sem tratamento prévio com drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs) ou agentes biológicos (ex. anti-TNF; anti-IL-6); 2ª coleta – Com pelo menos três meses de tratamento com MTX (tempo esperado para determinar a eficácia terapêutica do MTX) foi feita uma nova coleta do sangue destes pacientes, sendo que foram classificados como R-MTX (n = 15) ou UR-MTX (n = 11) de acordo com o índice de atividade da doença (DAS28) após o tratamento.

Adicionalmente, o sangue periférico de indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade foram coletadas (*healthy*, n = 30) para controle e para os experimentos que abordaram os mecanismos moleculares envolvidos com a expressão de CD39 em Tregs. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP (protocolos número: 2981/2009 e 4191/2015, anexo B). Os pacientes incluídos no estudo continuaram em seguimento no ambulatório a que pertencem e os procedimentos adotados para esta investigação clínica não interferiu, nem atrasou o tratamento dos mesmos. Estes pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Caso o paciente não possuísse condições clínicas suficientes para assinar o termo, o mesmo foi obtido a partir da autorização de seu representante legal. As características clínicas dos grupos de pacientes com AR são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas dos pacientes com AR

	Pacientes com AR			Controles (n = 30)
	R-MTX (n = 50)	UR-MTX (n = 38)	P	
Média de idade (anos)	56,0 ± 13,72	53,0 ± 16,38	NS[a]	37,6± 9,5
Mulheres (%)	88	80	NS[b]	66,7
Tabagismo (%)	30	44,7	NS[b]	23,3
Tempo de doença (meses)	30,54 ± 23,42	32,29 ± 22,52	NS[a]	NA
FR-positivo (%)	86	86,84	NS[b]	NA
ACPA-positivo (%)	90	92,1	NS[b]	NA
DAS28 (média ± DP)	2,31 ± 0,58	4,74 ± 1,32	P < 0.01[a]	NA
MTX (%)	100	100	NS[b]	NA

RF, fator reumatóide; ACPA, "anticitrullinated protein antibodies"; DAS28, disease activity score; MTX, Metotrexato; R-MTX, respondedor ao MTX; UR-MTX, não respondedor ao MTX; NA, não aplicável; DP, desvio padrão; NS, não significante; [a], 2-sample exact test; [b], Fisher's exact test

3.3. Obtenção de leucócitos do sangue periférico dos pacientes

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas de pacientes R-MTX, UR-MTX e indivíduos saudáveis. Após a coleta, o sangue foi aplicado em gradiente de Percoll (Sigma-Aldrich) e centrifugado a 650 x g por 30 min, à temperatura ambiente. A interface obtida, contendo o PBMC foi coletada e lavadas duas vezes. Após esse procedimento, o sedimento foi ressuspenso em 3 ml de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado e os leucócitos foram quantificados em câmara de Neubauer. Após este procedimento, as células foram ressuspensas em meio apropriado para a fenotipagem celular e ensaios *in vitro*.

3.4. Fenotipagem de células Tregs por citometria de fluxo

Para a caracterização das populações de células Tregs, foi utilizado os seguintes seguintes marcadores: CD4, CD25, CD39 e FoxP3. Brevemente, para a marcação dos marcadores extracelulares, um total de 1 x 10^6 células oriundas do PBMC isolados foram lavadas, ressuspensas em 100μl de PBS e incubadas com 1,5 μg de anticorpos

monoclonais específicos para os marcadores determinados acima, conjugados com FITC, PE, PE-Cy7 ou APC (BD Biosciences) por 30 minutos a 4°C. Após incubação com os anticorpos, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS, e centrifugadas a 400 x g por 10 minutos. Na marcação intracelular de FoxP3, foi utilizado o kit Human FoxP3 buffer (BD Biosciences), e posteriormente, as células foram fixadas com 1% formol diluído em PBS e adquiridas no aparelho FACSCanto II (BD Biosciences) ou FACSVerse (BD Biosciences). As análises foram feitas usando os softwares FACSdiva (BD Biosciences), FACSsuite (BD Biosciences) e Flow Jo (TreeStar, Ashland, OR, EUA).

3.5. Separação das subpopulações de células T

Células Tregs e Teff de pacientes R-MTX, UR-MTX e de indivíduos saudáveis foram isoladas a partir do PBMC utilizando o kit *$CD4^+CD25^+$ Regulatory T Cell Isolation Kit human* (cat. 130-091-301, Miltenyi Biotec) de acordo com as recomendações do fabricante. A figura 1 mostra a pureza de células Tregs isoladas do sangue periférico utilizando o kit mencionado anteriormente. Para o isolamento de células CD4 *naives* ($CD4^+CD45^+$) utilizadas nos experimentos de diferenciação de células Tregs *in vitro,* foi utilizado o kit de separação *Naive CD4+ T Cell Isolation II* (Miltenyi Biotec), de acordo com as recomendações do fabricante.

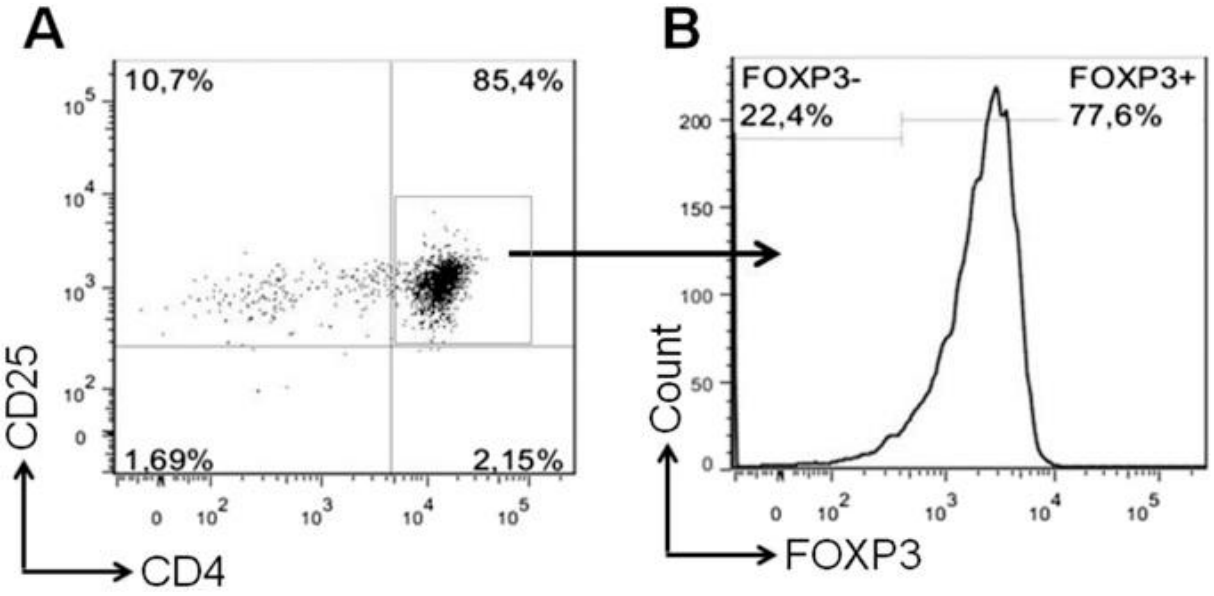


Figura 6- Pureza das células Tregs isoladas do sangue periférico. (A) Porcentagem de células $CD4^{+}CD25^{+}$ na população de linfócitos. (B) Frequência de células $FoxP3^{+}$ na população de células $CD4^{+}CD25^{+}$.

3.6. Ensaio para avaliação da capacidade supressora de células Tregs

Células Tregs foram isoladas de pacientes R-MTX, UR-MTX e indivíduos saudáveis e colocadas em co-cultura com células Teff (CD4+CD25-) em placa de 96 poços fundo em *U* (Costar). Ressalta-se que as células Teff utilizadas em todos os experimen"tos de avaliação de supressão foram obtidas sempre de um mesmo doador saudável. Brevemente, as células Teff foram marcadas com1 µM Dye Efluor 670 (eBioscience) por 15 min a 37 °C e, posteriormente, colocadas em cultura (1×10^5 células por poço) por 4 dias com células Tregs em diferentes proporções (Teff:Treg: 1:1,1:0.5, 1:0.25) na presença de anti-CD3 (3 µg/ml) solúvel e anti-CD28 (1,5 µg/ml). A proliferação de células Teff foi determinada pela diluição do marcador analisada por FACS. Os resultados foram expressos como percentagem de supressão de acordo com a seguinte fórmula: Teff only – (Treg + Teff) / Teff only] x 100.

3.7. Cultura celular

Células Tregs foram diferenciadas em placas de 96 poços fundo em U (Corning). Um total de 1 x 10^5 células CD4 *naives* ($CD4^+CD45^+$) isoladas de indivíduos saudáveis foram utilizadas por poço. As células foram incubadas por 4 dias em meio RPMI-1640 com 10% de soro bovino fetal (SBF) contendo anti-CD3 solúvel (BD Biosciences, 3 µg/ml), anti-CD28 (BD Biosciences, 1,5 µg/ml) e coquetel de citocinas polarizantes composto por TGF-β (R&D Systems, 3 ηg/ml ou 10 ηg/ml ou 30 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml, R&D Systems). Em alguns experimentos de diferenciação de células Tregs, as células foram diferenciadas na presença de inibidor de CD39 (ARL 67156, Sigma-Aldrich, 10 µM) ou agonista do receptor de A2a (NECA, Tocris Bioscience, 10 µM).

Em relação aos experimentos de estimulação com TGF-β em Tregs purificadas de indivíduos saudáveis, 1 x 10^5 células foram estimuladas por diferentes tempos com TGF-β (R&D Systems) em diferentes concentrações na presença de estímulo policlonal anti-CD3 solúvel (BD Biosciences, 3 µg/ml) e anti-CD28 (BD Biosciences, 1,5 µg/ml). Em alguns experimentos de estimulação de Tregs com TGF-β, utilizou-se os seguintes inibidores farmacológicos: inibidor da atividade do receptor TGFBRI (SB431542, Tocris Bioscience, 10 µM); inibidor de PKA (H89, Sigma-Aldrich, 10 µM); inibidor de CREB (Naphthol AS-E phosphate, Sigma-Aldrich, 3 µM ou 10 µM ou 30 µM); inibidor de p38 (SB203580, Calbiochem, 10 µM); inibidor de AKT (AKT inhibitor IV, Calbiochem, 100 ηM).

3.8. Dosagem de TGF-β por ELISA

Placas de 96 poços foram recobertas e incubadas com anticorpo purificado anti-anti-TGF-β, diluído em tampão fosfato de cálcio durante 12h, à 4°C. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas com PBS contendo 5% de Tween 20 e bloqueadas durante 1h, à temperatura ambiente, com PBS contendo 1% de BSA. Posteriormente, as placas foram lavadas, incubadas com o plasma de sangue periférico de pacientes artríticos e indivíduos saudáveis durante 12 horas, à 4°C. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas e incubadas por 1h à temperatura ambiente com um anticorpo

biotinilado diluído na concentração final de 1µg/ml em PBS contendo 1% de BSA e 0,5% de Tween 20. Posteriormente, as placas foram lavadas e incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, com avidina peroxidase diluída 1:5000 em PBS contendo 1% de BSA e 0,5% de Tween 20 e reveladas com substrato TMB (3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine) diluído e leitura em espectrofotômetro (Molecular Devices) em 490 ηm.

3.9. Quantificação de genes de interesse por PCR em tempo real

A extração do RNA de células $CD4^+$ isoladas de pacientes R-MTX, UR-MTX e indivíduos saudáveis foi realizada utilizando o kit *PureLink™ RNA Mini Kit* (Ambion Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente à extração, uma alíquota de 1 µL foi utilizada para determinação da concentração de RNA total, através de leitura em *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific) e 500 ηg do RNA extraído foi utilizado para a conversão em cDNA utilizando o kit *High Capacity* (Life Technologies). O cDNA foi utilizado para a quantificação da expressão dos genes de interesse e do gene de expressão constitutiva (HPRT-1) por PCR em tempo real utilizando *Syber Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) como repórter da amplificação. A reação quantitativa em tempo real foi realizada no aparelho Viia™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A curva de fusão foi analisada (65-95ºC) para verificar se apenas um produto foi amplificado e amostras que tiveram mais de um pico foram excluídas. Os resultados foram analisados através do método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os pares de iniciadores utilizados em cada reação estão listados abaixo.

Gene	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
HPRT1	GCAGTACAGCCCCAAAATGGC	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
TGFBR2	AGGGGTCCGGGAAGGC	CTGGGCCTCCATTTCCACAT
TGFBR1	TGCTCGACGATGTTCCATTG	CTCTCAAGGCTTCACAGCTC
ENTPD1	GTGGGGTTGACCCAGAACAA	GTGAGAAGAACCCGCATCCA
GFI1	CAATGCCTGTGGACAAGATG	GCAGTCAGGGGTTGTGACTT
SMAD7	CCTCCTTACTCCAGATACCCGAT	AGCTGACTCTTGTTGTCCGAATT
CREB1	TGAAGAAGCAGCACGAAAGA	TTTCAAGCACTGCCACTCTG
SMAD2	ACCGAAATGCCACGGTAGAA	TGGGGCTCTGCACAAAGAT
p38	ACTCAGATGCCGAAGATGAAC	GTGCTCAGGACTCCATCTCT

3.10. Análises de Western Blot

A quantificação da expressão proteica de CREB, CREB fosforilada (p-CREB), SMAD2, SMAD2 fosforilada (p-SMAD2) e CD39 em células Treg isoladas ou diferenciadas provenientes do sangue de indivíduos saudáveis e pacientes com AR foi realizada utilizando os seguintes anticorpos primários específicos: CREB (cat. ab7540, Abcam, diluição 1:1000; cat. 48H2, Cell Signaling Technology, diluição 1:1000), p-CREB (cat. ab10564, Abcam, diluição 1:500; cat. 87G3, Cell Signaling Technology, diluição 1:500), SMAD2 (cat. 86F7, Cell Signaling Technology, diluição 1:250), p-SMAD2 (cat. 3101S, Cell Signaling Technology, diluição 1:500) e CD39 (cat. ab189258, Abcam, diluição 1:500). Brevemente, as concentrações de proteínas no lisado de células isoladas foram quantificadas pelo kit BCA Protein Assay kit (Pierce). Um total de 20 µg de proteína foi utilizado para a separação em gel SDS-PAGE (10% gradiente; BioRad) em 100V, que foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas *overnight* a 4°C em 5% BSA (albumina sérica bovina) em TBS (*Tris-buffered saline*) e incubadas depois com os anticorpos primários mencionados anteriormente *overnight*, 4°C em BSA 5%. Após esse procedimento, as membranas foram novamente incubadas por 2h com anticorpo anti-coelho secundário conjugado a HRP (Pierce, diluição 1:5000) para CREB, p-CREB, SMAD2, p-SMAD2; e com

anticorpo anti-camundongo secundário conjugado a HRP (Pierce, diluição 1:10000) para CD39. Posteriormente, as membranas foram reveladas com solução de ECL (GE Healthcare) no aparelho Chemidoc XRS (BioRad).

3.11. Critérios para classificação de indivíduos saudáveis com expressão alta ou reduzida de CD39 em Tregs circulantes

Nos experimentos em que foram utilizadas células $CD4^+$ *naives* e Tregs isoladas de indivíduos saudáveis com expressão alta ou reduzida de CD39 previamente determinada em Tregs circulantes, os indivíduos selecionados participaram com controles saudáveis no estudo longitudinal realizado em pacientes com AR, sendo que foram classificados de acordo com os valores obtidos de expressão de CD39 (média de intensidade de fluorescência, MFI) em Tregs. Desta maneira, indivíduos com expressão reduzida de CD39 em Tregs foram aqueles que apresentavam valores de MFI de CD39 em Tregs circulantes <5000 e indivíduos com alta expressão foram designados por apresentarem valores de MFI de CD39 >7500.

3.12. Análise estatística

As características quantitativas dos indivíduos foram comparadas usando o teste *t-student* quando apropriado. Variáveis categóricas e as frequências genotípicas foram comparadas entre os grupos usando teste de Fisher. As análises estatísticas dos dados com múltiplos grupos foram realizadas pelos métodos de variância multivariada (*MANOVA*), variância a um critério (*ANOVA ONE-WAY*) e teste de comparações múltiplas de Bonferroni (teste t), de acordo com as variáveis e grupos comparados, sendo as diferenças consideradas significantes para valores de $P < 0.05$, $P < 0.01$ e $P < 0.001$. Ainda, nas análises de correlações, foi utilizado a correlação de *Spearman*. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism (GraphPad Software).

4- RESULTADOS

4.1. Frequência de células CD39$^+$Tregs em pacientes com AR antes e após o tratamento com MTX (estudo longitudinal)

Inicialmente, nós investigamos no presente estudo se o aumento na frequência de células Tregs e CD39$^+$Tregs em pacientes R-MTX observado anteriormente (Figura 4A e 4B) (Peres et al, 2012 dissertação de mestrado) é uma consequência do tratamento com MTX ou alguma característica intrínseca destes pacientes com AR. Além disso, nós avaliamos se a expressão reduzida de CD39 em células Tregs circulantes de pacientes UR-MTX (Figura 2A e 2B) (Peres et al, 2012 dissertação de mestrado) também seria uma característica biológica presente neste grupo de pacientes, tornando-os não responsivos ao tratamento com MTX.

Portanto, primeiramente determinamos a frequência de células CD39$^+$Treg bem como a expressão de CD39 por célula nesta subpopulação de células Treg em pacientes com AR antes e após o tratamento com MTX. Deste modo, promovemos um estudo longitudinal em que foram feitas duas coletas do sangue destes pacientes: 1ª coleta - Paciente recém-diagnosticado, sem tratamento prévio com drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs) ou agentes biológicos (ex. anti-TNF; anti-IL-6); 2ª coleta – Com pelo menos três meses de tratamento com MTX (tempo esperado para determinar a eficácia terapêutica do MTX) (Bansard et al., 2009) foi feita uma nova coleta do sangue destes pacientes, classificados como R-MTX ou UR-MTX de acordo com o índice de atividade da doença (DAS28) após o tratamento.

Assim, como observado na figura 7, nossos achados demonstraram que não houve diferença significativa na frequência e no número absoluto de células Tregs entre pacientes R-MTX, UR-MTX e indivíduos saudáveis antes do tratamento com MTX (Figuras 7A e 7B). Entretanto, pacientes R-MTX apresentaram um aumento significativo de células Tregs circulantes (em frequência e número absoluto) após a monoterapia com MTX, enquanto que não houveram diferenças nesta população celular em pacientes UR-MTX. Ainda, nós também determinamos a frequência de células CD39$^+$ Tregs circulantes tanto antes quanto após o tratamento com MTX. Não houve diferença na porcentagem de células

$CD4^+CD25^+FoxP3^+CD39^+$ entre os três grupos analisados antes do tratamento com MTX. Porém, a frequência de Tregs aumentou após o tratamento em pacientes R-MTX, mas não em pacientes UR-MTX (Figura 7C). Deste modo, estes dados demonstram que a resposta terapêutica ao MTX está associada com a expansão de células $CD39^+$ Tregs em pacientes R-MTX.

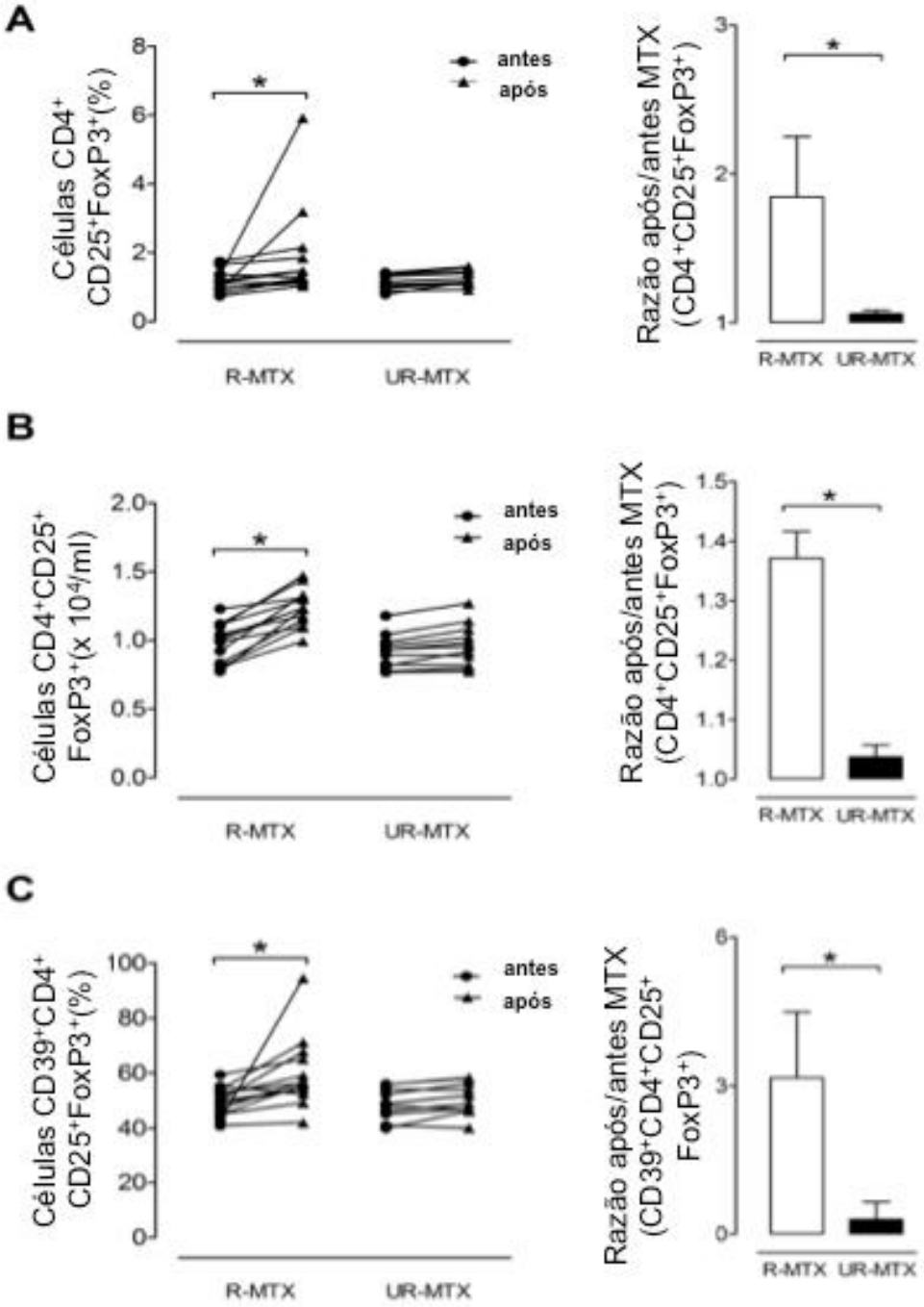


Figura 7- Fenotipagem de células Tregs e CD39$^+$ Tregs antes e após o tratamento com MTX em pacientes com AR. (A) Frequência de células CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$ em pacientes R-MTX (n = 15) e UR-MTX (n = 11) antes (●) e após (▲) do tratamento com MTX. *P<0.05. Razão da frequência de células CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$ após/antes ao tratamento com MTX em pacientes R-MTX (n = 15) e UR-MTX (n = 11). **(B)** Número absoluto de células CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$ em pacientes R-MTX (n=12) e UR-MTX (n=8) antes (●) e após (▲) ao tratamento com MTX. *P<0.05. Razão do número absoluto de células CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$ após / antes do tratamento com MTX em pacientes R-MTX (n=15) e UR-MTX (n = 11). *P<0.01. **(C)** Frequência de células CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$CD39$^+$ em pacientes R-MTX (n = 15) e UR-MTX (n = 11) antes (●) e após (▲) ao tratamento com MTX. *P<0.05. Razão da porcentagem de células CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$CD39$^+$ após / antes ao tratamento com MTX em pacientes R-MTX (n=15) e UR-MTX (n=11). *P <0.05.

4.2. Expressão de CD39 em células Tregs de pacientes com AR antes e após o tratamento com MTX (estudo longitudinal)

Em adição, nós avaliamos também a expressão de CD39 em células Tregs de pacientes com AR antes e após o tratamento com MTX. Assim, observamos que pacientes UR-MTX apresentaram uma redução significativa da expressão de CD39 (pela média de intensidade de fluorescência, MFI) em células Tregs circulantes quando comparados ao grupo de pacientes R-MTX avaliados tanto antes como após o tratamento com MTX (Figura 8, A-D, $P < 0.01$). De modo interessante, a expressão de CD39 não foi modificada durante o curso do tratamento dos grupos de pacientes com AR analisados (Figura 8, A-D). Portanto, esses achados demonstram que pacientes UR-MTX apresentam uma redução da expressão de CD39 em células Tregs mesmo antes do tratamento com MTX, indicando que a expressão reduzida de CD39 em células Tregs está associada com a resistência de pacientes UR-MTX ao MTX. Em suma, estes resultados mostram que a expressão de CD39 em células Tregs é um potencial biomarcador capaz de predizer a resistência ao tratamento com MTX em pacientes com AR.

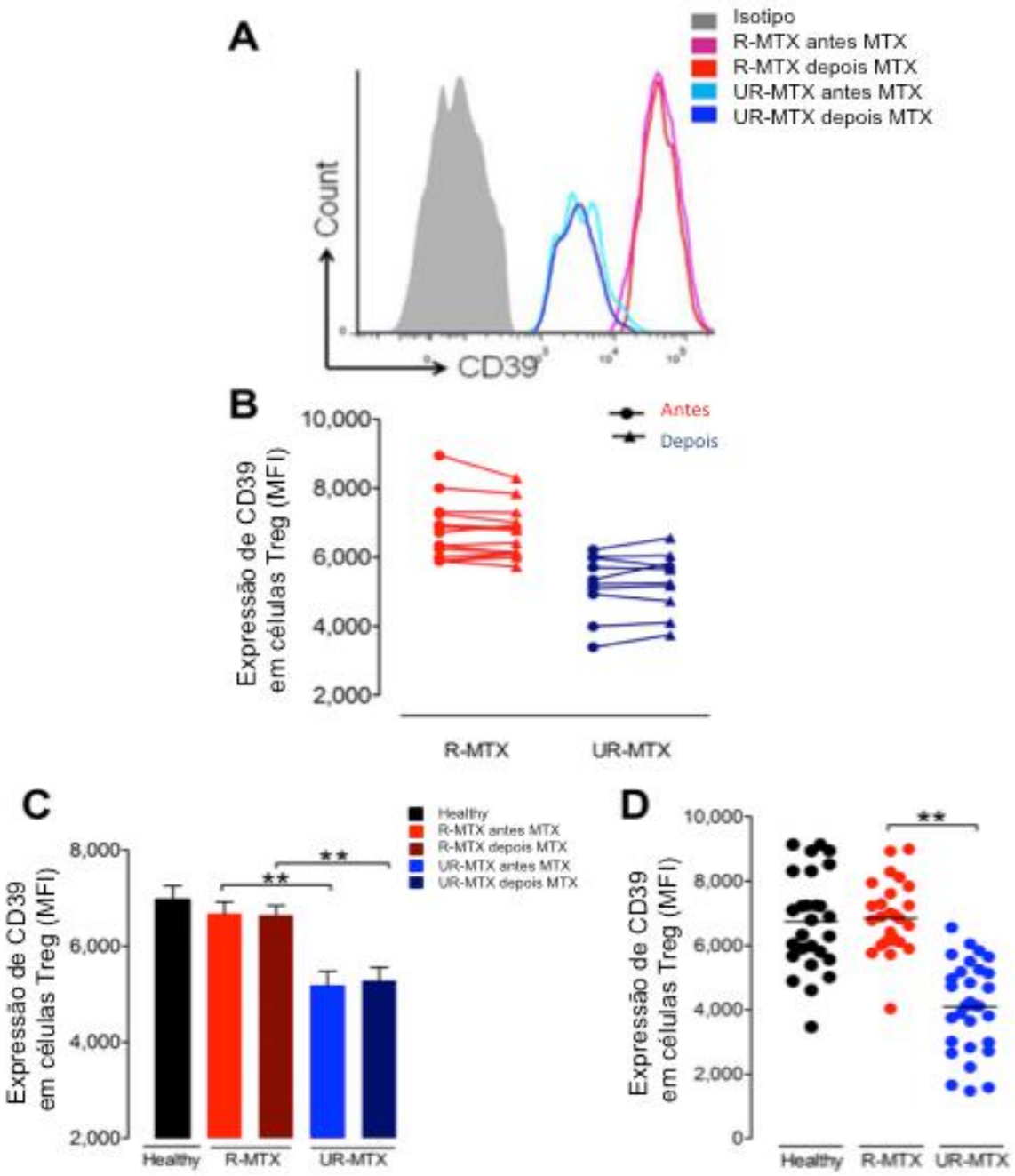


Figura 8- Redução da expressão de CD39 em células Tregs de pacientes UR-MTX antes e após o tratamento com MTX. (A) Histograma representativo da expressão de CD39 em células Tregs de pacientes R-MTX e UR-MTX antes e após o tratamento com MTX. (B) Média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD39 em células de pacientes R-MTX (n = 15), UR-MTX (n = 11) antes (●) e após (▲) o tratamento com MTX. (C) MFI de CD39 em células Tregs de pacientes R-MTX (n = 15), UR-MTX (n = 11) antes e após o tratamento com MTX e controles saudáveis (n = 16). **P<0.01. (D) MFI combinado de CD39 células Tregs de indivíduos saudáveis (*healthy*, n = 26), pacientes R-MTX (n = 27) e UR-MTX (n = 30) após o tratamento com MTX. **P<0.01.

Posteriormente a identificação da expressão de CD39 em células Tregs como um biomarcador apto em predizer a resistência ao MTX, nós realizamos outras análises através de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para determinar o poder discriminativo e se a avaliação deste biomarcador é realmente um bom método para predizer a resistência ao MTX. Além disso, através desta abordagem, foi possível estabelecer pontos de corte (*cutoffs*) que permitiram classificar e contabilizar o número de predições positivas e negativas através de parâmetros de sensibilidade e especificidade (Hajian-Tilaki, 2013). As análises em curva ROC são mostradas na Figura 9 e na Tabela 4. Assim, podemos observar através que da curva ROC que o ponto de corte de expressão de CD39 (MIF) com a combinação de melhor especificidade e sensibilidade foi em MIF > 5702. Ressalta-se que estas análises foram realizadas de acordo os valores de MIF de CD39 em Tregs de pacientes R-MTX ou UR-MTX antes do inicio do tratamento com MTX. Com MIF de CD39 >5702 a sensibilidade (verdadeiros positivos) de um possível teste preditivo de resistência ao MTX utilizando este biomarcador foi de 100%, isto é, todos os pacientes que apresentam MIF de CD39 em Tregs > 5702 certamente irão responder de maneira adequada ao tratamento com MTX. Em contraste, observamos também que neste mesmo ponto de corte a especificidade (verdadeiros negativos) do teste foi de 63,64%, ou seja, 63,64% dos pacientes que apresentam níveis de MIF de CD39 <5702 não serão respondedores ao MTX. A área sob a curva do teste (AUC) obtida a partir destas análises foi de 0,879. A AUC é obtida por métodos de integração numérica, como por exemplo, o método dos trapézios, e serve como uma medida padrão para a comparação de sistemas. Esta medida arbitral varia de 0 a 1 e, teoricamente, quanto maior a AUC, melhor será o teste (Hajian-Tilaki, 2013).

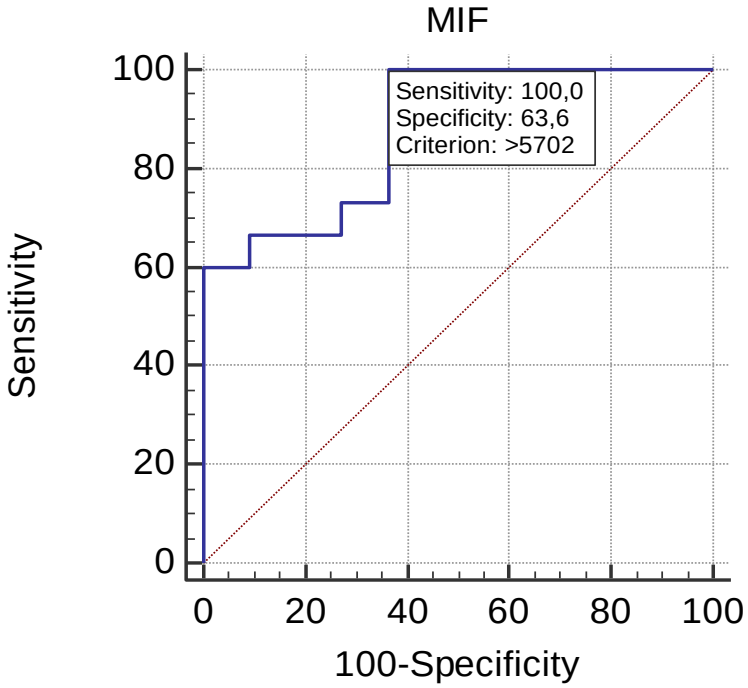


Figura 9- Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) dos níveis de expressão de CD39 em Tregs na predição da resistência do MTX na AR. Área sob a curva (AUC) – 0.879; intervalo de confiança 95% (IC 95 = 0,691 a 0,973); nível de significância de P <0.0001.

Tabela 4. Valor de corte de MFI de CD39 em Tregs quanto à sensibilidade e especificidade de um possível teste de diagnóstico.

CD39 MIF	Sensibilidade	95% CI	Especificidade	95% CI
≥3394	100,00	78,2 - 100,0	0,00	0,0 - 28,5
>5702	**100,00**	**78,2 - 100,0**	**63,64**	**30,8 - 89,1**
>5914	73,33	44,9 - 92,2	63,64	30,8 - 89,1
>5981	73,33	44,9 - 92,2	72,73	39,0 - 94,0
>5992	66,67	38,4 - 88,2	72,73	39,0 - 94,0
>6214	66,67	38,4 - 88,2	90,91	58,7 - 99,8
>6233	60,00	32,3 - 83,7	90,91	58,7 - 99,8
>6288	60,00	32,3 - 83,7	100,00	71,5 - 100,0
>8942	0,00	0,0 - 21,8	100,00	71,5 - 100,0

4.3. Células Tregs de pacientes UR-MTX apresentam função imunossupressora comprometida

Dados descritos anteriormente mostraram que a expressão reduzida de CD39 em células Tregs acarreta em uma produção defectiva de ADO extracelular por células Tregs de pacientes UR-MTX. Considerando que a ADO consiste em um potente agente imunomodulador produzido através da metabolização do ATP/ADP pelas ectonucleotidases CD39 e CD73 presentes na superfície das Tregs (Deaglio et al., 2007), e que a elevação dos níveis de ADO extracelular compreende um dos mecanismos anti-inflamatórios mediados pela ação do MTX (Cronstein, 2005), nós investigamos se expressão reduzida de CD39 em células Tregs de pacientes UR-MTX poderia acarretar em falhas funcionais nas células Tregs destes pacientes.

Para esta finalidade, células Tregs oriundas de pacientes UR-MTX, R-MTX e indivíduos saudáveis foram isoladas e incubadas nas proporções de 1:1, 1:0.5, 1:0.25 com células T efetoras (Teff, $CD4^{+}CD25^{-}$). Posteriormente, células presentes na co-cultura foram estimuladas com anti-CD3 e anti-CD28 e avaliadas quanto a capacidade das células Tregs em modular a proliferação de células Teff marcadas com Dye Efluor® 670. Em todos os experimentos utilizamos sempre células Teff de um mesmo individuo saudável com intuito de evitar diferenças quanto ao grau de ativação das células Teff entre os diferentes indivíduos.

Como podemos observar na figura 10, células Tregs de pacientes UR-MTX apresentaram uma redução significativa na capacidade de controlar a proliferação celular na proporção de 1:1 e 1:0.5 quando comparadas com as células Tregs tanto de pacientes R-MTX quanto de doadores saudáveis. Assim, estes dados demonstram que a expressão de CD39 em células Tregs em pacientes UR-MTX também promove um comprometimento funcional da capacidade supressora destas células.

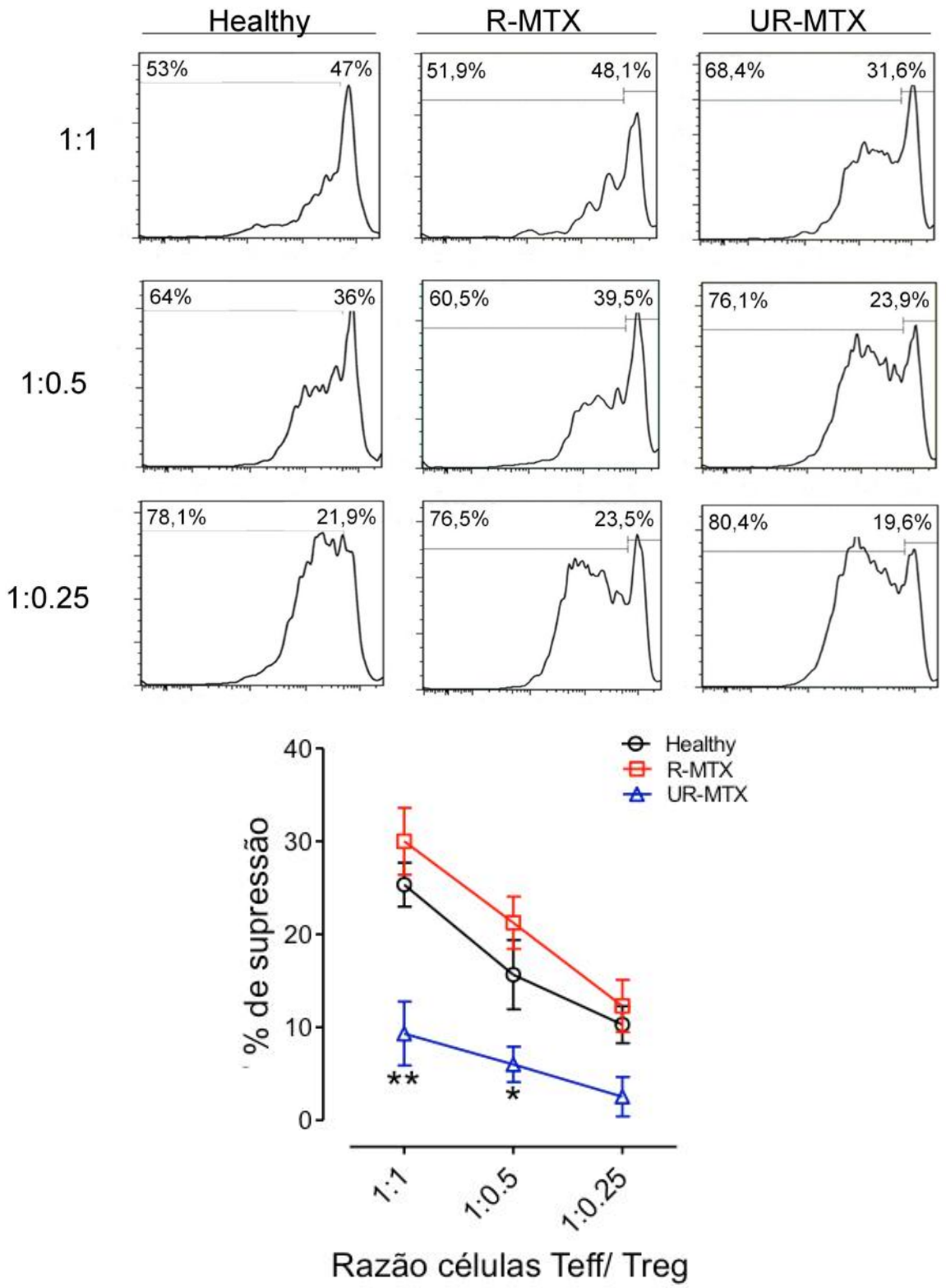


Figura 10- Células Tregs de pacientes UR-MTX apresentam capacidade imunossupressora comprometida. (Painel superior) Histogramas representativos da porcentagem de proliferação de células Teff marcadas com Dye Efluor® 670 e incubadas com células Tregs de doadores saudáveis e pacientes com AR tratados com MTX na razão indicada de Treg:Teff. (Painel inferior) Porcentagem de supressão de células Teff por Treg de indivíduos saudáveis (n = 5), pacientes R-MTX (n = 5) e UR-MTX (n = 4), usando a formula [Teff only – (Treg + Teff) / Teff only] x 100. *P<0.05, **P<0.01 comparado com indivíduos saudáveis (*healthy*).

O conjunto dos dados obtidos apresentados anteriormente combinados com os achados prévios obtidos pelo nosso grupo tanto em pacientes quanto em modelos experimentais de artrite foram publicados no dia 09 de Fevereiro de 2015 na revista *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS), cujo manuscrito foi intitulado "*Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis*" (vide na seção artigos), obtendo grande repercussão nacional e internacional na área de reumatologia e imunologia, destacada pelas seguintes reportagens:

ttp://agencia.fapesp.br/teste_pode_ajudar_a_planejar_terapia_contra_artrite_reumatoide/20655/

http://www.usp.br/agen/?p=201040

http://www.fmrp.usp.br/pesquisadores-da-fmrp-usp-avancam-no-diagnostico-e-tratamento-da-artrite-reumatoide/

Ao mesmo tempo, depositamos uma patente com intuito de proteger o ensaio biológico capaz de quantificar o biomarcador (expressão de CD39 em células Treg) de resposta ao MTX. A patente intitulada "MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA PREDIÇÃO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA DE UM INDIVÍDUO A UM DADO MEDICAMENTO E KITS PARA SUA REALIZAÇÃO" foi depositada e protocolada junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (número de depósito ***BR 10 2013 010996-7***, comprovante de depósito em anexo C). Inventores: Fernando de Queiroz Cunha (orientador), Raphael Sanches Peres (bolsista), Paulo Louzada-Júnior, Vanessa Carregaro, Jhimmy Talbot, José Carlos Alves Filho e Thiago Mattar Cunha. Uma possível parceria com uma empresa multi-nacional de origem alemã está sendo discutida no momento para desenvolver e otimizar o kit. O objetivo é que a empresa assuma os custos financeiros necessários para o desenvolvimento final do kit bem como para iniciar sua comercialização em larga escala.

Ainda, ressalta-se também que este trabalho publicado foi premiado em 2015 pelo Ministério da Saúde do Governo Federal como o artigo publicado por brasileiros no ano de 2015 com maior potencial de aplicabilidade ao Sistema Único de Saúde (SUS). O "Prêmio

de Incentivo em Ciência e Tecnologia para o SUS" foi entregue em Brasília-DF no dia 12/11/2015 (anexo D) com grande repercussão nacional.

4.4. Vias de sinalização envolvidas com a indução e modulação da expressão de CD39 em células Tregs

4.4.1. TGF-β promove um aumento da expressão de CD39 em células Tregs isoladas de indivíduos saudáveis

Brevemente, nossos achados mostraram até agora que a expressão reduzida de CD39 em células Tregs é um fator biológico inerente ao grupo de pacientes UR-MTX e não uma consequência mediada pelos efeitos do tratamento com MTX neste grupo de pacientes. Baseado nestas informações, nosso próximo alvo de estudo foi investigar possíveis alterações nas vias de indução e regulação da expressão de CD39 em células Tregs de pacientes UR-MTX.

Em um estudo de Liao et al. 2010, foi identificada a participação da proteína CREB na regulação e indução da expressão de CD39 em macrófagos. Portanto, é importante determinar se mecanismo semelhante participa da expressão de CD39 em células Tregs. Neste sentido, o TGF-β, uma citocina crucial para o processo de diferenciação das células Tregs, é capaz de induzir a ativação da CREB em Tregs (Kamiya et al., 2007; Kochetkova et al., 2011). Com base nestes achados, investigamos se o TGF-β participa da indução da expressão de CD39 em células Tregs.

Para tal finalidade, isolamos células Tregs do sangue periférico de doadores saudáveis, as quais foram imediatamente estimuladas com anti-CD3 (3 µg/ml) e anti-CD28 (1,5 µg/ml) e incubadas com diferentes concentrações de TGF-β à 37ºC, 5% CO_2. Após diferentes períodos de incubação com TGF-β, células Tregs foram marcadas e analisadas por FACS quanto à expressão de CD39 em sua superfície por MFI. Como demonstrado na figura 11, observamos que com 24h de incubação com TGF-β, houve um aumento da expressão de CD39 em células Tregs incubadas com TGF-β na concentração de 30 ηg/ml. O pico máximo de aumento da

expressão de CD39 em Tregs foi observado em 48h após a incubação, em que a tanto a concentração de TGF-β de 30 ηg/ml quanto de 10 ηg/ml foram estatisticamente significativas (P <0.01) quando comparadas com células Tregs não incubadas. Entretanto, foi notado que com 72h de incubação este aumento da expressão de CD39 foi menor em relação ao período de 48h. Deste modo, em todos os experimentos seguintes realizados neste trabalho, adotamos o período de incubação de 48h como padrão para avaliação do aumento da expressão de CD39 em Tregs utilizando TGF-β nas concentrações tanto de 10 ηg/ml quanto de 30 ηg/ml (Figura 12, A-B). Em suma, esses dados demonstram de modo inédito que a estimulação por TGF-β promove um aumento da expressão de CD39 na superfície de células Tregs humanas.

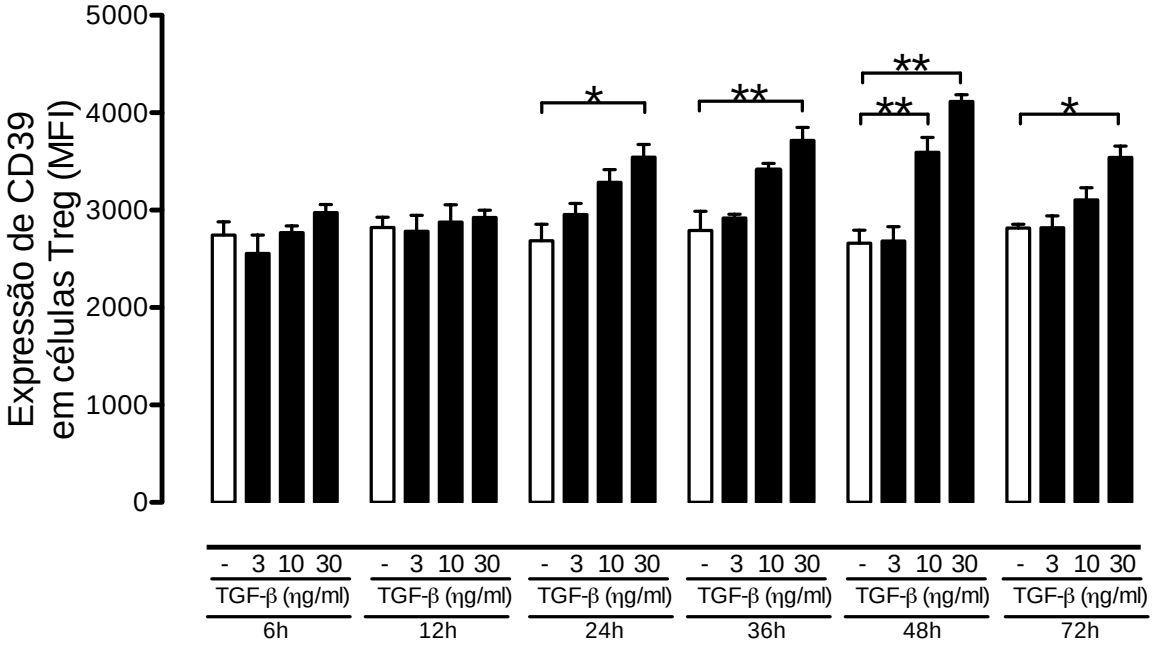


Figura 11- Estimulação com TGF-β promove um aumento da expressão de CD39 em células Tregs. Células Tregs foram isoladas de doadores saudáveis (n = 5) e incubadas com estímulo policlonal na presença ou não de diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) por diferentes períodos. Gráfico demonstra a expressão de CD39 (MFI) em células Tregs ($CD4^{+}CD25^{+}$) incubadas com diferentes concentrações de TGF-β durante diferentes tempos. *P <0.05. **P <0.01.

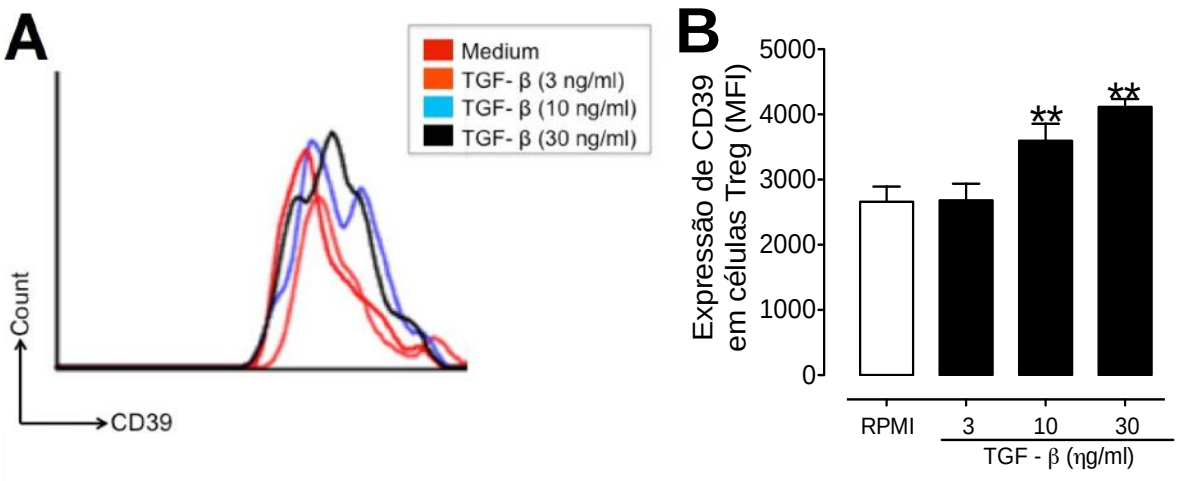


Figura 12- TGF-β promove um aumento da expressão de CD39 em células Tregs isoladas de indivíduos saudáveis. Células Tregs foram isoladas de doadores saudáveis (n = 5) e incubadas com estímulo policlonal e diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) por 48h. (A) Histograma representativo do MFI de CD39 de células Tregs incubadas com diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) por 48h. (B) Gráfico demonstra a expressão de CD39 (MFI) em células Tregs (;n = 5) incubadas ou não (*medium*) com diferentes concentrações TGF-β por 48h. **P <0.01.

Em paralelo, verificamos se este fenômeno de aumento de CD39 observado em células Tregs não ocorre em outros tipos de leucócitos, tais como linfócitos T efetores ($CD4^+CD25^-$), granulócitos e células $CD11c^+$. Dentro deste contexto, isolamos linfócitos T efetores, granulócitos e células aderentes do sangue periférico de indivíduos saudáveis, e posteriormente, as estimulamos com concentrações crescentes de TGF-β (3, 10 ou 30 ηg/ml) para avaliação da expressão de CD39 por MFI. Desta maneira, diferentemente das células Tregs, observamos que a estimulação com TGF-β, mesmo nas concentrações mais elevadas, não modificou a expressão de CD39 em linfócitos T efetores, granulócitos e células $CD11c^+$ (Figura 13A, 13B e 13C, respectivamente). Assim, estes resultados demonstram que o fenômeno de aumento da expressão de CD39 via estimulação com TGF-β ocorre exclusivamente em células Tregs.

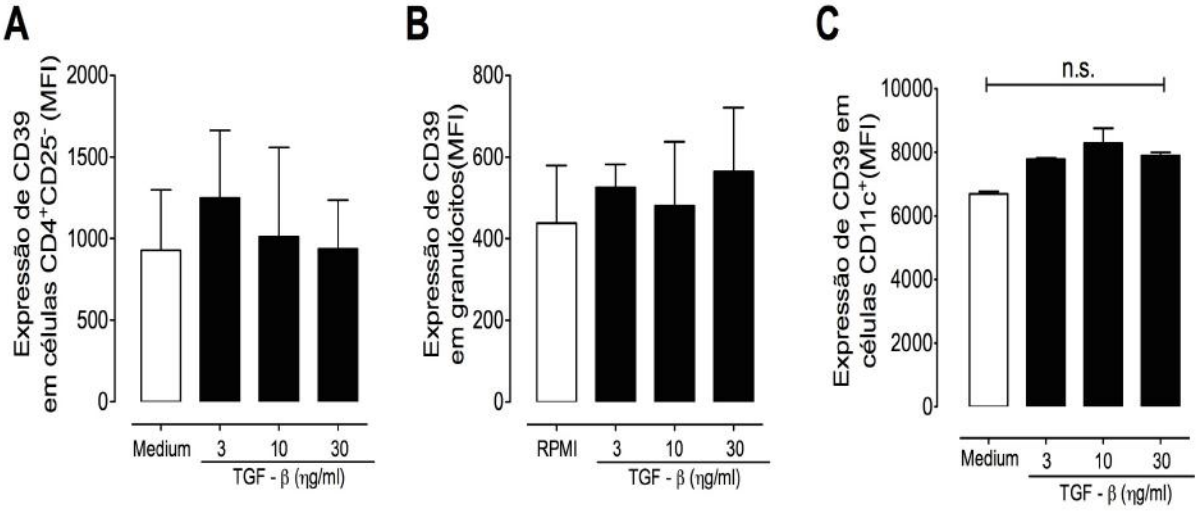


Figura 13- Estimulação com TGF-β não aumenta a expressão de CD39 em células T efetoras, granulócitos e células $CD11c^+$. (A) Expressão de CD39 (MFI) em células T efetoras ($CD4^+CD25^-$; n = 4) incubadas ou não (medium) com diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) por 48h. (B) Expressão de CD39 (MFI) em granulócitos incubados com diferentes concentrações de TGF-β (3 ng/ml; 10 ng/ml; 30 ng/ml) por 12h. (C) Expressão de CD39 (MFI) em células $CD11c^+$ (n = 4) incubadas com diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) por 48h. n.s. = não significante.

4.4.2. Efeito da estimulação com TGF-β na indução da expressão de CD39 em células Tregs humanas diferenciadas *in vitro*

Conforme descrito anteriormente, a estimulação com TGF-β promoveu a indução da expressão de CD39 em células Tregs isoladas de indivíduos saudáveis. Posteriormente, nosso próximo objetivo foi determinar se fenômeno semelhante ocorre também em células Tregs diferenciadas *in vitro* (Tregs induzidas, iTregs). Para isto, isolamos células CD4 *naives* ($CD4^+CD45RA^+$) do sangue periférico de doadores saudáveis e as incubamos com anti-CD3 (3 µg/ml) e anti-CD28 (1,5 µg/ml) na presença de coquetel de citocinas polarizantes específico para a diferenciação de células Tregs composto por IL-2 (na concentração fixa de 10 ηg/ml) e TGF-β (concentrações de 3 ηg/ml, 10 ηg/ml ou 30 ηg/ml).

Como podemos observar na figura 14, todas as concentrações de TGF-β, inclusive a de 3 ηg/ml, foram capazes de induzir diferenciação de células Tregs após 4 dias em cultura, evidenciado pelo aumento da frequência de células $CD4^+$ que expressam simultaneamente o fator de transcrição FoxP3 (Figura 14A e 14B). Ainda, todas as concentrações de TGF-β utilizadas induziram a diferenciação de células Tregs de modo similar, visto que não houve diferença significativa na frequência de células $CD4^+FoxP3^+$ entre as concentrações de TGF-β utilizadas durante a diferenciação celular (Figura 14A e 14B).

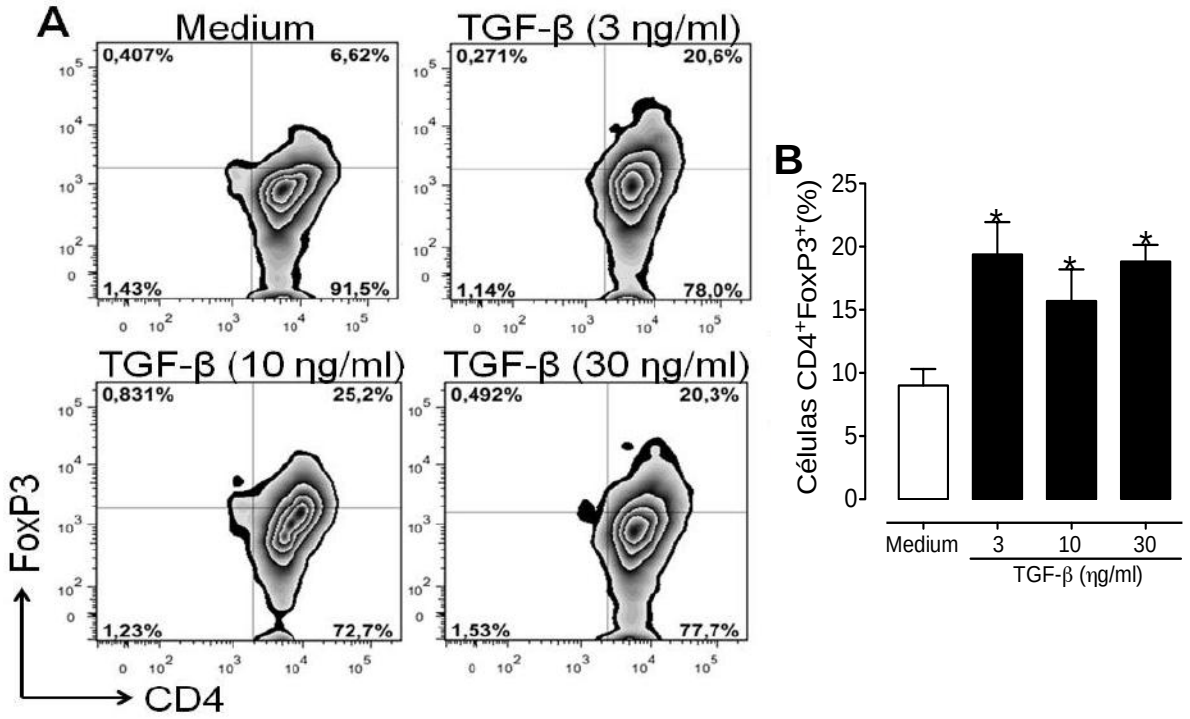


Figura 14- Diferenciação de células Tregs *in vitro* com diferentes concentrações de TGF-β. Células CD4 *naives* ($CD4^+CD45RA^+$) foram isoladas de doadores saudáveis (n = 4) e incubadas com estímulo policlonal na presença ou não (*medium*) de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml) por 4 dias. (A) Dot plots representativos da porcentagem de células $CD4^+FoxP3^+$ após 4 dias de diferenciação com TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml). (B) Frequência de células $CD4^+FoxP3^+$ após 4 dias de diferenciação com TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml).*P <0.05.

Posteriormente da avaliação da capacidade de diferenciação celular determinada pela expressão de FoxP3, investigamos se estas células Tregs diferenciadas *in vitro* apresentavam também um aumento da expressão de CD39 na superfície, visto que já é bem descrito na literatura que células Tregs, principalmente nTregs, possuem uma elevada expressão tanto de CD39 quanto de CD73 na superfície quando comparadas aos demais subtipos celulares (Deaglio et al., 2007). Ainda, avaliamos se as diferentes concentrações de TGF-β utilizadas durante a diferenciação celular poderiam influenciar os níveis de expressão de CD39 em células Tregs diferenciadas. Assim, nossos dados demonstraram que a diferenciação de células T *naives* em células Tregs promoveu um aumento da expressão de CD39, independentemente da concentração empregada durante o processo de diferenciação. Os dados foram comparados com o MFI das células que não foram expostas em cultura ao coquetel de citocinas polarizantes (*No Treg*) (Figura 15A). Em adição, células Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) diferenciadas com 10 ηg/ml e 30 ηg/ml de TGF-β apresentaram um aumento significativo na expressão de CD39, comparados com células $CD4^+FoxP3^+$ que não foram incubadas com coquetel de citocinas polarizantes (*medium*) (Figura 15B).

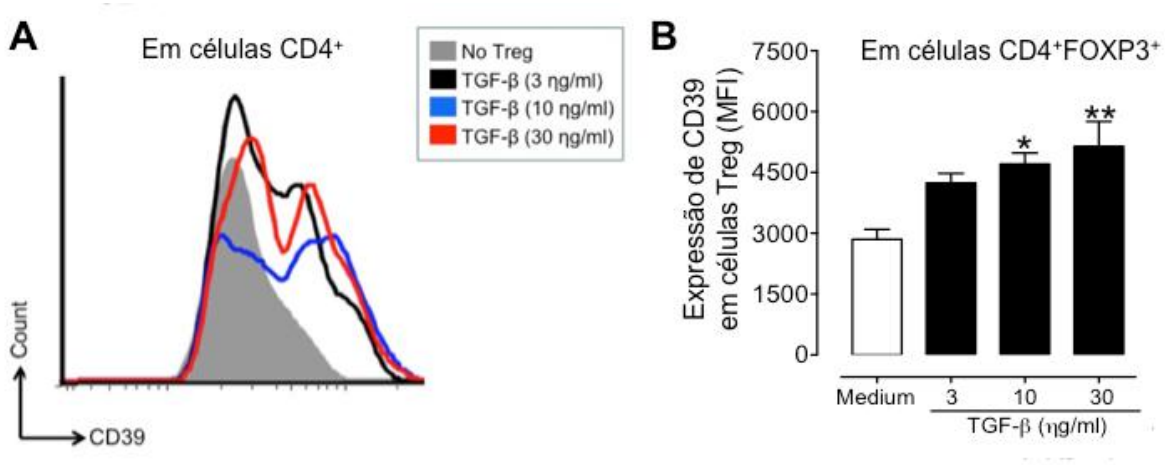


Figura 15- Estimulação com TGF-β promove um aumento da expressão de CD39 em células Tregs diferenciadas *in vitro*. Células CD4 *naives* ($CD4^+CD45RA^+$) foram isoladas de doadores saudáveis (n = 5) e incubadas com estímulo policlonal na presença ou não (*No Treg*) de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml) por 4 dias. (A) Histograma representativo da expressão de CD39 (MFI) em células CD4 *naives* ($CD4^+CD45RA^+$) incubadas ou não (*No Treg*) com coquetel de citocinas polarizantes por 4 dias. (B) Expressão de CD39 por MFI em células $CD4^+FoxP3^+$ diferenciadas ou não (*medium*) com coquetel de citocinas polarizantes por 4 dias. *P <0.05.**P <0.01.

Simultaneamente, determinamos também a expressão de CD39 por Western Blot em células Tregs diferenciadas *in vitro* com concentrações crescentes de TGF-β (3, 10 ou 30 ηg/ml). Como pode ser observado na figura 16, similarmente ao observado nos experimentos avaliando MIF de CD39 em células Tregs por FACS, também observamos um aumento da expressão de CD39 quando as células Tregs foram diferenciadas nas concentrações mais elevadas de TGF-β.

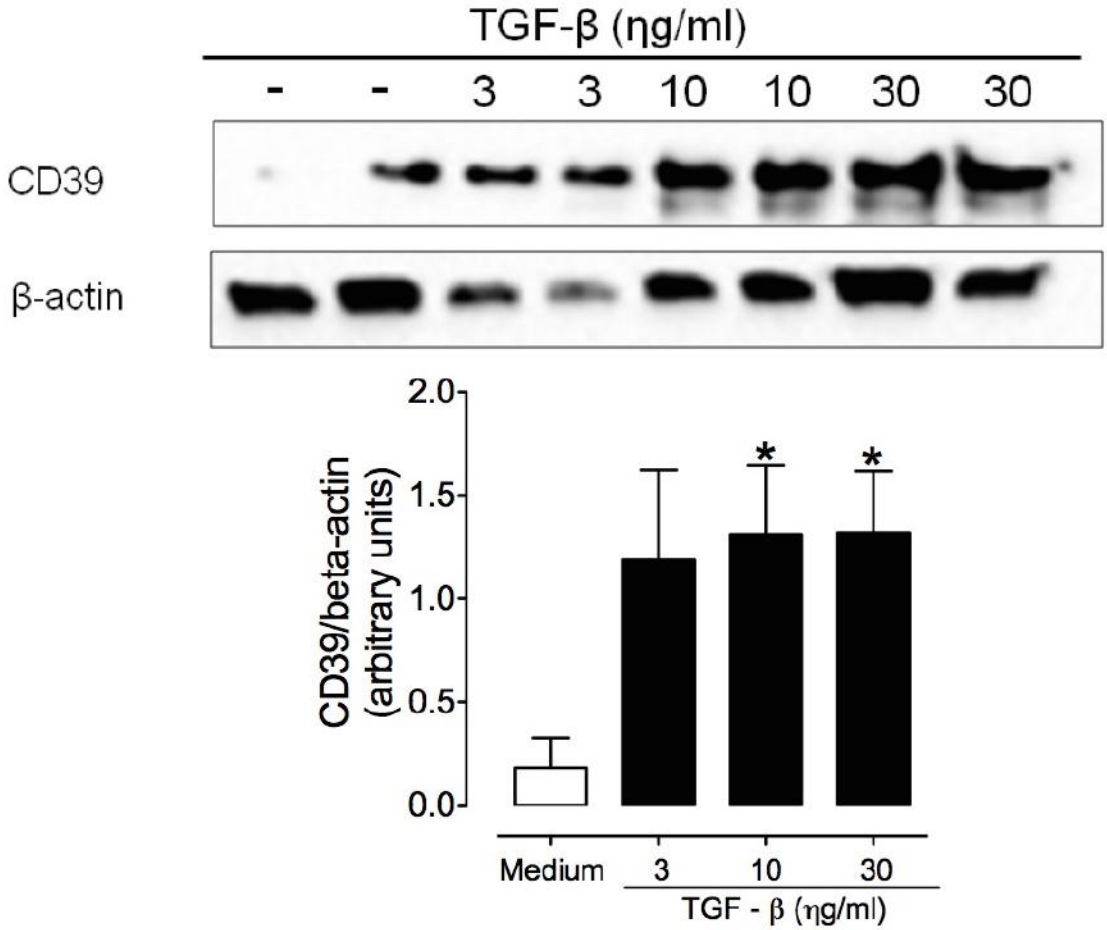


Figura 16- Estimulação com TGF-β promove um aumento da expressão de CD39 em células Tregs diferenciadas *in vitro*. Células CD4 *naives* ($CD4^+CD45RA^+$) foram isoladas de doadores saudáveis e incubadas ou não (*medium*) com diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml) por 4 dias. Análise por Western Blot da expressão de CD39 e β-actina (controle endógeno) da cultura de células Tregs diferenciadas ou não (*medium*) com coquetel de citocinas polarizantes. Dados são mostrados em duplicata de cada grupo. *P <0.05.

Além disso, com intuito de confirmar nossos achados, nós repetimos o protocolo de diferenciação de células T *naives* em células Tregs com uma única concentração de TGF-β (10 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml). Após 4 dias de cultura, o sobrenadante de cultura de células Tregs diferenciadas foi descartado para que, posteriormente, realizássemos uma re-estimulação destas células com concentrações crescentes de TGF-β (3, 10 ou 30 ηg/ml) por 48h. Similarmente as Tregs isoladas de indivíduos saudáveis, a re-estimulação de células Tregs diferenciadas *in vitro* com TGF-β nas maiores concentrações (10 e 30 ηg/ml) também promoveu um aumento da expressão de CD39 em células $CD4^{+}FOXP3^{+}$ (Figura 17). Portanto, a partir deste conjunto de resultados, demonstramos que a estimulação com TGF-β induz a expressão de CD39 na superfície tanto de células Tregs isoladas quanto diferenciadas *in vitro.*

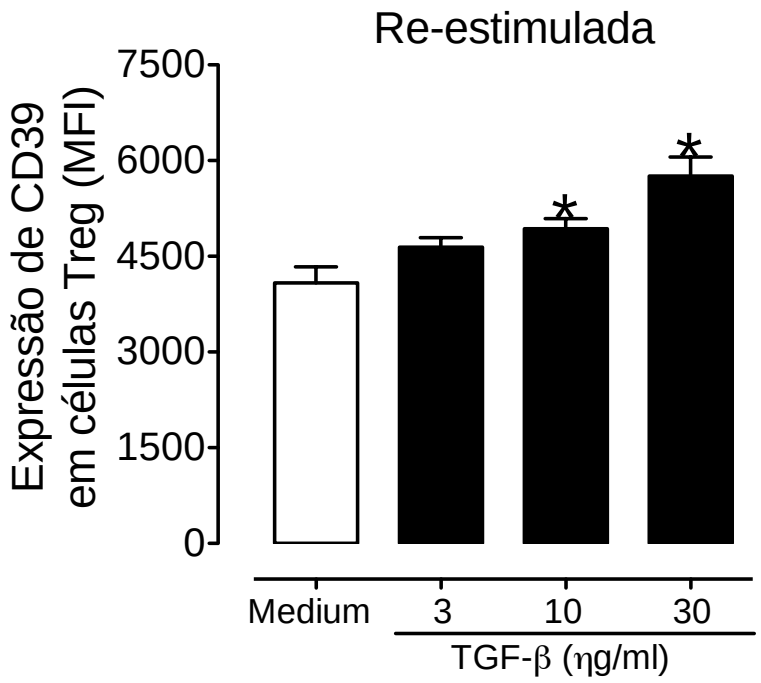


Figura 17- Efeitos da re-estimulação com TGF-β na indução da expressão de CD39 em células Tregs diferenciadas *in vitro*. Células CD4 *naives* ($CD4^{+}CD45RA^{+}$) foram isoladas de doadores saudáveis (n = 5) e incubadas com TGF-β (10 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml) por 4 dias. Após o processo de diferenciação, células Tregs diferenciadas foram re-estimuladas com diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e estimulo policlonal. Expressão de CD39 por MFI em células $CD4^{+}FoxP3^{+}$ diferenciadas e re-estimuladas ou não (*medium*) com TGF-β. *P <0.05.

4.4.3. Moléculas envolvidas na indução/regulação da expressão de CD39 após a estimulação com TGF-β em células Tregs

A estimulação com TGF-β influencia a funcionalidade de vários tipos celulares devido à ativação/regulação de proteínas intracelulares envolvidas na cascata de sinalização desencadeada quando esta citocina se liga ao seu receptor. Especificamente, a ligação do TGF-β ao seu receptor tipo II (TGFBRII) e tipo I (TGFBRI) na membrana plasmática, induz a fosforilação de seus alvos moleculares intracelulares, como as SMADs (Yan et al., 2009). As SMADs são transdutores de sinais intracelulares que ao serem ativados translocam para o núcleo, onde atuam como fatores de transcrição induzindo diretamente ou em conjunto com outros fatores de transcrição, tais como CREB, a transcrição de seus genes alvo (Warner et al., 2003a). Ainda, CREB é descrita na literatura por induzir a expressão de CD39 em macrófagos (Liao et al., 2010), e pode ser fosforilada por várias quinases, como p38 e PI3K/AKT, que são ativadas em decorrência da estimulação com TGF-β (Zhang, 2009). A partir destas informações, nosso próximo alvo foi investigar se a atividade do TGFBRI seria essencial para o desencadeamento da cascata de sinalização que induz a expressão de CD39 em células Tregs por TGF-β. Para tal finalidade, isolamos novamente células Tregs de doadores saudáveis, incubando-as simultaneamente com TGF-β (10 ηg/ml) e um composto que atua como inibidor seletivo da atividade de TGFBRI (SB 431542; 1 μM e 10 μM). As células Tregs permaneceram em cultura por 48h para posterior avaliação da expressão de CD39 por MFI. Deste modo, os dados obtidos mostraram que a incubação simultânea de TGF-β e SB 431542 (inibidor de TGFBRI) na concentração de 10 μM desencadeou em uma reversão da indução da expressão de CD39 nas células Tregs pelo TGF-β (Figura 18). Logo, estes achados demonstram que o TGFBRI participa da cascata de sinalização responsável por induzir a expressão de CD39 pela estimulação de células Tregs com TGF-β.

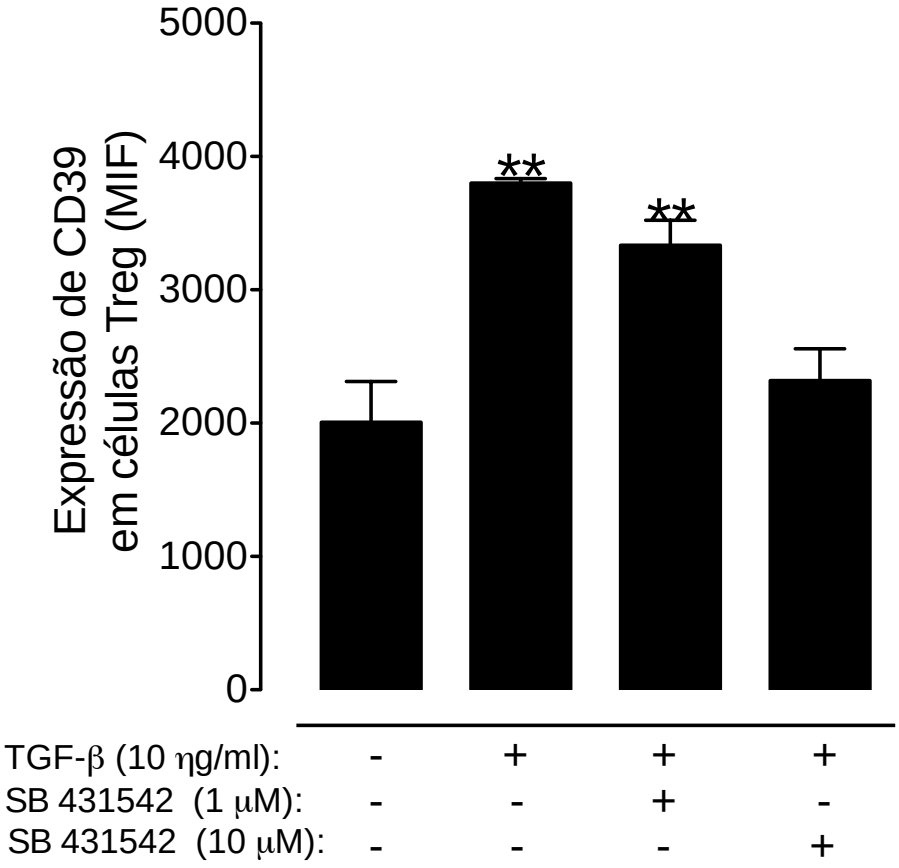


Figura 18- Atividade de TGFBRI é requerida para o aumento da expressão de CD39 em células Tregs induzido por TGF-β. Células Tregs foram isoladas de doadores saudáveis (n = 4) e incubadas com estímulo policlonal, TGF-β (10 ηg/ml) na presença ou não do inibidor seletivo de TGFBRI SB 431542 (1 μM; 10 μM) por 48h. Gráfico demonstra a expressão de CD39 por MFI em células Tregs. **P <0.01; comparado ao grupo sem nenhum tratamento.

Posteriormente, avaliamos se algumas moléculas *downstream* envolvidas com a ativação TGFBRI estavam associadas com o fenômeno de aumento da expressão de CD39 em células Tregs pela estimulação com TGF-β. Neste caso, fizemos experimentos com o objetivo de avaliar a expressão e ativação destas moléculas (SMAD2, p-SMAD2, CREB, p-CREB). Para isso, células Tregs foram novamente incubadas com concentrações crescentes de TGF-β (3, 10 ou 30 ηg/ml) e estímulo policlonal. Após 48h em cultura, as células Tregs foram coletadas para a determinação da expressão de p-SMAD2, SMAD2, p-CREB e CREB por Western Blot. Em relação à expressão proteica de SMAD2, observamos um aumento na expressão da proteína ativada (fosforilada) em células Tregs de modo concentração-dependente de TGF-β (Figura 19), demonstrando uma correlação positiva dos níveis de expressão de CD39 (Figura 16) com os níveis de p-SMAD2 (Figura 19).

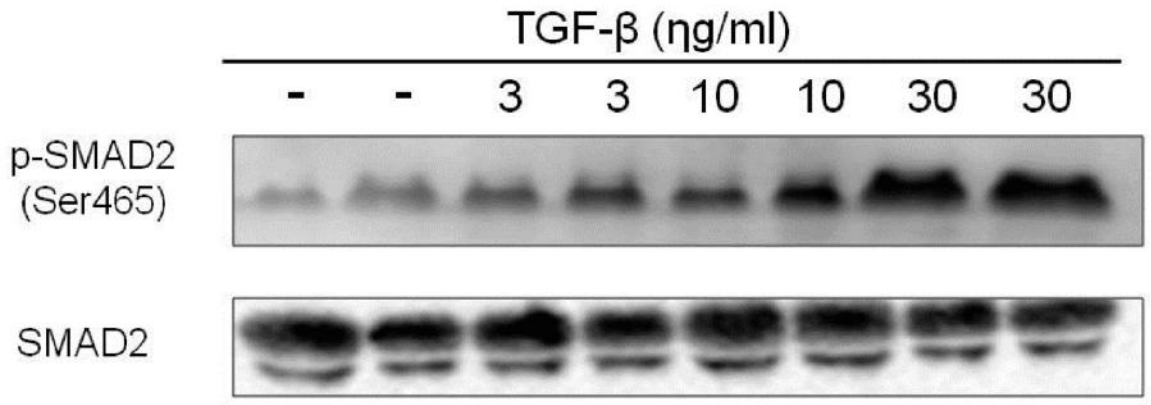


Figura 19- Estimulação com TGF-β promove aumento da expressão de p-SMAD2 de modo concentração-dependente em células Tregs. Células Tregs foram isoladas de doadores saudáveis e incubadas ou não com diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e estímulo policlonal por 48h. Análise de Western Blot mostrando a expressão de p-SMAD2 e SMAD2 de células Tregs estimuladas ou não com TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml). Dados estão mostrados em duplicata para cada grupo.

Como mencionado anteriormente, uma vez que SMAD2 é ativada (fosforilada), esta proteína forma um complexo com SMAD3 e SMAD4, que transloca para o núcleo e atua induzindo diretamente ou através da cooperação de outros fatores de transcrição, como CREB, a transcrição de seus genes alvo (Janknecht et al., 1998; Warner et al., 2003). Neste contexto, observamos também um aumento dos níveis de expressão de p-CREB em células Tregs estimuladas com TGF-β de modo concentração-dependente de TGF-β (Figura 20). Observando detalhadamente a figura 20, verificamos a presença de duas bandas no gel detectadas pelo anticorpo [Phospho-CREB (Ser133); 87G3] utilizado nos experimentos, que correspondem a p-CREB (banda superior) e p-ATF1 (banda inferior), as quais possuem estruturas similares e são duplamente detectadas pelo anticorpo. Portanto, o aumento da expressão de CD39 por TGF-β em células Tregs está associado também a um aumento dos níveis de p-CREB, descrita na literatura por induzir a transcrição do gene que codifica a molécula CD39 (Liao et al., 2010).

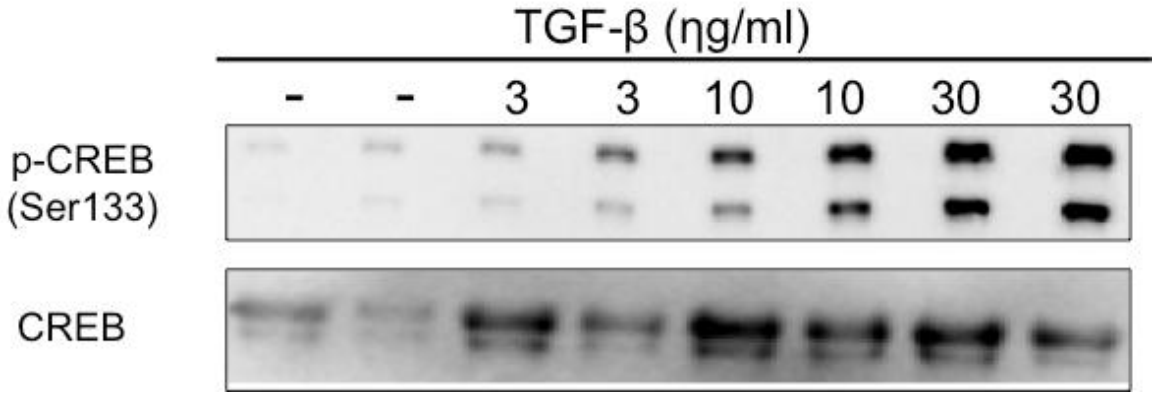


Figura 20- Estimulação com TGF-β promove um aumento da expressão de p-CREB em células Tregs. Células Tregs foram isoladas de doadores saudáveis e incubadas ou não com diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e estímulo policlonal por 48h. Análise de Western Blot mostrando a expressão de p-CREB, CREB total e beta-actina (controle endógeno) de células Tregs estimuladas ou não com TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml). Dados estão mostrados em duplicata para cada grupo.

Com o intuito de confirmar o envolvimento de CREB no aumento da expressão de CD39 em Tregs por TGF-β, nós repetimos o protocolo de aumento da expressão de CD39 padronizado em células Tregs acrescentando simultaneamente ou não com o TGF-β um inibidor da atividade de CREB (iCREB, *Naphthol AS-E phosphate*). Deste modo, observamos que o aumento da expressão de CD39 mediado por TGF-β foi revertido em células estimuladas com inibidor de CREB simultaneamente ao TGF-β (10 ηg/ml), independentemente da concentração empregada do inibidor de CREB (Figura 21). Portanto, esses dados sugerem que a atividade de CREB é requerida para a promoção do aumento da expressão de CD39 em células Tregs estimuladas com TGF-β.

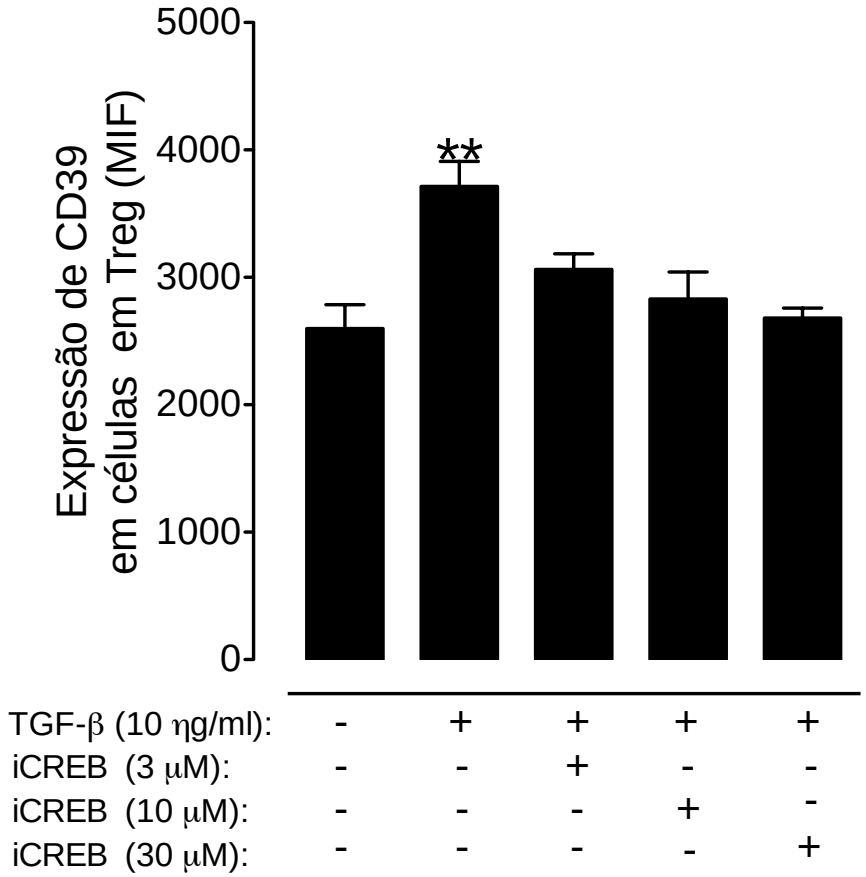


Figura 21- Atividade de CREB é requerida para o aumento da expressão de CD39 em células Tregs induzido por TGF-β. Células Tregs foram isoladas de doadores saudáveis (n = 4) e incubadas com estímulo policlonal, TGF-β (10 ηg/ml) na presença ou não de inibidor seletivo de CREB (iCREB, 3, 10 e 30 μM) por 48h. Gráfico demonstra a expressão de CD39 por MFI em células Tregs. **P <0.01; comparado ao grupo sem nenhum tratamento.

Além da fosforilação das SMADs como consequência da ligação do TGF-β aos receptores TGFBRII/TGFBRI, é descrito na literatura que o TGFBRI também pode ativar PKA (Kramer et al., 1991; Warner et al., 2003a; Moustakas & Heldin, 2005; Yang et al., 2013). Ainda, é demonstrado que a fosforilação de CREB por PKA induz aumento de RNAm de CD39 em macrófagos (Liao et al., 2010). Assim, é importante determinar se mecanismo semelhante participa da expressão de CD39 nas células Tregs. Para isto, isolamos novamente células Tregs de doadores saudáveis e as incubamos com a concentração de TGF-β de 10 ηg/ml adicionando simultaneamente ou não um inibidor farmacológico descrito por inibir a atividade de PKA (H89; 10 μM). A concentração de 10 μM de H89 utilizada nos experimentos foi baseada em dados prévios da literatura que demonstram a eficácia do H89 em inibir a atividade de PKA *in vitro* (Herbst et al., 2009). Deste modo, a administração do inibidor de PKA concomitante à incubação de TGF-β não modulou a indução da expressão de CD39 em células Tregs por TGF-β após 48 horas de incubação, visto que observamos valores de MFI de CD39 similares quando comparados com células Tregs incubadas somente com TGF-β na concentração de 10 ηg/ml (Figura 22).

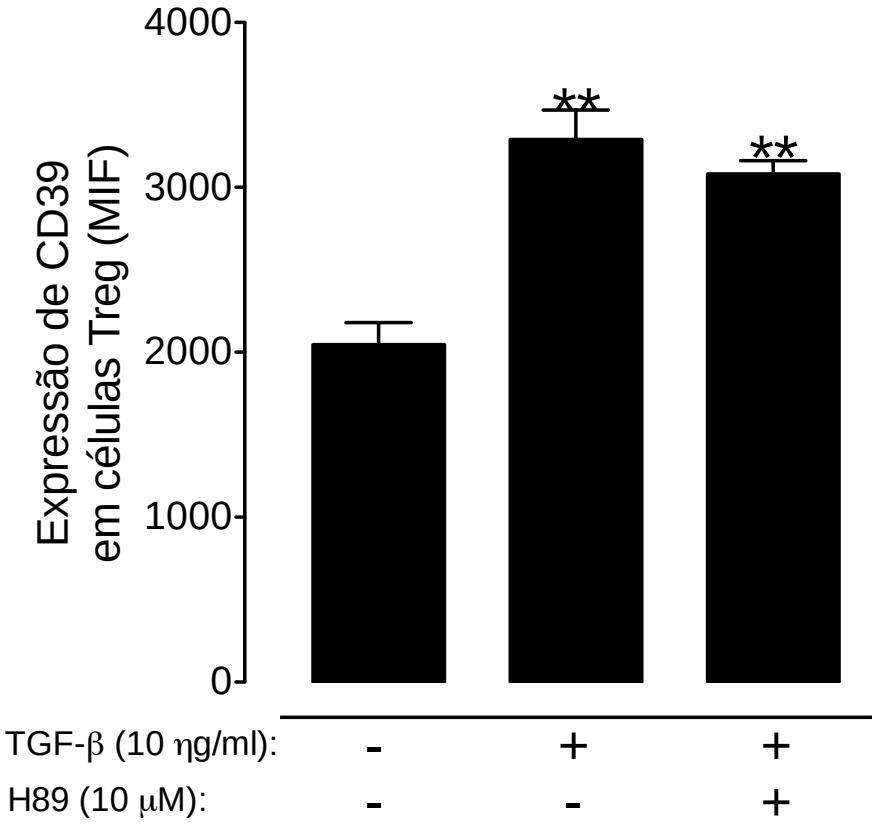


Figura 22- Aumento da expressão de CD39 em células Tregs mediado por TGF-β é independente da atividade de PKA. Células Tregs foram isoladas de doadores saudáveis (n = 4) e incubadas com estímulo policlonal e TGF-β (10 ηg/ml) na presença ou não de inibidor da atividade de PKA (H89; 10 μM) por 48h. Gráfico demonstra a expressão de CD39 por MFI em células Tregs.**P <0.01.

Com estes achados, é plausível que outras moléculas pertencentes às vias não canônicas da sinalização de TGF-β possuem um papel relevante na ativação de CREB. De fato, é bem descrito na literatura que outras quinases como Erk, p38 e PI3K/AKT são ativadas de modo indireto ou direto pelo receptor TGFBRI após a estimulação com TGF-β (Lee et al., 2007; Engel et al., 1999; Bhowmick et al., 2001; Bakin et al., 2000). Neste contexto, nós realizamos experimentos utilizando outros inibidores de farmacológicos de quinases que poderiam ter um papel relevante na ativação de CREB e, consequentemente, na indução de CD39 por TGF-β. Deste modo, observamos que a incubação simultânea de Tregs isoladas com um inibidor farmacológico da atividade de AKT (AKT inhibitor IV; 100 ηM) (Meinig et al., 2015) não modulou a indução da expressão de CD39 em células Tregs via TGF-β (Figura 23). Em contraste, quando adicionamos um inibidor da atividade de p38 (SB 203580; 10 μM) (Birkenkamp et al., 2000) em células Tregs também incubadas com TGF-β, verificamos que a inibição da atividade de p38 aboliu completamente a capacidade de indução da expressão de CD39 pelo TGF-β (Figura 24), sugerindo que a ativação de p38 por TGF-β leva a uma consequente ativação de CREB e, que por sua vez, induz a expressão de CD39.

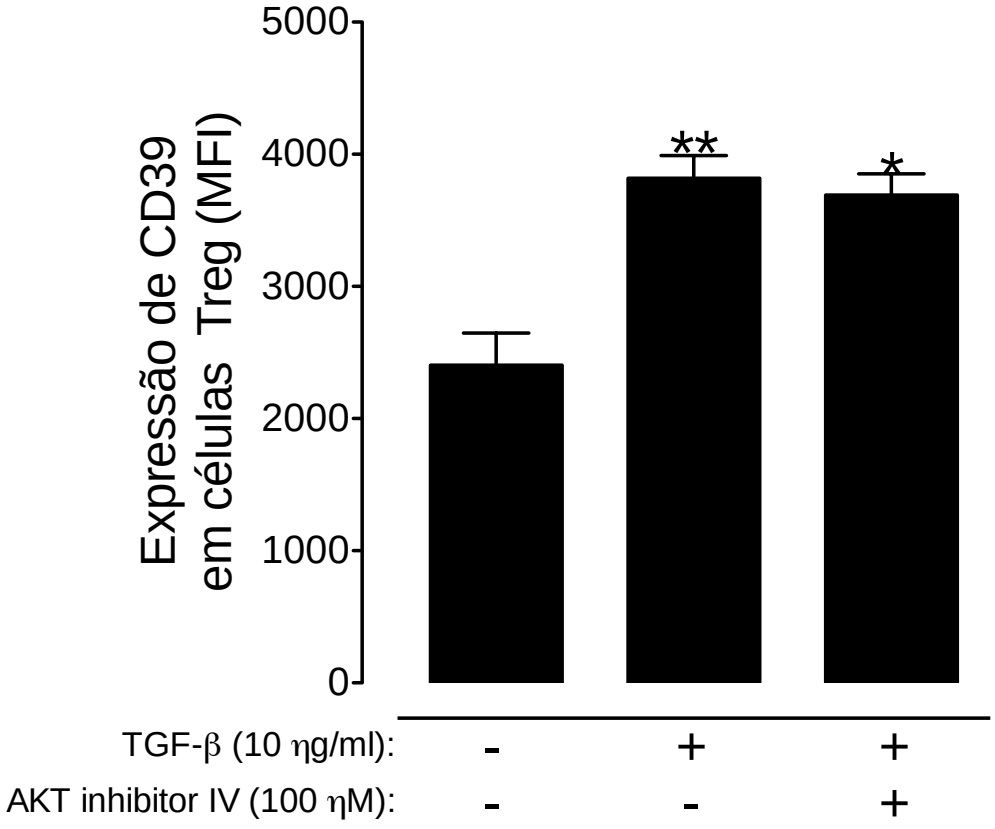


Figura 23- Aumento da expressão de CD39 em células Tregs mediado por TGF-β é independente da atividade de AKT. Células Tregs foram isoladas de doadores saudáveis (n = 4) e incubadas com estímulo policlonal e TGF-β (10 ηg/ml) na presença ou não de inibidor da atividade de AKT (AKT inhibitor IV; 100 ηM) por 48h. Gráfico demonstra a expressão de CD39 por MFI em células Tregs.**P <0.01. *P <0.05.

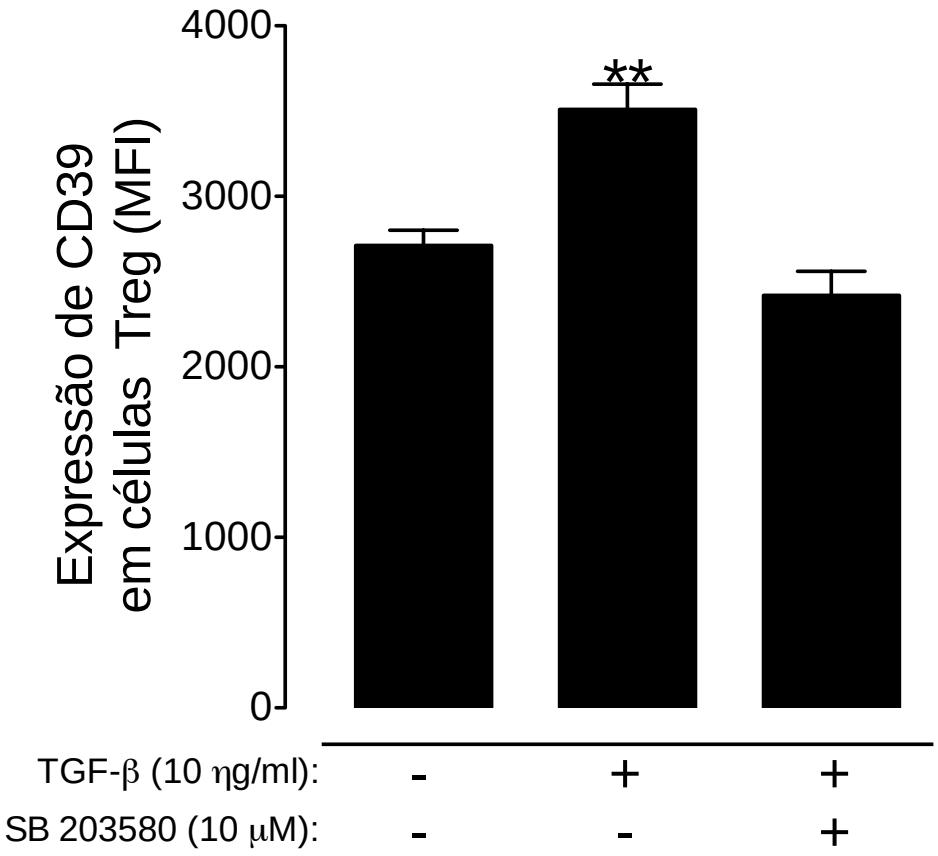


Figura 24- Indução da expressão de CD39 em células Tregs por TGF-β é dependente da atividade de p38. Células Tregs foram isoladas de doadores saudáveis (n = 4) e incubadas com estímulo policlonal e TGF-β (10 ηg/ml) na presença ou não de inibidor da atividade de p38 (SB 203580; 10 μM) por 48h. Gráfico demonstra a expressão de CD39 por MFI em células Tregs.**P <0.01.

Assim, o conjunto destes resultados apresentados demonstra que o aumento da expressão de CD39 em células Tregs por TGF-β está associado com a ativação seguinte das moléculas: dos receptores de TGF-β, TGFBRII e TGFBRI, do translocador de sinal SMAD2 e do fator de transcrição CREB, cuja ativação é dependente da atividade de p38. Esses achados relatam informações relevantes para a compreensão dos mecanismos moleculares que controlam a função supressora de células Tregs e representam um racional de investigação para associar possíveis alterações na expressão e/ou ativação destas proteínas com a expressão reduzida de CD39 em células Tregs oriundas de pacientes UR-MTX.

4.4. Influência da variabilidade dos níveis basais de expressão de CD39 na diferenciação de células Tregs

Mesmo na população saudável existe uma variação dos níveis de CD39 em células Tregs, visto que podemos identificar indivíduos com a expressão de CD39 reduzida e indivíduos em que a molécula é normalmente/altamente expressa (Figura 8D) (Rissiek et al., 2015). Com base nestes dados, a próxima etapa do presente estudo foi investigar se estas variações de expressão de CD39 poderiam influenciar na diferenciação de Tregs bem como na potencialização da indução da expressão de CD39 através da estimulação com TGF-β. Neste contexto, nós realizamos o protocolo de diferenciação de células Tregs *in vitro* a partir de células T *naives* oriundas tanto de indivíduos saudáveis que apresentavam níveis previamente conhecidos de expressão reduzida de CD39 em Tregs circulantes quanto de indivíduos que possuem a molécula altamente expressa neste tipo celular. Os indivíduos utilizados neste experimento foram selecionados de acordo com os valores de MFI de CD39 em Tregs obtidos durante a realização do estudo longitudinal em pacientes com AR, descrito anteriormente (detalhes na seção de Metodologia).

Em relação à diferenciação de células Tregs, analisando separadamente os grupos de indivíduos com expressão alta ou reduzida de CD39, notamos que a estimulação com TGF-β induziu a polarização de células T *naives* em células Tregs ($CD4^{+}FOXP3^{+}$) em ambos grupos de indivíduos (CD39 alto e CD39 reduzido) de forma independente da concentração utilizada (3 ηg/ml, 10 ηg/ml ou 30 ηg/ml) (Figura 25, A-C). Entretanto, observamos que houve uma maior capacidade de diferenciação de células Tregs em células oriundas de indivíduos que apresentavam alta expressão de CD39 (Figura 25, A-C). Em adição, utilizando um inibidor de atividade de CD39 (iCD39, ARL67156) durante o protocolo de diferenciação de células Tregs, verificamos que a maior taxa de diferenciação de células Tregs observada anteriormente em indivíduos com alta expressão de CD39 foi revertida, evidenciada por valores similares ao de indivíduos com expressão reduzida de CD39 sem adição do inibidor de CD39 na cultura, o que sugere que a atividade do CD39 potencializa a capacidade de diferenciação de células Tregs *in vitro* (Figura 26).

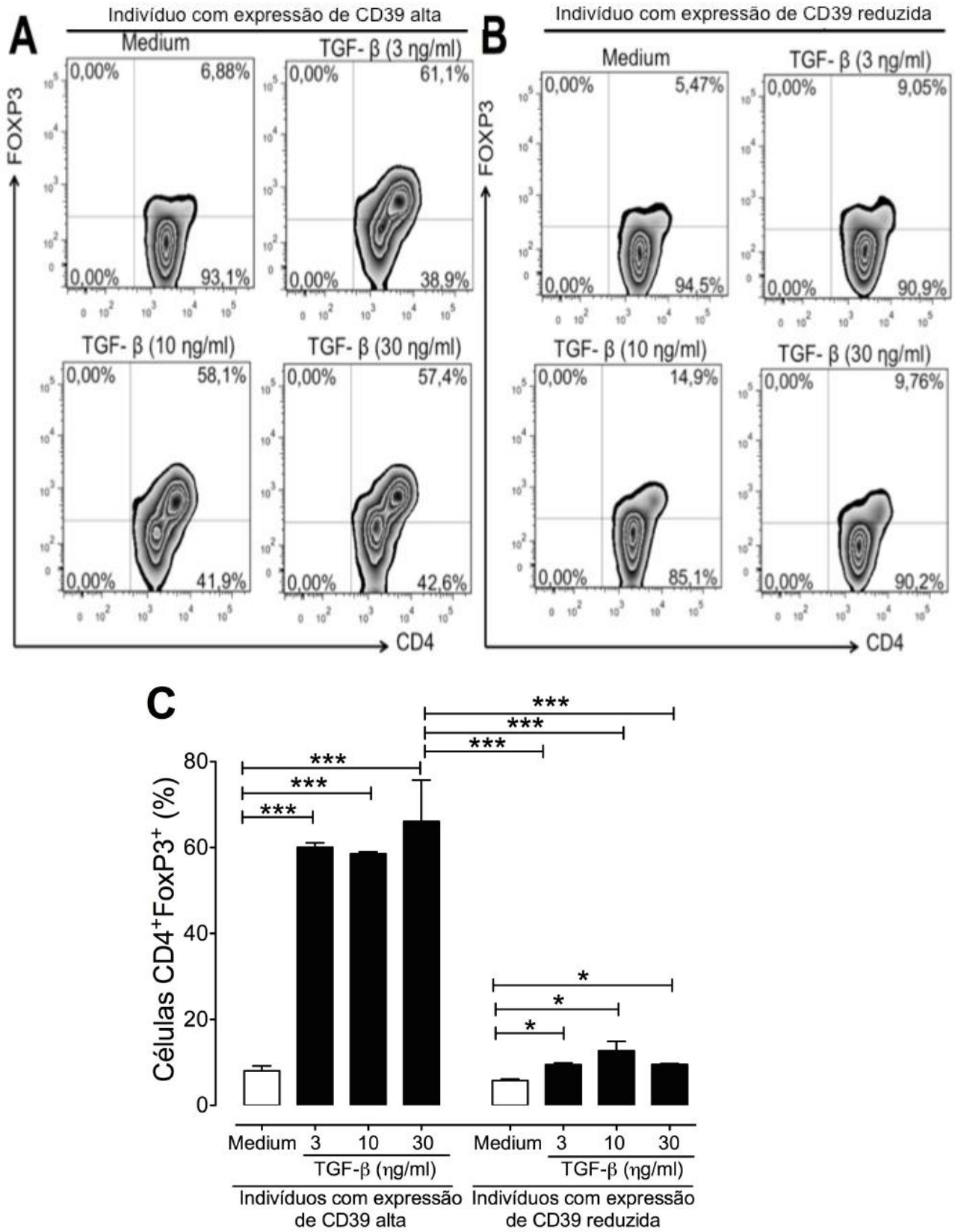


Figura 25- Diferenciação de células Tregs *in vitro* de indivíduos que possuem diferentes níveis de expressão de CD39. Células $CD4^+$ *naives* ($CD4^+CD45RA^+$) foram isoladas de doadores saudáveis que apresentavam níveis variáveis de expressão de CD39 previamente conhecidos em células Tregs circulantes. As células $CD4^+$ *naives* foram incubadas com

estímulo policlonal, diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml) por 4 dias. (A) Dot plots representativos demonstrando a porcentagem de células Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) diferenciadas de um indivíduo saudável com a expressão de CD39 alta em Tregs. (B) Dot plots representativos demonstrando a porcentagem de células Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) diferenciadas de um indivíduo saudável com a expressão de CD39 reduzida em Tregs. (C) Quantificação da frequência de células Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) diferenciadas de indivíduos saudáveis (n = 4 por grupo) com a expressão de CD39 alta ou reduzida em Tregs. *P <0.05. ***P <0.001.

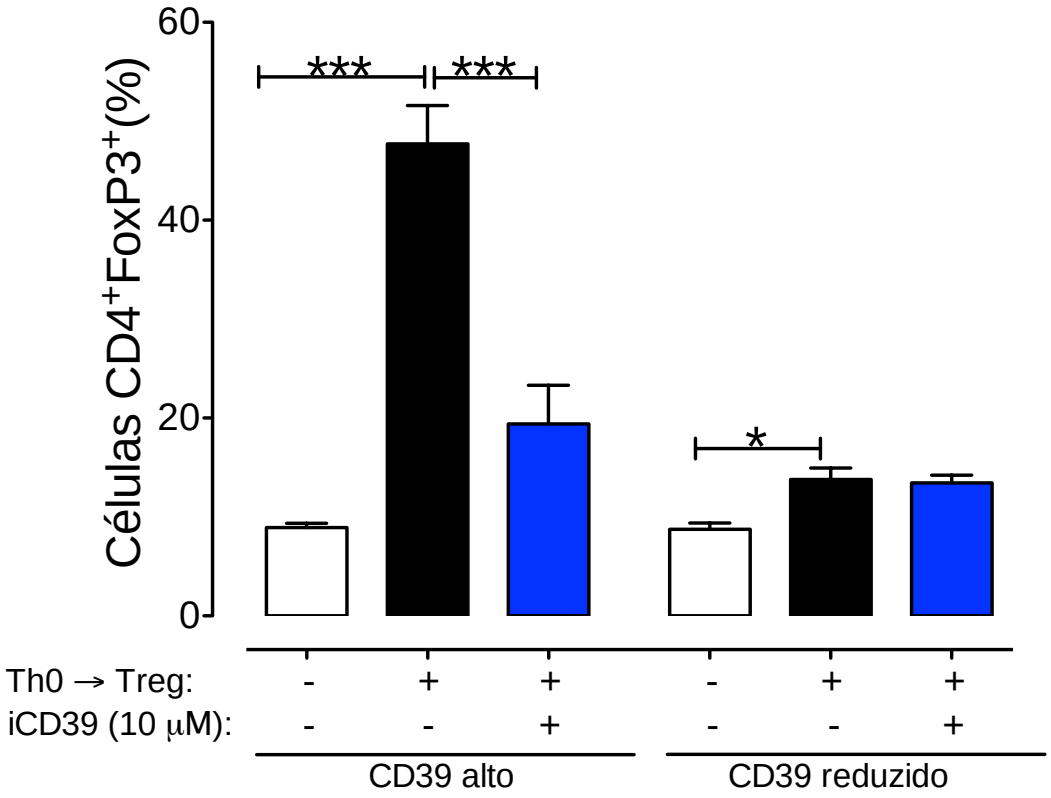


Figura 26- Efeito da atividade do CD39 na diferenciação *in vitro* de células Tregs. Células $CD4^+$ *naives* ($CD4^+CD45RA^+$) foram isoladas de doadores saudáveis que apresentavam níveis variáveis de expressão de CD39 previamente conhecidos em células Tregs circulantes. As células $CD4^+$ *naives* foram incubadas com estímulo policlonal na presença ou não de coquetel de citocinas polarizantes para diferenciação de Tregs (TGF-β, 10 ηg/ml; IL-2, 10 ηg/ml) e inibidor da atividade de CD39 (iCD39, ARL67156) por 4 dias. Quantificação da frequência de células Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) diferenciadas de indivíduos saudáveis (n = 4 por grupo) com a expressão de CD39 alta ou reduzida em Tregs e incubadas ou não com iCD39 durante o protocolo de diferenciação. *P <0.05. ***P <0.001.

Adicionalmente, com o intuito de entender o papel do CD39 na potencialização da diferenciação de células Tregs, uma das nossas hipóteses é que indivíduos com alta expressão de CD39 possuem um maior aporte na produção de ADO extracelular durante o processo de diferenciação, e como consequência, há uma maior diferenciação de células Tregs devido a atividade da ADO, que é descrita na literatura por ser um potencializador da diferenciação de células Tregs *in vitro* por um mecanismo dependente do receptor A2a (Ohta et al., 2012). Com base nestas informações, nós realizamos novamente o protocolo de diferenciação de células Tregs com células de indivíduos com alta ou reduzida expressão de CD39 na presença ou não de um agonista do receptor A2a (10 µM, NECA). Como podemos observar na figura 27, notamos que a incubação simultânea com NECA culminou em um aumento da diferenciação de células Tregs nos dois grupos de indivíduos. Porém, ressalta-se que quando a cultura de indivíduos com expressão reduzida de CD39 foi suplementada com NECA, a capacidade de diferenciação de células Tregs foi similar a de indivíduos com alta expressão de CD39 incubadas somente com o coquetel de citocinas polarizantes para a diferenciação de células Tregs, indicando que o comprometimento da capacidade diferenciação de células Tregs de indivíduos com expressão reduzida de CD39 pode ser revertido com adição de um agonista do receptor A2a, visto que a incubação com NECA promove um *by-pass* à atividade do CD39 em gerar ADO extracelular.

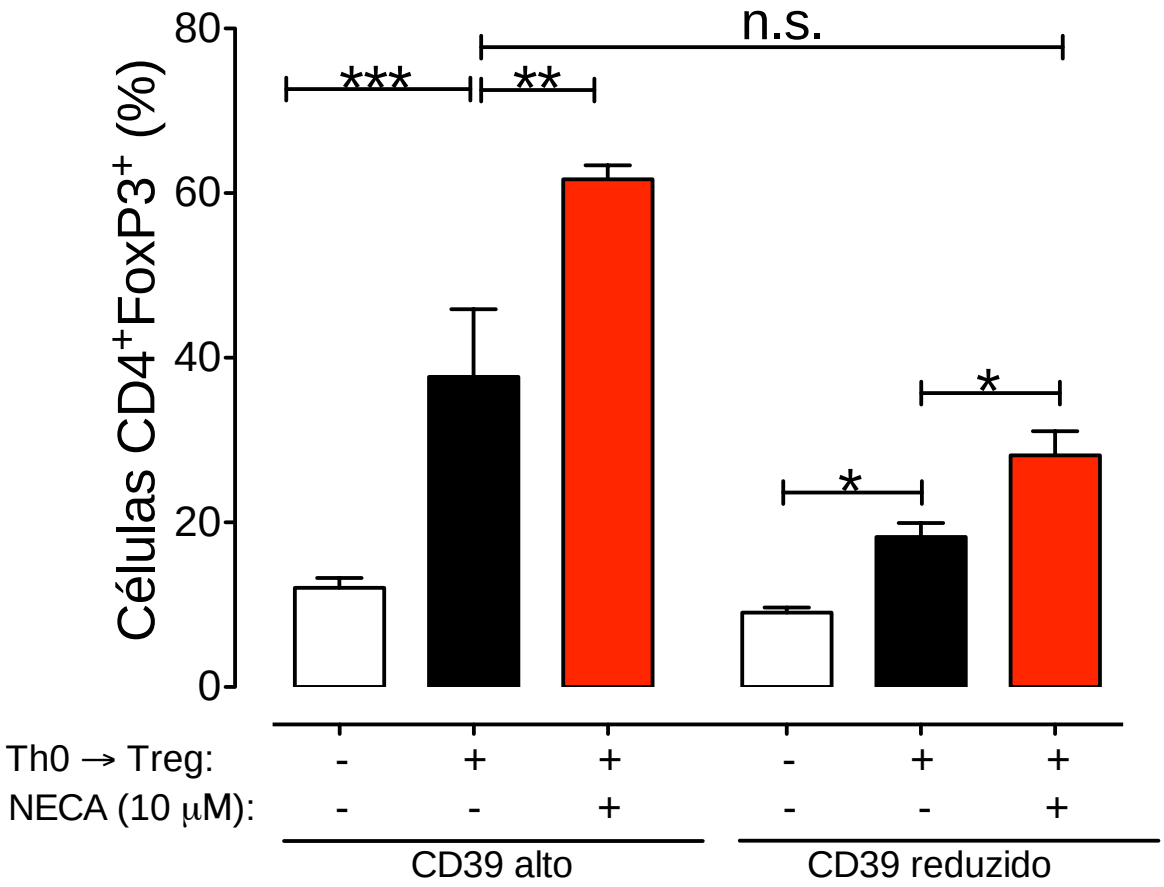


Figura 27- Administração de agonista do receptor A2a restaura a capacidade de diferenciação de células Tregs *in vitro* de indivíduos com expressão reduzida de CD39. Células $CD4^+$ *naives* ($CD4^+CD45RA^+$) foram isoladas de doadores saudáveis que apresentavam níveis variáveis de expressão de CD39 previamente conhecidos em células Tregs circulantes. As células $CD4^+$ *naives* foram incubadas com estímulo policlonal na presença ou não de coquetel de citocinas polarizantes para diferenciação de Tregs (TGF-β, 10 ηg/ml; IL-2, 10 ηg/ml) e agonista do receptor de adenosina A2a (NECA) por 4 dias. Quantificação da frequência de células Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) diferenciadas de indivíduos saudáveis (n = 4 por grupo) com a expressão de CD39 alta ou reduzida em Tregs e incubadas ou não com NECA durante o protocolo de diferenciação. *P <0.05. ***P <0.001. n.s., não significante.

4.5. Influência da variabilidade dos níveis basais de expressão de CD39 na promoção do aumento de CD39 em Tregs através da estimulação com TGF-β

No presente estudo, também avaliamos o efeito da estimulação com TGF-β em promover o aumento da expressão de CD39 em células Tregs diferenciadas *in vitro* de indivíduos com expressão alta e reduzida de CD39. Como podemos observar na figura 28, a estimulação com TGF-β em diferentes concentrações durante o protocolo de diferenciação de células Tregs promoveu um aumento da expressão de CD39 em indivíduos conhecidos por apresentar CD39 altamente expresso (Figura 28A, Figura 29). Em contrapartida, indivíduos com expressão reduzida de CD39 em células Tregs apresentaram um comprometimento em promover o aumento da expressão de CD39 mediado por TGF-β durante o protocolo de diferenciação (Figura 28B, Figura 29), sugerindo que possíveis alterações quanto à expressão e/ou ativação de moléculas da cascata de sinalização desencadeada por TGF-β culminam em uma resposta deficiente na promoção do aumento da expressão de CD39 em Tregs. Ainda, essas alterações podem estar relacionadas com a expressão reduzida em níveis basais de CD39 observada nestes indivíduos.

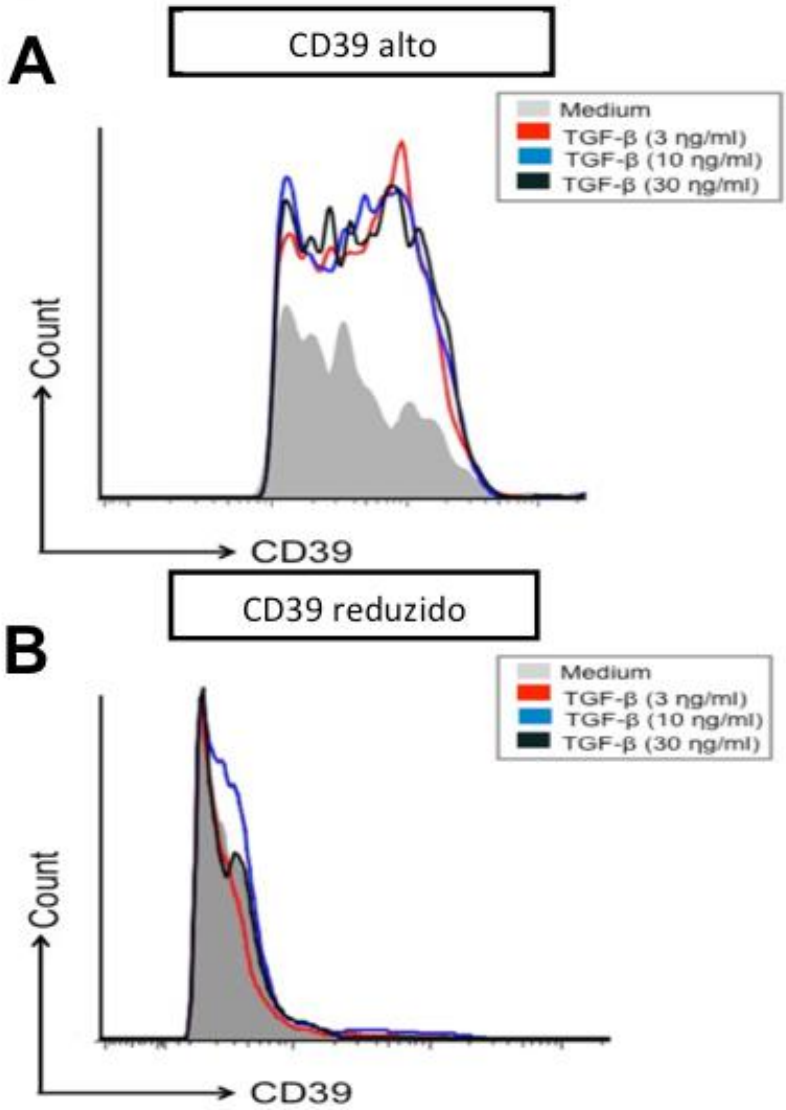


Figura 28- Efeito da estimulação por TGF-β no aumento da expressão de CD39 em células Tregs diferenciadas de indivíduos com níveis variáveis basais de expressão de CD39 em Treg circulantes. Células $CD4^+$ *naives* ($CD4^+CD45RA^+$) foram isoladas de doadores saudáveis (n = 4 por grupo) que apresentavam níveis variáveis basais de expressão de CD39 previamente conhecidos em células Tregs circulantes. As células $CD4^+$ *naives* foram incubadas com estímulo policlonal, diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml) por 4 dias. (A) Histograma representativo da expressão de CD39 de um indivíduo saudável com expressão de CD39 alta em células Tregs diferenciadas com diferentes concentrações de TGF-β. (B) Histograma representativo da expressão de CD39 de indivíduo saudável com expressão de expressão de CD39 reduzida em células Tregs diferenciadas com diferentes concentrações de TGF-β.

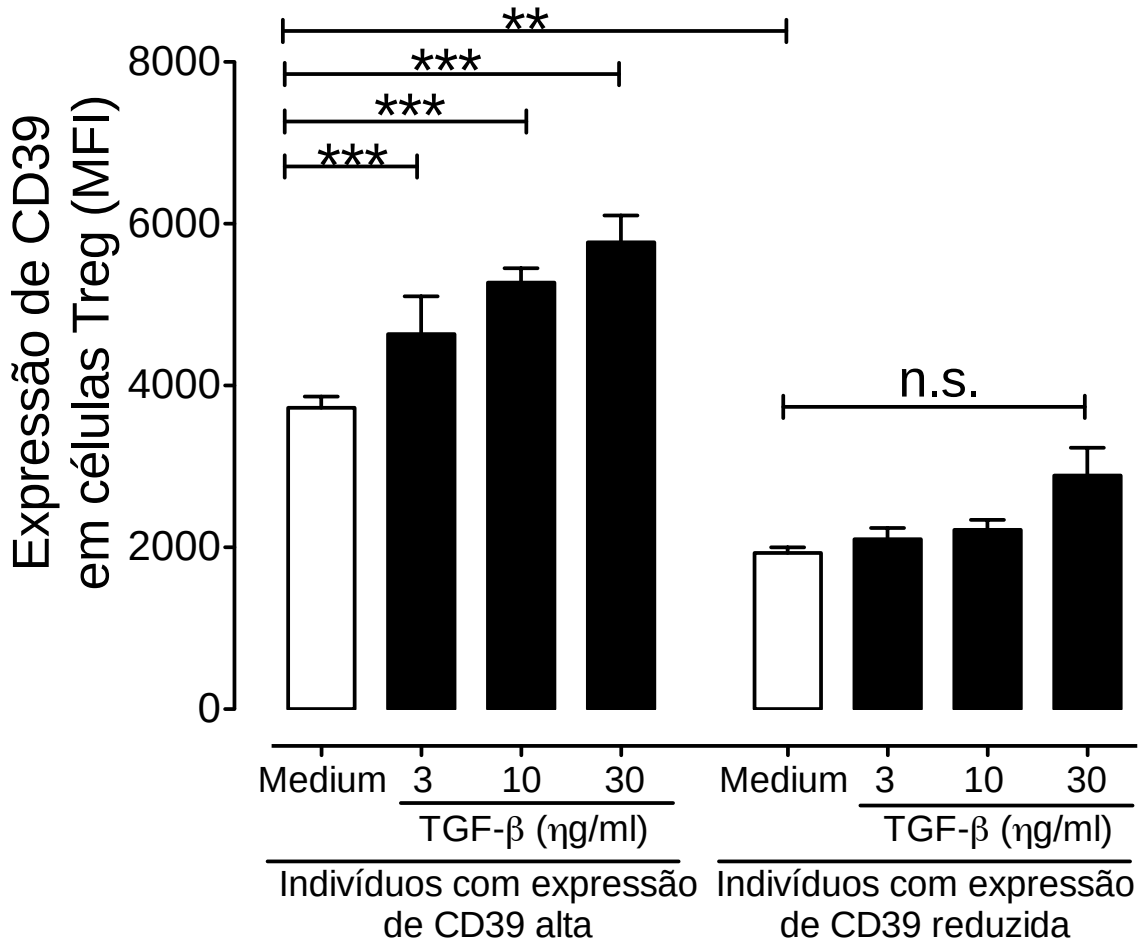


Figura 29- Expressão de CD39 em células Tregs diferenciadas com diferentes concentrações de TGF-β em indivíduos com níveis variáveis basais de expressão de CD39 em Treg circulantes. Células $CD4^+$ *naives* ($CD4^+CD45RA^+$) foram isoladas de doadores saudáveis (n = 4 por grupo) que apresentavam níveis variáveis basais de expressão de CD39 previamente conhecidos em células Tregs circulantes. As células $CD4^+$ *naives* foram incubadas com estímulo policlonal, diferentes concentrações de TGF-β (3 ηg/ml; 10 ηg/ml; 30 ηg/ml) e IL-2 (10 ηg/ml) por 4 dias. Quantificação da expressão de CD39 em células Tregs diferenciadas com diferentes concentrações de TGF-β de indivíduos saudáveis com expressão alta ou reduzida de CD39. **P <0.01. ***P <0.001. n.s., não significante.

4.6. Análise da expressão de moléculas envolvidas com o aumento da expressão de CD39 em células Tregs de pacientes UR-MTX

Como mencionado anteriormente, nós demonstramos que a estimulação com TGF-β promoveu um aumento da expressão de CD39 em células Tregs através da participação/ ativação das seguinte moléculas: dos receptores TGFBRII e TGFBRI, do translocador de sinal SMAD2 e do fator de transcrição CREB. Além disso, identificamos que indivíduos que possuem níveis basais de expressão de CD39 reduzidos em Tregs circulantes apresentaram um comprometimento na promoção do aumento da expressão de CD39 em células Tregs mediado por TGF-β e também na capacidade de diferenciação destas células *in vitro*. Assim, é plausível que possíveis alterações na expressão e/ou ativação destas moléculas envolvidas com a indução da expressão de CD39 em células Tregs estão associadas com a expressão reduzida de CD39 em Tregs de pacientes UR-MTX. Dentro deste contexto, nosso próximo objetivo foi quantificar a expressão destas moléculas em células isoladas de pacientes R-MTX e pacientes UR-MTX. As características clínicas dos pacientes recrutados no estudo estão representadas na Tabela 3 presente na seção de Metodologia.

Primeiramente, uma destas alterações poderia estar relacionada com uma diminuição dos níveis do próprio estímulo para indução da expressão de CD39, no caso o TGF-β, em pacientes UR-MTX. Como podemos observar na figura 30, não foram observadas diferenças significativas quanto aos níveis de TGF-β no plasma dos grupos analisados, descartando essa possível associação. Posteriormente, nós quantificamos por PCR em tempo real em células $CD4^+$ isoladas do sangue de pacientes com AR as moléculas identificadas anteriormente por induzir a expressão de CD39 em células Tregs via TGF-β. Adicionalmente, nestes experimentos nós também realizamos a quantificação de outras moléculas descritas na literatura por modular a sinalização de TGF-β ou mesmo a expressão de CD39 em outros tipos celulares: SMAD7 (*Mothers against decapentaplegic homolog 7*), que consiste em uma proteína reguladora da atividade de SMAD2, que inibe a translocação de sinais por SMAD2 (Yan et al., 2009); GFI-1 (*growth factor independent 1*),

descrita por modular negativamente a expressão de CD39 em células $CD4^+$ (Chalmin et al., 2012); p38, cuja atividade está relacionada com a inibição funcional de GFI-1, amplificando assim a transcrição do gene que codifica o CD39 (Chalmin et al., 2012).

Desta maneira, enquanto que não identificamos diferenças significativas entre os grupos analisados quanto aos níveis de expressão gênica de TGFBRI, SMAD2, GFI-1 e p-38 (Figura 31A, 31B, 31C e 31D, respectivamente), observamos que pacientes UR-MTX apresentaram uma redução significativa de TGFBRII, CREB e SMAD7 em células $CD4^+$ isoladas do sangue (Figura 32A, 32B e 32C, respectivamente). Assim, esses achados demonstram que um comprometimento da cascata de sinalização mediado por TGF-β está relacionado com a expressão reduzida de CD39 em células Tregs, visto que pacientes UR-MTX apresentaram uma redução do receptor TGFBRII, que é necessariamente a molécula *up-stream* envolvida com o fenômeno de indução da expressão de CD39 em células Tregs por TGF-β. Ainda, com base nestes achados, a expressão reduzida de SMAD7 observada em pacientes UR-MTX é esperada, visto que a expressão de SMAD7 é induzida através da própria estimulação com TGF-β como um mecanismo regulatório de *feedback* negativo da cascata de sinalização (Yan et al., 2009).

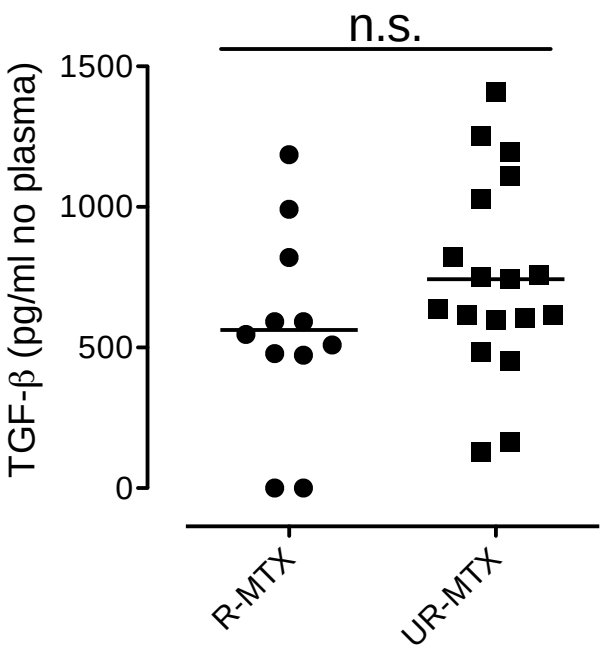


Figura 30- Níveis de TGF-β no plasma de pacientes com AR. Plasma de pacientes R-MTX (n = 11) e pacientes UR-MTX (n = 18) foram coletados para dosagem de TGF-β por ELISA. Gráfico demonstra os níveis de TGF-β no plasma dos grupos analisados. n.s., não significante.

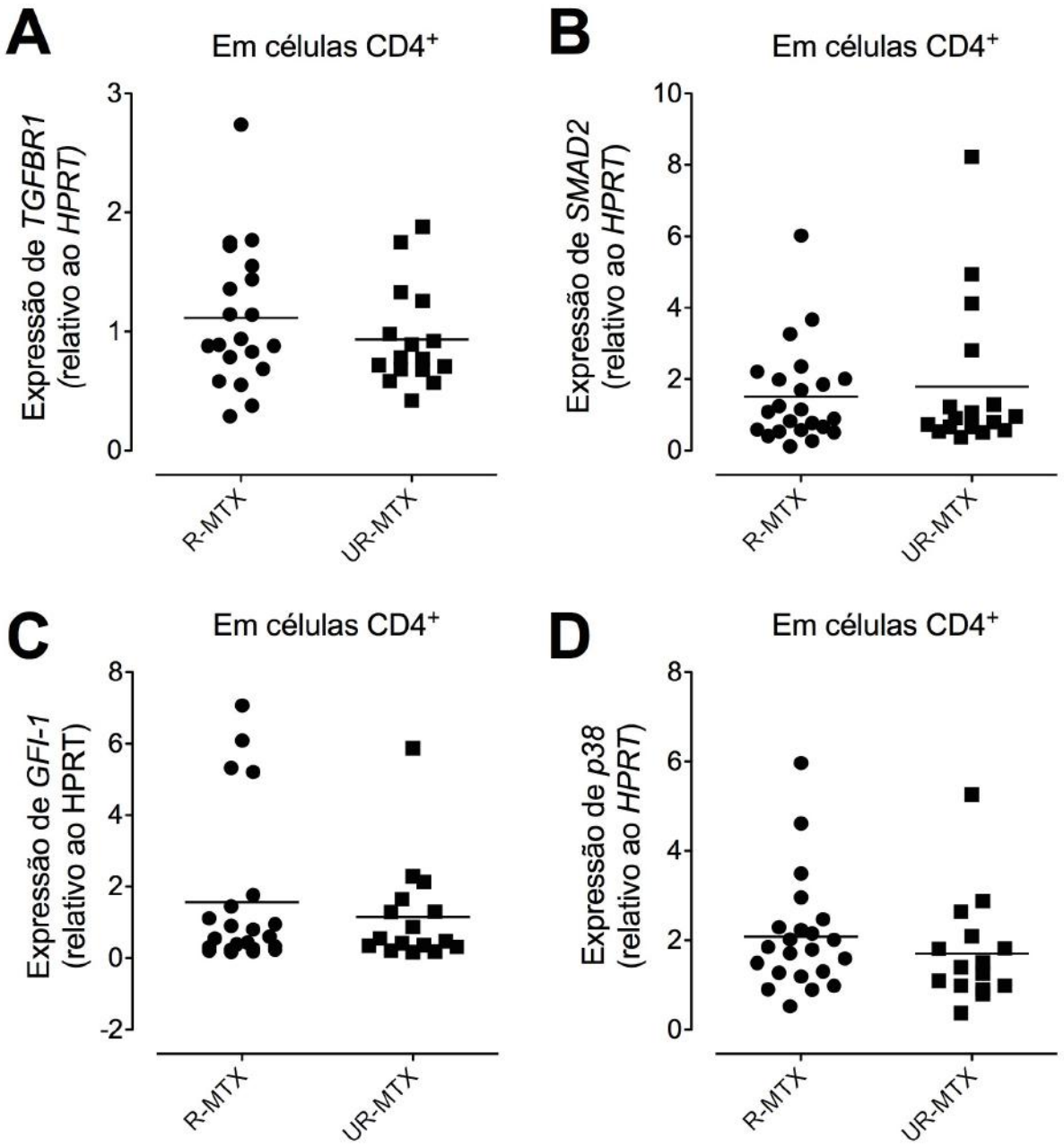


Figura 31- Expressão por PCR em tempo real de moléculas relacionadas com a indução de CD39 por TGF-β em células CD4$^+$ de pacientes com AR. (A-D) Expressão por PCR em tempo real de TGFBRI (A), SMAD2 (B), GFI-1 (C) e p-38 (D) em células CD4$^+$ isoladas do sangue de pacientes R-MTX (n = 23) e pacientes UR-MTX (n = 17).

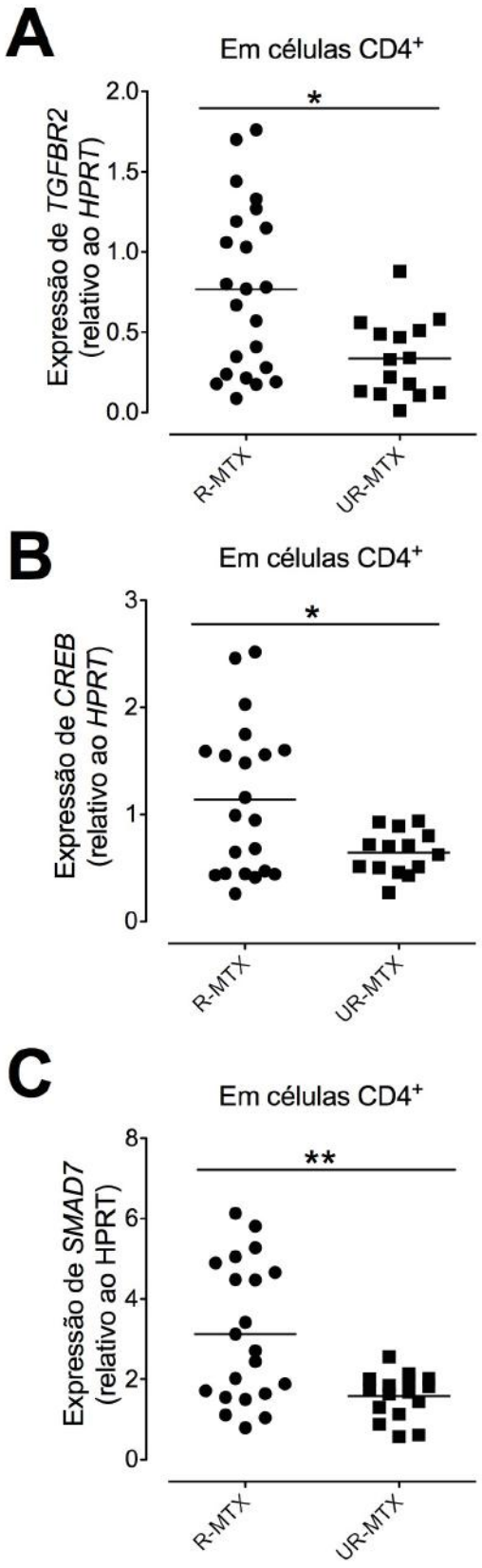


Figura 32- Expressão por PCR em tempo real de moléculas relacionadas com a indução de CD39 por TGF-β em células CD4$^+$ de pacientes com AR. (A-C) Expressão por PCR em tempo real de TGFBRII (A), CREB (B) e SMAD7 (C) em células CD4$^+$ isoladas do sangue de pacientes R-MTX (n = 23) e pacientes UR-MTX (n = 17). *P <0.05. **P <0.01.

Com intuito de associar os níveis de expressão de TGFBRII e CREB à redução da expressão de CD39 observada em Tregs em pacientes UR-MTX, nós realizamos análises de correlação da expressão pareada de CD39, TGFBRII e CREB em células isoladas dos pacientes com AR. Deste modo, nós observamos que existe uma correlação positiva entre a expressão de TGFBRII e CREB; e a expressão de TGFBRII e CD39 (Figura 33A e 33B, respectivamente), isto é, pacientes que apresentaram níveis reduzidos de CD39, como pacientes UR-MTX, também apresentaram níveis reduzidos de expressão tanto de TGFBRII quanto CREB, o que sugere que a redução dos níveis de expressão de CD39 em Tregs de pacientes UR-MTX está associada principalmente à um comprometimento da capacidade de induzir CD39 através da cascata de sinalização de TGF-β.

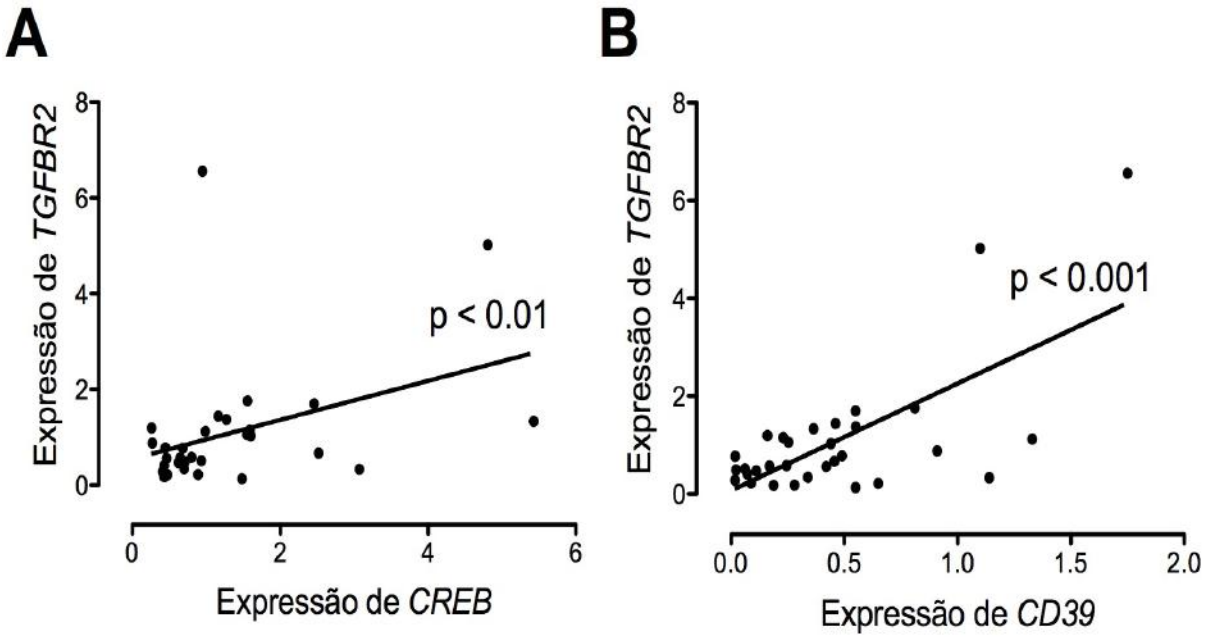


Figura 33- Correlações da expressão de TGFBRII, CREB e CD39 em células CD4$^+$ isoladas de pacientes com AR. (A-B) Análise de correlação referente à expressão por PCR em tempo real de TGFBRII e CREB R=0.46 (A); e entre TGFBRII e CD39 R=0.42 (B) em células CD4$^+$ isoladas do sangue de pacientes com AR (n = 31).

Posteriormente aos experimentos utilizando PCR em tempo real, nós avaliamos a expressão por Western Blot das proteínas ativadas (fosforiladas) p-SMAD2 e p-CREB que participam do fenômeno de indução de expressão de CD39 por TGF-β. Para isso, nós primeiramente isolamos células Tregs de indivíduos saudáveis que possuem tanto expressão alta quanto reduzida de CD39 e as incubamos com TGF-β conforme o protocolo padrão de indução de CD39. Como pode ser observado na figura 34, indivíduos com alta expressão de CD39 apresentaram um aumento da expressão em nível basal (sem nenhuma estimulação) de CREB fosforilada (p-CREB) e CREB total, comparados com indivíduos com expressão reduzida de CD39 (Figura 34, A-C). Ainda, apesar de o estímulo com TGF-β (10 ηg/ml) ter aumentado a expressão de p-CREB em ambos os grupos analisados, observamos também que indivíduos com alta expressão de CD39 apresentaram mesmo com a estimulação de TGF-β uma expressão aumentada de p-CREB e CREB total em relação aos indivíduos com expressão reduzida de CD39. Ressalta-se que este aumento de p-CREB foi revertido similarmente aos níveis basais de p-CREB observados anteriormente em ambos grupos de indivíduos quando o inibidor de TGFBRI (SB431542, 10 μM) foi adicionado simultaneamente ao TGF-β na cultura (Figura 34, A-C). Em vista do exposto, indivíduos com expressão reduzida de CD39 em Tregs circulantes possuem também níveis reduzidos basais e mesmo após estimulação com TGF-β de p-CREB e CREB total.

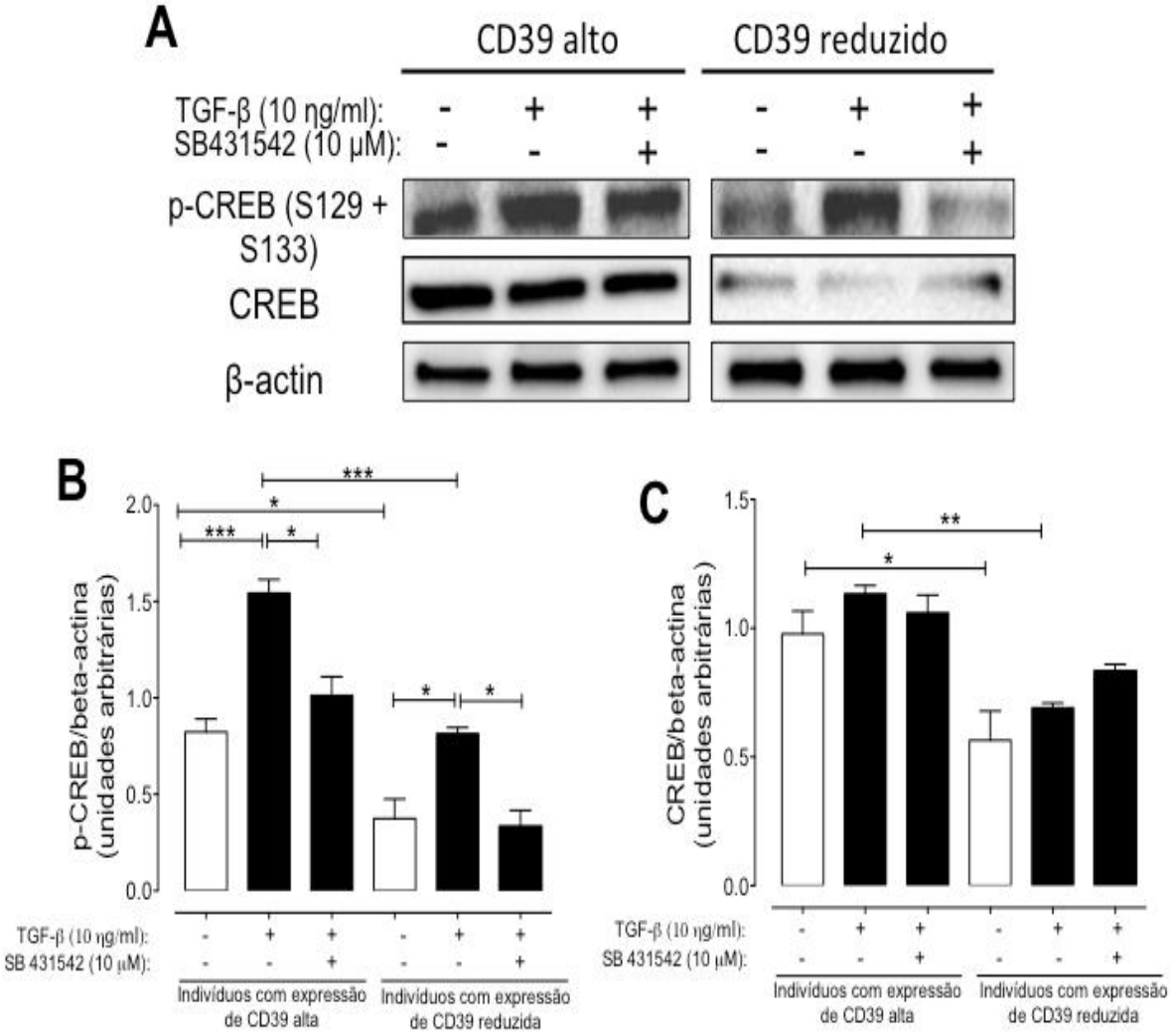


Figura 34- Expressão de p-CREB e CREB total em células Treg isoladas de indivíduos com níveis variáveis de expressão de CD39. Células Tregs foram isoladas do sangue de doadores saudáveis (n = 3 por grupo) que apresentavam níveis variáveis basais de expressão de CD39 previamente conhecidos em células Tregs circulantes e incubadas com anti-CD3 (3 μg/ml), anti-CD28 (1,5 μg/ml), TGF-β (10 ηg/ml) simultaneamente ou não com inibidor seletivo de TGFBRI (SB 431542; 10 μM) por 48h. (A) Imagem representativa do Western Blot mostrando a expressão de p-CREB, CREB total e beta-actina (controle endógeno) de células Tregs estimuladas ou não com TGF-β (10 ηg/ml) de doadores saudáveis que apresentavam níveis variáveis basais de expressão de CD39 previamente conhecidos em células Tregs circulantes. (B) Quantificação da expressão de p-CREB relativa à expressão de beta-actina. (C) Quantificação da expressão de CREB total relativa à expressão de beta-actina. *P <0.05. **P <0.01. ***P <0.001.

Além das análises em indivíduos saudáveis que expressam níveis variáveis de CD39 em Treg circulantes, nós também avaliamos a expressão das proteínas fosforiladas por Western Blot em células Tregs isoladas do sangue de pacientes com AR. Ressalta-se que estas células não foram submetidas a nenhum tipo de estimulação (como por exemplo TGF-β) em cultura, ou seja, os níveis de expressão das proteínas analisadas nestas amostras de pacientes correspondem aos níveis basais de expressão destas moléculas nas células destes pacientes. Desta maneira, similarmente ao observado em indivíduos saudáveis com expressão reduzida de CD39, verificamos que pacientes UR-MTX apresentaram uma redução da expressão de p-CREB e CREB total em células Tregs quando comparados aos pacientes R-MTX (Figura 35, A-C). Adicionalmente, apesar de que os níveis de expressão proteica de SMAD2 total foram similares entre os grupos de pacientes analisados, pacientes UR-MTX também apresentaram uma redução da expressão dos níveis de p-SMAD2 em células Tregs comparados com pacientes R-MTX (Figura 36, A-C), sugerindo que a expressão reduzida observada anteriormente do receptor TGFBRII (molécula *up-stream* da cascata de sinalização de TGF-β) em pacientes UR-MTX culmina em um comprometimento da capacidade de indução da expressão de CD39 por TGF-β, evidenciado pela redução da ativação de SMAD2 e CREB em células Tregs.

Em suma, os resultados do presente estudo além de identificar que a expressão de CD39 em células Tregs é um biomarcador capaz de predizer a resposta ao tratamento com MTX, também demonstraram as bases moleculares envolvidas com a indução da expressão de CD39 em Tregs através da estimulação com TGF-β, e por fim, determinaram que indivíduos/pacientes apresentando uma expressão reduzida de CD39 em células Tregs, isto é, não respondedores ao MTX, possuem um comprometimento intrínseco em desencadear a cascata de sinalização mediada por TGF-β. Este comprometimento da indução da cascata de sinalização via TGF-β está associado com uma expressão reduzida de TGBFRII, e consequentemente, uma menor ativação (fosforilação) mesmo em condições basais das moléculas (SMAD2 e CREB) envolvidas na indução de expressão de CD39 em células Tregs.

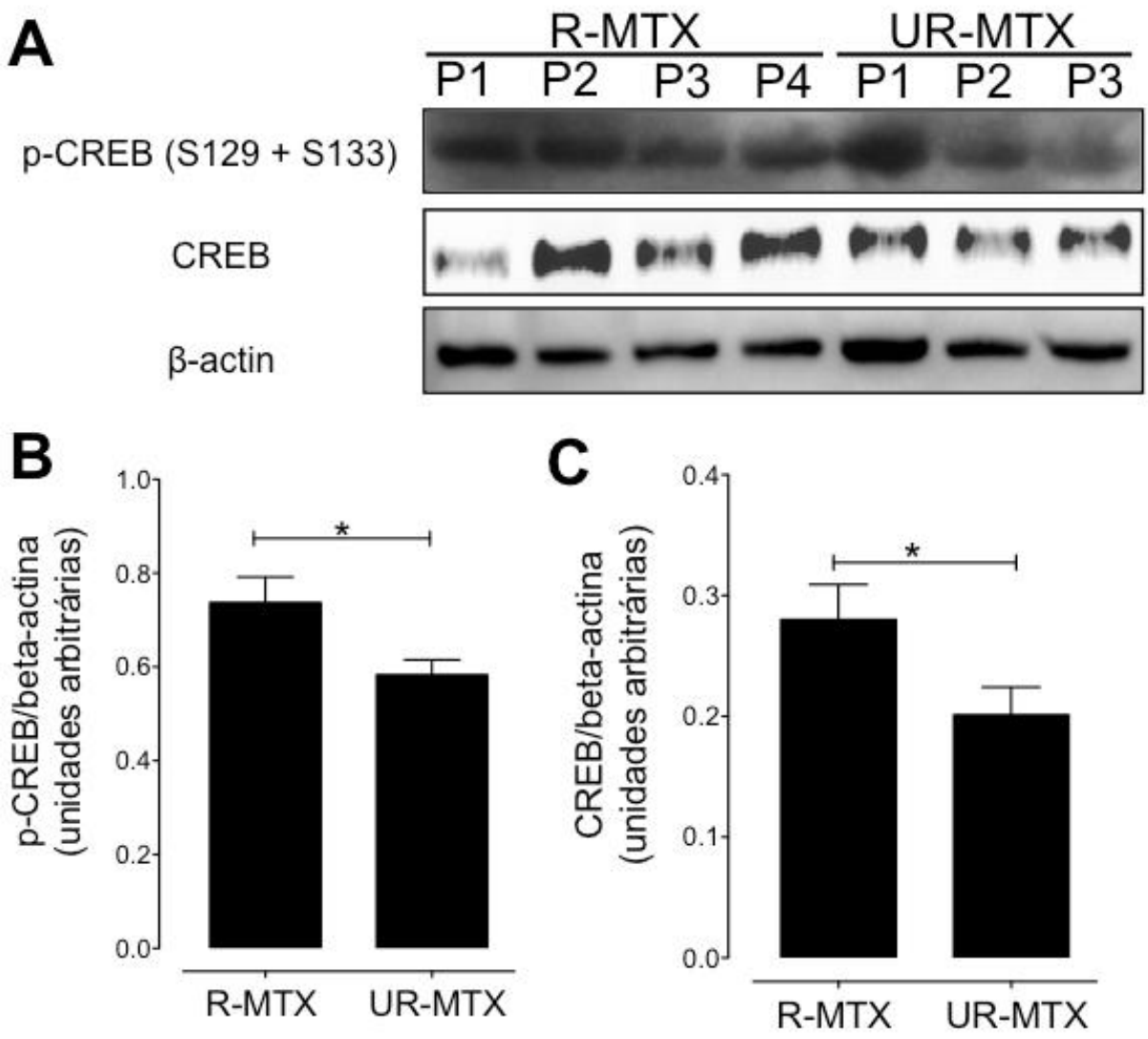


Figura 35- Expressão de p-CREB e CREB total em células Tregs isoladas de pacientes com AR. Células Tregs foram isoladas do sangue pacientes R-MTX (n = 7) e UR-MTX (n = 6) com AR e avaliadas a expressão proteica de p-CREB e CREB total por Western Blot. (A) Imagem representativa do Western Blot mostrando a expressão de p-CREB, CREB total e beta-actina (controle endógeno) de células Tregs de pacientes com AR. (B) Quantificação da expressão de p-CREB relativa à expressão de beta-actina. (C) Quantificação da expressão de CREB total relativa à expressão de beta-actina. *P <0.05.

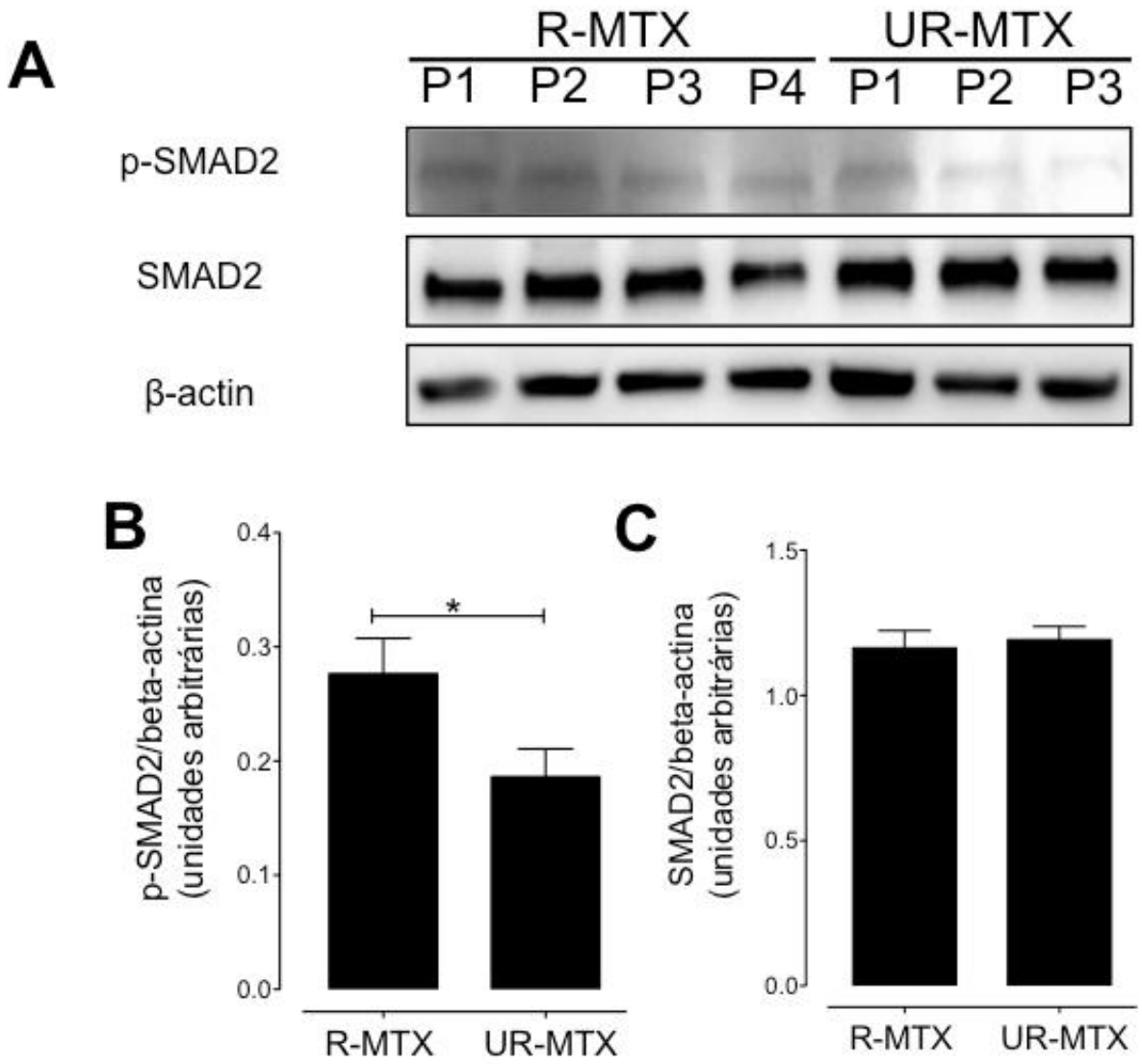


Figura 36- Expressão de p-SMAD2 e SMAD2 total em células Tregs isoladas de pacientes com AR. Células Tregs foram isoladas do sangue pacientes R-MTX (n = 7) e UR-MTX (n = 6) com AR e avaliadas a expressão proteica de p-SMAD2 e SMAD2 total por Western Blot. (A) Imagem representativa do Western Blot mostrando a expressão de p-CREB, CREB total e beta-actina (controle endógeno) de células Tregs de pacientes com AR. (B) Quantificação da expressão de p-SMAD2 relativa à expressão de beta-actina. (C) Quantificação da expressão de SMAD2 total relativa à expressão de beta-actina. *P <0.05.

5- DISCUSSÃO

A compreensão dos mecanismos envolvidos com a falha de resposta aos medicamentos utilizados atualmente para o tratamento da AR bem como para outras doenças inflamatórias crônicas é de fundamental importância para otimizar e direcionar a conduta terapêutica e identificar potenciais novos biomarcadores para diagnóstico e prognóstico da doença além de novos alvos terapêuticos. Neste contexto, nós demonstramos através de uma abordagem imunológica os mecanismos envolvidos com a resistência ao tratamento da AR com MTX. Observamos que pacientes R-MTX tratados por pelo menos três meses com MTX, apresentam uma expansão de células Tregs circulantes expressando CD39. Por outro lado, identificamos que os pacientes que não respondem adequedamente ao tratamento (UR-MTX), não apresentam esta expansão das céulas Tregs após o tratamento e, ainda, apresentam uma redução nos níveis de expressão de CD39 nas Tregs circulantes. Estes achados demonstram uma capacidade reduzida de Tregs de pacientes UR-MTX em gerar ADO extracelular, o que culmina em um comprometimento suas funções supressoras. Em adição, demonstramos que a expressão de CD39 em células Tregs é um biomarcador apto a predizer a resposta terapêutica ao MTX, visto que pacientes UR-MTX apresentaram esta expressão reduzida de CD39 em células Tregs mesmo antes do início do tratamento com MTX. Posteriormente, nosso interesse foi identificar os mecanismos moleculares que explicam os motivos pelos quais os pacientes UR-MTX apresentam esta redução de CD39. Inicialmente, demonstramos que a ativação da via de sinalização do TGF-β através de TGFBRII/TGFBRI, SMAD2 e CREB é capaz de aumentar a expressão de CD39 nas células Tregs. Em vista disso, identificamos que a redução de expressão de CD39 em Tregs de pacientes UR-MTX é consequência de um comprometimento na ativação desta via de sinalização.

As células Tregs possuem um papel crucial na prevenção e controle de processos autoimunes. Assim, estudos acerca das funções de células Tregs têm se tornado um alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapias (Anderson & Isaacs, 2008). Alguns trabalhos descrevem déficits no número desse subtipo celular presente tanto na circulação

quanto na sinóvia de pacientes com AR (Van Amelsfort et al., 2004; Möttönen et al., 2005; Brusko et al., 2008). Em adição, dados na literatura também retratam falhas funcionais nos mecanismos de supressão (ex: produção de citocinas) e na expansão clonal das Tregs na AR e em outras desordens autoimunes, como esclerose múltipla e diabetes tipo 1 (Viglietta et al., 2004; Brusko et al., 2005; Lindley et al., 2005; Cribbs et al., 2014; Nadkarni et al., 2007; Nie et al., 2013). Em relação às Tregs $CD39^+$, estudos demonstram a importância desta população celular no controle de processos autoimunes em humanos. Pacientes com esclerose múltipla apresentam uma frequência reduzida de células $CD4^+FoxP3^+CD39^+$ no sangue periférico quando comparados com indivíduos saudáveis (Borsellino et al., 2007; Fletcher et al., 2009). Além disso, Tregs expressando CD39 possuem um grande potencial supressor de respostas celulares de padrão Th17, sendo que a contribuição do desequilíbrio entre as respostas de Th17/Tre$gCD39^+$ é sugerida no desenvolvimento e exacerbação de processos autoimunes (Fletcher et al., 2009; Peelen et al., 2011). Especificamnete para a AR, estudos descrevem que o comprometimento funcional das células Tregs pode ser restaurado após o tratamento adequado da doença com MTX ou imunobiológicos (Valencia et al., 2006; Nie et al., 2013; Cribbs et al., 2015). De fato, Cribbs et al. demonstraram que a administração de MTX interfere diretamente nos níveis de metilação do gene que codifica o fator de transcrição FoxP3, promovendo assim um consequente aumento de sua expressão e do gene que codifica CTLA-4, moléculas cruciais para o desenvolvimento e manutenção das funções supressoras das Tregs. No presente estudo, nós identificamos que células Tregs circulantes oriundas de pacientes UR-MTX apresentam um comprometimento funcional em controlar a proliferação de células T efetoras *in vitro* quando comparadas as de pacientes R-MTX e indivíduos saudáveis. Isto ocorre pelo fato dessas células apresentarem uma expressão reduzida de CD39, o que culmina em uma consequente redução na produção de ADO extracelular responsável por mediar a função supressora das Tregs e os efeitos anti-inflamatórios do MTX (Deaglio et al., 2007; Cronstein, 2005).

Além de focar na função supressora de células Tregs, outros estudos também estão engajados em descobrir novas estratégias terapêuticas que possibilitem o desenvolvimento de ferramentas que promovam a expansão e o aumento da sobrevivência de células Tregs *in vivo* (Brusko et al., 2008). Estes estudos demonstram que as drogas disponíveis para tratamento da AR também são capazes de expandir ou induzir células Tregs. No presente estudo, observamos que pacientes R-MTX apresentaram um aumento no número de células Tregs ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) circulantes expressando CD39 após o tratamento com MTX. Dados em modelo experimental de CIA dão suporte aos nossos achados, visto que também descrevem um aumento de células Tregs no sangue periférico de camundongos tratados com MTX (Xinqiang et al., 2010). Um outro exemplo é o infliximabe (anti-TNF), que foi demonstrado por ser capaz de induzir um aumento de células Tregs circulantes, as quais exercem suas funções supressoras por mecanismos dependentes de TGF-β e IL-10 (Nadkarni et al., 2007). Obviamente, como observado para o tratamento com MTX, é importante também determinar se o infliximabe possui capacidade de induzir a expansão de células Tregs expressando CD39 nos pacientes que responderam ao tratamento e se este efeito de expansão de Tregs $CD39^+$ pode ser observado após outros tipos de tratamentos.

A administração de MTX consiste na terapia padrão e de primeira linha empregada mundialmente para a AR (Singh et al., 2016). Esse cenário se deve ao fato de que a administração de MTX é, dentre as estratégias terapêuticas disponíveis para a AR, a que apresenta custos mais acessíveis para a população em geral e com níveis de segurança adequados, além de apresentar eficácia terapêutica similar (em termos de valores de porcentagem de resposta) a outras estratégias terapêuticas mais onerosas (Curtis & Singh, 2011; Joensuu et al., 2015). No entanto, uma percentagem significativa dos pacientes com AR (cerca de 40%) não respondem ao tratamento com MTX (Bansard et al., 2009). Atualmente, a classificação de um indivíduo em respondedor ou não ao MTX é realizada unicamente através de observações clínicas. Deste modo, o MTX é administrado por pelo

menos três meses na dose efetiva mínima de 15 mg/semana (De Rotte et al., 2013; Plant et al., 2014) e a remissão da doença é determinada por parâmetros clínicos após este período. Obviamente se o paciente for resistente ao tratamento haverá progressão dos danos articulares, que são irreversíveis e favorecem ~~a~~ um quadro de incapacidade locomotora. Assim, o desenvolvimento de um teste laboratorial que seja capaz de predizer a resistência ao tratamento com MTX tem grande importância clínica. De fato, outros estudos prévios ao nosso descreveram alguns possíveis biomarcadores de resposta ao MTX na AR mas que não foram implementados na prática clínica (Plant et al., 2014). Polimorfismos em genes de enzimas envolvidas na via de síntese *de novo* de purinas, como ~~na~~ enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) envolvida na via do folato, foram associados com a eficácia terapêutica do MTX, sugerindo que a genotipagem e identificação de polimorfismos no gene *MTHFR* em pacientes com AR antes do início do tratamento poderia ser um possível um biomarcador de resposta terapêutica ao MTX (Stamp et al., 2010; Lee & Song, 2010; Yanagimachi et al., 2011). Além disso, outros polimorfismos no gene *SCL19A1* (carreador solúvel da família 19, membro 1), que codifica o transportador de folato do tipo 1, também foram associados com a resistência ao MTX (Yanagimachi et al., 2011). Entretanto, estudos posteriores de meta-análise demonstram que ainda não há dados convincentes de que há uma associação entre estes polimorfismos e eficácia ao tratamento com MTX (Owen et al., 2011, 2013). A partir destas informações, podemos afirmar que até o presente estudo, ainda não haviam evidências robustas sobre a identificação de um potencial biomarcador de resposta ao MTX.

Nossos achados propõem que a expressão de CD39 em células Tregs é um biomarcador não-invasivo capaz de prever a eficácia terapêutica do MTX na AR e fornecem um suporte para o desenvolvimento de um teste laboratorial apto em quantificar a expressão de CD39 nestas células circulantes e consequentemente determinar se o paciente irá ou não responder ao MTX. O desenvolvimento de um kit de diagnóstico capaz de quantificar a expressão de CD39 em células Tregs está atualmente em fase de

desenvolvimento pelo nosso grupo de pesquisa em colaboração com companhias multinacionais. Adicionalmente, estudos em paralelo serão realizados para investigar se a expressão de CD39 em Tregs circulantes também pode se estender como um biomarcador apto em predizer a resposta terapêutica para outras doenças em que o MTX é utilizado, tais como psoríase, doença de Crohn, lúpus, esclerose múltipla e artrite idiopática juvenil (Sato, 2001; Ramanan et al., 2003; Gray et al., 2006; Herfarth et al., 2010; Kuhn et al., 2010).

Além da importância da expressão de CD39 em Tregs como biomarcador de resposta ao MTX, a redução da expressão de CD39 promove uma menor produção de ADO extracelular, a qual é essencial para mediar os efeitos anti-inflamatórios do MTX (Cronstein, 2005; Montesinos et al., 2007). Existem evidências na literatura que suportam o papel das ectonucleotidades e consequente produção de ADO extracelular para os efeitos anti-inflamatórios do~~s~~ MTX. De fato, Montesinos et al., utilizando camundongos deficientes destas ectoenzimas, demonstraram uma associação entre a atividade das ectonucleotidases e a deflagração dos efeitos anti-inflamatórios do MTX. Além disso, polimorfismos no gene do receptor de adenosina A2a foram associados com a manifestação de efeitos colaterais mais graves (Hider et al., 2008). Estes polimorfismos podem diminuir a expressão do receptor na superfície de células mononucleares, resultando em um comprometimento dos efeitos anti-inflamatórios mediados pela ADO. Ainda, alguns autores defendem uma ausência de responsividade dos receptores à ADO (Bansard et al., 2009). Assim, sugere-se que há um escape de células ativadas cronicamente na cavidade articular da imunovigilância mediada pelas Tregs, resultando na geração de células T ativadas refratárias à supressão mediada por ADO (Bansard et al., 2009).

Com base nestas informações, um dos próximos pontos a ser esclarecido seria qual o fenômeno molecular envolvido com a expansão de Tregs após administração de MTX. De modo interessante, algumas evidências da literatura sugerem que os mecanismos moleculares envolvidos com a expansão de células Tregs estejam relacionados com os efeitos da ADO na expansão dessas células na periferia (Ohta et al., 2012). De fato, é

demonstrado que agonistas de receptor A2a (A2aR) são capazes de induzir *in vitro* e *in vivo* a expansão e/ou potencializar a diferenciação de células Tregs que expressam CD39 (Zarek et al., 2008; Ohta et al., 2012; Han et al., 2013). Assim, o aumento de células Tregs expressando CD39 observado em pacientes R-MTX está relacionado com o aumento dos níveis de ADO extracelular sistêmicos mediado pelo MTX. O aumento sistêmico da ADO, por mecanismo autócrino ou parácrino, contribui para a expansão de células Tregs expressando CD39. Este efeito da ADO é dependente da interação com recetpor A2aR. Ainda, demonstramos que a capacidade de gerar ADO extracelular, baseada nos níveis de expressão de CD39, é um fator determinante também para a capacidade de diferenciação de células Tregs. Em pacientes UR-MTX, há uma capacidade reduzida de gerar ADO extracelular em Tregs devido à redução intrínseca da expressão de CD39, e por isso, esses pacientes falham em promover uma expansão de Tregs após o tratamento com MTX.

No presente estudo, nosso próximo objetivo foi investigar os fenômenos envolvidos com a expressão reduzida de CD39 observada em células Tregs de pacientes UR-MTX. Existem evidências na literatura que descrevem polimorfismos do gene *ENTPD1*, que codifica o CD39, associados com um pior prognóstico e maior susceptibilidade à doenças inflamatórias crônicas, como diabetes tipo 2 e doença de Crohn (Enjyoji et al., 2008; Friedman et al., 2009). Especificamente, Friedman et al. identificou que o SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único) rs10748643 está associado com a susceptibilidade à doença de Crohn, visto que há uma maior frequência de pacientes expressando o genótipo AA, relatado por desencadear uma expressão reduzida de CD39, do que em indivíduos saudáveis. Ainda, foi demonstrado posteriormente em outro estudo que indivíduos saudáveis homozigotos para o polimorfismo descrito acima apresentam também uma redução da frequência de células Tregs circulantes expressando CD39 e um comprometimento intrínseco de sua capacidade supressora (Rissiek et al., 2015). Porém, em uma análise prévia em nossos pacientes com AR, não identificamos nenhuma associação entre estes polimorfismos genéticos com a resistência ao MTX. Assim, é plausível que outros fatores, como o envolvimento de moléculas que regulam

e/ou induzam a expressão de CD39 em Tregs possam estar relacionados com a expressão reduzida de CD39 observada em pacientes UR-MTX. A partir disso, nós começamos a investigar os mecanismos que estariam envolvidos com a indução da expressão de CD39 em células Tregs.

Neste sentido, Liao et al. identificaram a participação de CREB na regulação da expressão de CD39 em macrófagos, visto que foi observado que a fosforilação de CREB induz o aumento do RNAm de CD39 neste tipo celular. Assim, nosso enfoque foi determinar se mecanismo semelhante estaria participando da expressão de CD39 nas células Tregs. Neste sentido, o TGF-β, uma citocina crucial para o processo de diferenciação de células Tregs, é capaz de induzir a ativação de CREB (Kamiya et al., 2007; Kochetkova et al., 2011). O TGF-β1 consiste na isoforma mais comumente estudada e que possui seu papel estabelecido em uma variedade de fenômenos fisiológicos (Kubiczkova et al., 2012). Com base nestas informações, nos avaliamos se o TGF-β1 era capaz de promover um aumento da expressão de CD39 em células Tregs. Deste modo, demonstramos que a estimulação com TGF-β promoveu um aumento da expressão de CD39 em Tregs através da ativação dos receptores TGFBRII e TGFBRI, do translocador de sinal SMAD2 e do fator de transcrição CREB, capaz de induzir a expressão de CD39 de maneira direta ou em cooperação com SMAD2. Obviamente, outros mecanismos e plataformas moleculares podem estar envolvidos com a indução de expressão de CD39 em células Tregs, porém nossa base de investigação foi identificar possíveis alterações em células de pacientes UR-MTX quanto à expressão e/ou ativação destas moléculas envolvidas na cascata de sinalização deflagrada por TGF-β, as quais poderiam estar relacionadas com a expressão reduzida de CD39 em Tregs observada nestes pacientes.

Como mencionado anteriormente na seção introdutória do presente estudo, SMAD2 é um translocador de sinal que forma um complexo com SMAD3 e SMAD4, o qual transloca-para o núcleo promove a transcrição de seus alvos moleculares (Yan et al., 2009). As SMADs podem atuar diretamente no DNA em regiões denominadas SBE (*Smad-binding element*) para induzir a transcrição de seus genes alvo (Massagué, 2000). Entretanto, a afinidade das SMADs para

ligação ao DNA nas regiões SBE é baixa, e em muitos casos, SMADs atuam em cooperação com outros fatores de transcrição, tais como CREB, promovendo a transcrição de seus genes alvo (Warner et al., 2003, 2004; Seoane et al., 2004). Por sua vez, a ativação de CREB pode ser mediada pela ativação de PKA pelo receptor TGFBRI (Warner et al., 2003; Moustakas & Heldin, 2005; Yang et al., 2013; Roberts & Derynck, 2001). No presente estudo, identificamos que ativação de CREB foi essencial para mediar a indução da expressão de CD39 por TGF-β, porém a ativação de CREB foi independente da atividade de PKA, visto que a adição simultânea de um inibidor da atividade de PKA (H89) não afetou o fenômeno de aumento da expressão de CD39 em Tregs via TGF-β. Com base nestes achados, é plausível que outras moléculas pertencentes as vias não canônicas da sinalização de TGF-β apresentam um papel relevante na ativação de CREB. De fato, é descrito na literatura que outras quinases como Erk, p38 e PI3K/AKT são ativadas de modo indireto ou direto pelo receptor TGFBRI após a estimulação com TGF-β (Lee et al., 2007; Engel et al., 1999; Bhowmick et al., 2001; Bakin et al., 2000). Dentro deste contexto, nós demonstramos que a atividade de p38 foi requerida para a indução da expressão de CD39 em Tregs através da estimulação de TGF-β, sugerindo que a ativação de p38 por TGF-β leva à uma consequente ativação de CREB e, uma vez ativada, CREB medeia a indução do gene *ENTPD1* (que codifica o CD39) de forma direta ou em cooperação com as SMADs.

A participação direta de SMAD2 no fenômeno de indução da expressão de CD39 por TGF-β ainda não está clara. Dentro deste contexto, é proposto que a SMAD2 pode estar atuando em cooperação com CREB na indução de CD39 em Tregs, visto que é descrito na literatura que CREB e seu co-ativador CBP (*CREB-binding protein*) interagem com a porção fosforilada MH2 de SMAD2, promovendo a transcrição de seus genes alvos (Warner et al., 2003b; a; Janknecht et al., 1998). Por outro lado, CREB ativada pode estar agindo diretamente na indução da expressão de CD39 em Tregs. Mesmo assim, a avaliação da fosforilação de SMAD2 ainda foi uma estratégia importante para determinar o grau de ativação da sinalização de TGF-β, visto que pacientes UR-MTX apresentaram uma redução

nos níveis basais de p-SMAD2 quando comparados à pacientes R-MTX. Posteriormente, verificamos que este comprometimento da sinalização de TGF-β foi associado com a expressão reduzida de CD39 em Tregs de pacientes UR-MTX, que é ocasionada principalmente pelo fato destes pacientes também apresentarem uma redução intrínseca do receptor TGFBRII (molécula *up-stream* da cascata de sinalização) além de uma concomitante redução dos níveis basais de CREB. Ressalta-se ainda que células Tregs de indivíduos com expressão reduzida de CD39 apresentaram uma incapacidade de promover a indução ~~de~~ a expressão de CD39 quando foram estimuladas com TGF-β.

Outros mecanismos moleculares poderiam participar na indução da expressão de CD39 em Tregs por TGF-β, visto que esta citocina pode induzir a ativação de moléculas que favorecem a expressão de FoxP3, um fator de transcrição que confere o fenótipo supressor tanto de células Tregs naturais quanto induzidas na periferia por induzir a transcrição de ~~outros~~ genes que codificam moléculas imunossupressoras, como o CD39 (Josefowicz et al., 2012). Com base nestas informações, um dos mecanismos pelos quais o TGF-β poderia estar induzindo CD39 seria através do aumento da expressão de FoxP3, que por sua vez, induziria a expressão de CD39 em Tregs. Entretanto, a estimulação com TGF-β em células Tregs isoladas de indivíduos ~~de~~ saudáveis não modulou a expressão de FoxP3 (MFI) nestas células (dados não mostrados), sugerindo que as moléculas da sinalização de TGF-β envolvidas com o aumento da expressão de CD39 atuam de uma maneira independente de FoxP3. Em adição, observamos que este fenômeno de aumento da expressão de CD39 por TGF-β foi exclusivamente relatado em células Tregs, pois não verificamos um aumento de CD39 em outras populações celulares, tais como, linfócitos T efetores, granulócitos e células $CD11c^{+}$. Essa exclusividade de indução de CD39 em Tregs pode ser explicada pelo fato destas células apresentarem níveis elevados de expressão dos receptores de TGF-β quando comparadas com outros subtipos celulares e, por isso, podem ser mais responsivas à estimulação com TGF-β (Cottrez & Groux, 2001).

Com base nestes achados, futuros estudos devem ser conduzidos com o intuito de determinar a razão pela qual pacientes/indivíduos possuem uma redução da expressão do receptor TGFBRII e CREB em suas células $TCD4^+$ e Tregs. Assim, polimorfismos genéticos poderiam influenciar a expressão destas moléculas, ocasionando uma redução em seus níveis. Em relação ao receptor TGFBRII, embora a literatura descreva uma associação de polimorfismos no gene codificador do receptor com a suscetibilidade e ao prognóstico de várias comorbidades, tais como câncer de mama, câncer de pulmão e vitiligo (Yun et al., 2010; Busch et al., 2013; Ren et al., 2015), não existem ainda trabalhos descrevendo uma associação de polimorfismos no gene que codifica o TGFBRII com a eficácia terapêutica ao MTX no contexto de doenças inflamatórias crônicas. Ainda, em relação a CREB, muitos trabalhos descrevem uma associação de polimorfismos no gene que codifica CREB com a susceptibilidade e gravidade de doenças neurológicas e neuropsiquiátricas (Perlis et al., 2007; Calati et al., 2013; Wang et al., 2015). Porém, de maneira similar ao descrito para o gene do receptor TGFBRII, não existem estudos relacionando estes polimorfismos com a resistência ao MTX. Dentro deste contexto, seria interessante investigar a associação de possíveis polimorfismos com a redução da expressão de TGFBRII e CREB, que culmina em uma redução da expressão de CD39 em Tregs associada à resistência ao tratamento com MTX. Adicionalmente, estes dados sugerem que a expressão de TGFBRII em células Tregs consiste também em um possível biomarcador apto em predizer à resposta terapêutica ao MTX na AR. De fato, os futuros estudos multicêntricos que serão conduzidos a partir do presente trabalho deverão também levar em consideração a validação da expressão do receptor TGFBRII em células Tregs também como um potencial biomarcador capaz de predizer à resistência ao MTX.

Em síntese, nossos resultados elucidaram alguns mecanismos envolvidos com a resistência ao tratamento MTX, gerando novas perspectivas para o esquema terapêutico da AR e proporcionando uma significante optimização da conduta de escolha dos fármacos rotineiramente utilizados para o tratamento da doença, desde que a expressão de CD39 na

superfície de células Tregs circulantes e possivelmente do receptor TGFBRII são potenciais biomarcadores aptos em predizer à resistência ao MTX para o tratamento da AR e de outras doenças inflamatórias crônicas. Sabendo disso, o próximo passo nesse âmbito será desenvolver kits comerciais de diagnóstico aptos em quantificar estes biomarcadores, os quais poderão causar um grande impacto socioeconômico tanto por melhorar a qualidade de vida dos pacientes quanto por acarretar em uma relevante economia de gastos do sistema de saúde com o financiamento de tratamentos inadequados.

6- CONCLUSÃO

O conjunto de resultados apresentados demonstram os mecanismos envolvidos com a resistência de pacientes com AR ao tratamento com metotrexato (MTX). De fato, observamos que pacientes R-MTX apresentam uma expansão de células Tregs circulantes expressando CD39 após o tratamento com MTX, fato que não ocorre em pacientes UR-MTX. Ainda, identificamos que pacientes UR-MTX possuem uma redução da expressão de CD39 em células Tregs, a qual culmina em um comprometimento funcional das Tregs. Esta redução de CD39 foi observada mesmo antes do tratamento com MTX, indicando que a expressão de CD39 em células Tregs é um biomarcador apto em predizer a resistência ao MTX. Em adição, a redução da expressão de CD39 em Tregs de pacientes UR-MTX foi associada à um comprometimento intrínseco da sinalização de TGF-β, demonstrada aqui por possuir um papel relevante na indução da expressão de CD39 nestas células. A representação esquemática dos nossos achados está demonstrada na Figura 37.

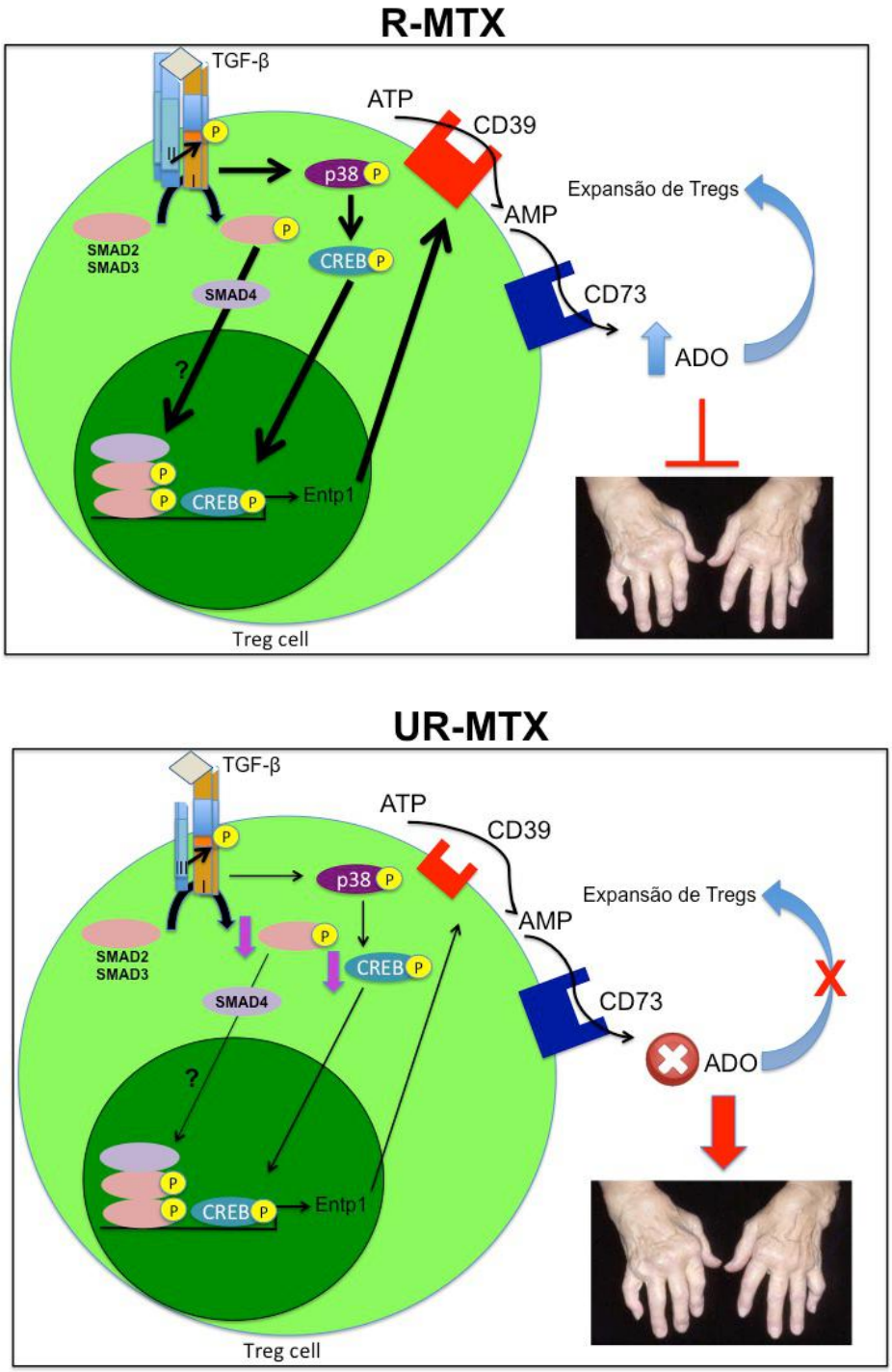


Figura 37- Representação esquemática das diferenças quanto à expressão e/ou ativação de moléculas da sinalização de TGF-β em Tregs de pacientes R-MTX e UR-MTX e implicações na expressão de CD39. Expressão intrínseca reduzida de TGFBRII e CREB em pacientes UR-MTX promove um comprometimento do desencadeamento da sinalização de TGF-β, evidenciado por uma redução dos níveis de SMAD2 e CREB fosforiladas. Esta redução culmina em uma expressão reduzida intrínseca de CD39 em Tregs, a qual está associada com a resistência ao MTX. R-MTX, pacientes respondedores ao MTX; UR-MTX, pacientes não respondedores ao MTX; ADO, adenosina; ATP, adenosina trifosfato; AMP, adenosina monofosfato; *ENTP1*, gene que codifica o CD39; CREB, *cAMP response element-binding*; Setas escuras mais finas, comprometimento da propagação da cascata de sinalização; Setas escuras mais grossas, propragação normal da cascata de sinalização.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal, R., K. Liao, R. Nair, S. Ringold, and K.H. Costenbader. 2009. Anti-citrullinated peptide antibody assays and their role in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res.* 61:1472–1483. doi:10.1002/art.24827.

Alessandri, C., R. Priori, M. Modesti, R. Mancini, and G. Valesini. 2008. The role of anti-cyclic cytrullinate antibodies testing in rheumatoid arthritis. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 34:45–49. doi:10.1007/s12016-007-8023-4.

Aletaha, D., T. Neogi, A.J. Silman, J. Funovits, D.T. Felson, C.O. Bingham, N.S. Birnbaum, G.R. Burmester, V.P. Bykerk, M.D. Cohen, B. Combe, K.H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J.M.W. Hazes, K. Hobbs, T.W.J. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T.K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H.A. Ménard, L.W. Moreland, R.L. Naden, T. Pincus, J.S. Smolen, E. Stanislawska-Biernat, D. Symmons, P.P. Tak, K.S. Upchurch, J. Vencovský, F. Wolfe, and G. Hawker. 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62:2569–2581. doi:10.1002/art.27584.

Van Amelsfort, J.M.R., K.M.G. Jacobs, J.W.J. Bijlsma, F.P.J.G. Lafeber, and L.S. Taams. 2004. CD4+CD25+ regulatory T cells in rheumatoid arthritis: Differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 50:2775–2785. doi:10.1002/art.20499.

Anderson, A.E., and J.D. Isaacs. 2008. Tregs and Rheumatoid Arthritis. *Acta Reumatol. Port.* 33:17–33.

Arnett, F.C., S.M. Edworthy, D. a Bloch, D.J. McShane, J.F. Fries, N.S. Cooper, L. a Healey, S.R. Kaplan, M.H. Liang, and H.S. Luthra. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315–324. doi:10.2169/naika.77.742.

Arroyo-Villa, I., M.B. Bautista-Caro, A. Balsa, P. Aguado-Acon, L. Nuno, M.G. Bonilla-Hernan, A. Puig-Kruger, E. Martin-Mola, and M.E. Miranda-Caros. 2012. Frequency of Th17 CD4+ T cells in early rheumatoid arthritis: A marker of anti-CCP seropositivity. *PLoS One*. 7. doi:10.1371/journal.pone.0042189.

Attisano, L., and J.L. Wrana. 2002. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*. 296:1646–1647. doi:10.1126/science.1071809.

Baeten, D., a M. Boots, P.G. Steenbakkers, D. Elewaut, E. Bos, G.F. Verheijden, G. Berheijden, a M. Miltenburg, a W. Rijnders, E.M. Veys, and F. De Keyser. 2000. Human cartilage gp-39+,CD16+ monocytes in peripheral blood and synovium: correlation with joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:1233–43. doi:10.1002/1529-0131(200006)43:6<1233::AID-ANR6>3.0.CO;2-9.

Bakin, A. V, A.K. Tomlinson, N.A. Bhowmick, H.L. Moses, and C.L. Arteaga. 2000. Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor ß-mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 275:36803–36810.

Bansard, C., T. Lequerré, M. Daveau, O. Boyer, F. Tron, J.P. Salier, O. Vittecoq, and X. Le-Loët. 2009. Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted? *Rheumatology*. 48:1021–1028. doi:10.1093/rheumatology/kep112.

Becker, M.L., R. Gaedigk, L. Van Haandel, B. Thomas, A. Lasky, M. Hoeltzel, H. Dai, J. Stobaugh, and J.S. Leeder. 2011. The effect of genotype on methotrexate polyglutamate variability in juvenile idiopathic arthritis and association with drug response. *Arthritis Rheum.* 63:276–285. doi:10.1002/art.30080.

Benito-Garcia, E., J.E. Heller, L.B. Chibnik, N.E. Maher, H.M. Matthews, J.A. Bilics, M.E. Weinblatt, and N.A. Shadick. 2006. Dietary caffeine intake does not affect methotrexate efficacy in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 33:1275–81.

Bhowmick, N.A., M. Ghiassi, A. Bakin, M. Aakre, C.A. Lundquist, M.E. Engel, C.L. Arteaga, and H.L. Moses. 2001. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell*. 12:27–36. doi:10.1091/mbc.12.1.27.

Birebent, B., R. Lorho, H. Lechartier, S. de Guibert, M. Alizadeh, N. Vu, A. Beauplet, N. Robillard, and G. Semana. 2004. Suppressive properties of human CD4+CD25+ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression. *Eur. J. Immunol.* 34:3485–3496. doi:10.1002/eji.200324632.

Birkenkamp, K.U., L.M. Tuyt, C. Lummen, A.T. Wierenga, W. Kruijer, E. Vellenga. 2000. The p38 MAP kinase inhibitor SB203580 enhances nuclear factor-kappa B transcriptional activity by a non-specific effect upon the ERK pathway. *Br J Pharmacol*.131(1):99-107.

Black, D.J., and R.B. Livingston. 1990. Antineoplastic Drugs in 1990: A Review (Part I). *Drugs*. 39:489–501. doi:10.2165/00003495-199039040-00002.

Bobbio-Pallavicini, F., R. Caporali, C. Alpini, S. Avalle, O.M. Epis, C. Klersy, and C. Montecucco. 2007. High IgA rheumatoid factor levels are associated with poor clinical response to tumour necrosis factor alpha inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 66:302–7. doi:10.1136/ard.2006.060608.

Boissier, M.-C., E. Assier, J. Biton, A. Denys, G. Falgarone, and N. Bessis. 2009. Regulatory T cells (Treg) in rheumatoid arthritis. *In* Joint, bone, spine : revue du rhumatisme. 10–4.

Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Höpner, D. Centonze, G. Bernardi, M.L. Dell'Acqua, P.M. Rossini, L. Battistini, O. Rötzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: Hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 110:1225–1232. doi:10.1182/blood-2006-12-064527.

Brand, D.D., K. a Latham, and E.F. Rosloniec. 2007. Collagen-induced arthritis. *Nat. Protoc.* 2:1269–1275. doi:10.1038/nprot.2007.173.

Braun-Moscovici, Y., D. Markovits, O. Zinder, D. Schapira, A. Rozin, M. Ehrenburg, L. Dain, E. Hoffer, a M. Nahir, and A. Balbir-Gurman. 2006. Anti-cyclic citrullinated protein antibodies as a predictor of response to anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 33:497–500.

Brusko, T.M., A.L. Putnam, and J.A. Bluestone. 2008. Human regulatory T cells: Role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol. Rev.* 223:371–390. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00637.x.

Brusko, T.M., C.H. Wasserfall, M.J. Clare-Salzler, D.A. Schatz, and M.A. Atkinson. 2005. Functional defects and the influence of age on the frequency of CD4 +CD25+ T-cells in type 1 diabetes. *Diabetes*. 54:1407–1414. doi:10.2337/diabetes.54.5.1407.

Burmester, G.R., R. Blanco, C. Charles-Schoeman, J. Wollenhaupt, C. Zerbini, B. Benda, D. Gruben, G. Wallenstein, S. Krishnaswami, S.H. Zwillich, T. Koncz, K. Soma, J. Bradley, and C. Mebus. 2013. Tofacitinib (CP-690,550) in combination with methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitors: a randomised phase 3 trial. *Lancet*. 381:451–460. doi:10.1016/S0140-6736(12)61424-X\rS0140-6736(12)61424-X [pii].

Busch, S., a Acar, Y. Magnusson, P. Gregersson, L. Rydén, and G. Landberg. 2013. TGF-beta receptor type-2 expression in cancer-associated fibroblasts regulates breast cancer cell growth and survival and is a prognostic marker in pre-menopausal breast cancer. *Oncogene*. 1–12. doi:10.1038/onc.2013.527.

Calati, R., C. Crisafulli, M. Balestri, A. Serretti, E. Spina, M. Calabra, A. Sidoti, D. Albani, I. Massat, P. Hifer, D. Amital, A. Juven-Wetzler, S. Kasper, J. Zohar, D. Souery, S. Montgomery, and J. Mendlewicz. 2013. Evaluation of the role of MAPK1 and CREB1 polymorphisms on treatment resistance, response and remission in mood disorder patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. 44:271–278. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.03.005.

Chabaud, M., E. Lubberts, L. Joosten, W. van den Berg, and P. Miossec. 2001. IL-17 derived from juxta-articular bone and synovium contributes to joint degradation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*. 3:1. doi:10.1186/ar294.

Chaiamnuay, S., and S.L. Bridges. 2005. The role of B cells and autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 12:203–216. doi:10.1016/j.pathophys.2005.07.007.

Chalmin, F., G. Mignot, M. Bruchard, A. Chevriaux, F. Végran, A. Hichami, S. Ladoire, V.

Derangère, J. Vincent, D. Masson, S.C. Robson, G. Eberl, J.R. Pallandre, C. Borg, B. Ryffel, L. Apetoh, C. Rébé, and F. Ghiringhelli. 2012. Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. *Immunity*. 36:362–373. doi:10.1016/j.immuni.2011.12.019.

Chen, J.-F., H.K. Eltzschig, and B.B. Fredholm. 2013. Adenosine receptors as drug targets — what are the challenges? *Nat. Rev. Drug Discov.* 12:265–286. doi:10.1038/nrd3955.

Coates, L.C., H. Marzo-Ortega, a. N. Bennett, and P. Emery. 2010. Anti-TNF therapy in ankylosing spondylitis: insights for the clinician. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 2:37–43. doi:10.1177/1759720X09359728.

Coffer, P.J., and B.M.T. Burgering. 2004. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 4:889–899. doi:10.1038/nri1488.

Cohen, S.B., P. Emery, M.W. Greenwald, M. Dougados, R.A. Furie, M.C. Genovese, E.C. Keystone, J.E. Loveless, G.R. Burmester, M.W. Cravets, E.W. Hessey, T. Shaw, and M.C. Totoritis. 2006. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* 54:2793–2806. doi:10.1002/art.22025.

Cooles, F.A.H., J.D. Isaacs, and A.E. Anderson. 2013. Treg cells in rheumatoid arthritis: An update. *Curr. Rheumatol. Rep.* 15. doi:10.1007/s11926-013-0352-0.

Costa, J.O., Almeida, A.M., Guerra Junior, A.A., Cherchiglia, M.L., Andrade E.L.G., Acurcio, F.A. 2014. Treatment of rheumatoid arthritis in the Brazilian Unified National Health System: expenditures on infliximab compared to synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs, 2003-2006. *Cad. Saúde Pública* vol.30 no.2.

Cottrez, F., and H. Groux. 2001. Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. *J. Immunol.* 167:773–8. doi:10.4049/jimmunol.167.2.773.

Cribbs, A.P., A. Kennedy, H. Penn, P. Amjadi, P. Green, J.E. Read, F. Brennan, B. Gregory, and R.O. Williams. 2015. Methotrexate restores regulatory T cell function through demethylation of the FoxP3 upstream enhancer in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 67:1182–1192. doi:10.1002/art.39031.

Cribbs, A.P., A. Kennedy, H. Penn, J.E. Read, P. Amjadi, P. Green, K. Syed, S.W. Manka, F.M. Brennan, B. Gregory, and R.O. Williams. 2014. Treg cell function in rheumatoid arthritis is compromised by CTLA-4 promoter methylation resulting in a failure to activate the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway. *Arthritis Rheumatol.* 66:2344–2354. doi:10.1002/art.38715.

Cronstein, B.N. 1997. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 23:739–755. doi:10.1016/S0889-857X(05)70358-6.

Cronstein, B.N. 2005. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol. Rev.* 57:163–72. doi:10.1124/pr.57.2.3.

Cronstein, B.N., L. Daguma, D. Nichols, A.J. Hutchison, and M. Williams. 1990. The adenosine/neutrophil paradox resolved: Human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O-2 generation, respectively. *J. Clin. Invest.* 85:1150–1157. doi:10.1172/JCI114547.

Cronstein, B.N., D. Naime, and E. Ostad. 1993. The antiinflammatory mechanism of methotrexate: Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J. Clin. Invest.* 92:2675–2682. doi:10.1172/JCI116884.

Cronstein, B.N., E.D. Rosenstein, S.B. Kramer, G. Weissmann, and R. Hirschhorn. 1985. Adenosine; a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. *J. Immunol.* 135:1366–1371.

Curotto de Lafaille, M.A., A.C. Lino, N. Kutchukhidze, and J.J. Lafaille. 2004. CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion. *J Immunol*. 173:7259–7268. doi:173/12/7259 [pii].

Curtis, J.R., E.B. Lee, I. V. Kaplan, K. Kwok, J. Geier, B. Benda, K. Soma, L. Wang, and R.

Riese. 2015. Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor: analysis of malignancies across the rheumatoid arthritis clinical development programme. *Ann. Rheum. Dis.* 1–11. doi:10.1136/annrheumdis-2014-205847.

Curtis, J.R., and J.A. Singh. 2011. Use of Biologics in Rheumatoid Arthritis: Current and Emerging Paradigms of Care. *Clin. Ther.* 33:679–707. doi:10.1016/j.clinthera.2011.05.044.

Das, H.K., S.K. Lawrance, and S.M. Weissman. 1983. Structure and nucleotide sequence of the heavy chain gene of HLA-DR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80:3543–3547.

Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.-F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204:1257–65. doi:10.1084/jem.20062512.

Derynck, R., and Y.E. Zhang. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. 425:577–584. doi:10.1038/nature02006.

Dissick, A., R.S. Redman, M. Jones, B. V Rangan, A. Reimold, G.R. Griffiths, T.R. Mikuls, R.L. Amdur, J.S. Richards, and G.S. Kerr. 2010. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J. Periodontol.* 81:223–30. doi:10.1902/jop.2009.090309.

Edwards, J.C.W., L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D.R. Close, R.M. Stevens, and T. Shaw. 2004. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 350:2572–2581. doi:10.1056/NEJMoa032534.

Engel, M.E., M. a McDonnell, B.K. Law, and H.L. Moses. 1999. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* 274:37413–37420.

Enjyoji, K., K. Kotani, C. Thukral, B. Blumel, X. Sun, Y. Wu, M. Imai, D. Friedman, E. Csizmadia, W. Bleibel, B.B. Kahn, and S.C. Robson. 2008. Deletion of Cd39/Entpd1 results in hepatic insulin resistance. *Diabetes*. 57:2311–2320. doi:10.2337/db07-1265.

Esensten, J.H., D. Wofsy, and J.A. Bluestone. 2009. Regulatory T cells as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5:560–565. doi:10.1038/nrrheum.2009.183.

Fan, P., and K. Leong. 2007. The use of biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann. Med. Singapore*. 36:128–34.

Feldmann, M., F.M. Brennan, and R.N. Maini. 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell*. 85:307–310. doi:10.1016/S0092-8674(00)81109-5.

Fishman, P., S. Bar-Yehuda, B.T. Liang, and K. a. Jacobson. 2012. Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists. *Drug Discov. Today*. 17:359–366. doi:10.1016/j.drudis.2011.10.007.

Fletcher, J.M., R. Lonergan, L. Costelloe, K. Kinsella, B. Moran, C. O'Farrelly, N. Tubridy, and K.H.G. Mills. 2009. CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 183:7602–10. doi:10.4049/jimmunol.0901881.

Flögel, U., S. Burghoff, P.L.E.M. van Lent, S. Temme, L. Galbarz, Z. Ding, A. El-Tayeb, S. Huels, F. Bönner, N. Borg, C. Jacoby, C.E. Müller, W.B. van den Berg, and J. Schrader. 2012. Selective activation of adenosine A2A receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* 4:146ra108. doi:10.1126/scitranslmed.3003717.

Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 4:330–336. doi:10.1038/ni904.

Francis, J., J.E. Carty, and B.B. Scott. 2002. The prevalence of coeliac disease in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 14:1355–6. doi:10.1097/00042737-200212000-00011.

Friedman, D.J., B.M. Künzli, Y.I. A-Rahim, J. Sevigny, P.O. Berberat, K. Enjyoji, E. Csizmadia, H. Friess, and S.C. Robson. 2009. From the Cover: CD39 deletion

exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:16788–16793. doi:10.1073/pnas.0902869106.

Genovese, M.C., J.M. Bathon, R.W. Martin, R.M. Fleischmann, J.R. Tesser, M.H. Schiff, E.C. Keystone, M.C. Wasko, L.W. Moreland, A.L. Weaver, J. Markenson, G.W. Cannon, G. Spencer-Green, and B.K. Finck. 2002. Etanercept versus methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis: Two-year radiographic and clinical outcomes. *Arthritis Rheum.* 46:1443–1450. doi:10.1002/art.10308.

Gray, O.M., G. V McDonnell, and R.B. Forbes. 2006. A systematic review of oral methotrexate for multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 12:507–10. doi:10.1191/1352458506ms1299oa.

Gregersen, P.K., J. Silver, and R.J. Winchester. 1987. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 30:1205–1213. doi:10.1002/art.1780301102.

Hajian-Tilaki, K. 2013. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. Caspian J Intern Med. 4(2): 627–635.

Han, K.L., S.V.M. Thomas, S.M. Koontz, C.M. Changpriroa, S.-K. Ha, H.L. Malech, and E.M. Kang. 2013. Adenosine A_2A receptor agonist-mediated increase in donor-derived regulatory T cells suppresses development of graft-versus-host disease. *J. Immunol.* 190:458–68. doi:10.4049/jimmunol.1201325.

Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6:1123–32. doi:10.1038/ni1254.

Harty, L., and D.J. Veale. 2010. How early should psoriatic arthritis be treated with a TNF-blocker? *Curr. Opin. Rheumatol.* 22:393–6. doi:10.1097/BOR.0b013e32833a3d42.

Haskó, G., D.G. Kuhel, J.F. Chen, M. a Schwarzschild, E. a Deitch, J.G. Mabley, a Marton, and C. Szabó. 2000. Adenosine inhibits IL-12 and TNF-[alpha] production via adenosine A2a receptor-dependent and independent mechanisms. *FASEB J.* 14:2065–2074. doi:10.1096/fj.99-0508com.

Haskó, G., J. Linden, B. Cronstein, and P. Pacher. 2008. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7:759–770. doi:10.1038/nrd2638.

Heliovaara, M., K. Aho, A. Aromaa, P. Knekt, and A. Reunanen. 1993. Smoking and risk of rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 20:1830–1835.

van der Helm-van Mil, A.H.M., J.Z. Wesoly, and T.W.J. Huizinga. 2005. Understanding the genetic contribution to rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 17:299–304. doi:10.1097/01.bor.0000160780.13012.be.

Hemminki, K., X. Li, J. Sundquist, and K. Sundquist. 2009. Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. *Arthritis Rheum.* 60:661–668. doi:10.1002/art.24328.

Herbst, K.J., M.D. Allen, and J. Zhang. 2009. The cAMP-dependent protein kinase inhibitor H-89 attenuates the bioluminescence signal produced by Renilla luciferase. *PLoS One*. 4. doi:10.1371/journal.pone.0005642.

Herfarth, H.H., M.T. Osterman, K.L. Isaacs, J.D. Lewis, and B.E. Sands. 2010. Efficacy of methotrexate in ulcerative colitis: Failure or promise. *Inflamm. Bowel Dis.* 16:1421–1430. doi:10.1002/ibd.21246.

Hider, S.L., W. Thomson, L.F. Mack, D.J. Armstrong, M. Shadforth, and I.N. Bruce. 2008. Polymorphisms within the adenosine receptor 2a gene are associated with adverse events in RA patients treated with MTX. *Rheumatology*. 47:1156–1159. doi:10.1093/rheumatology/ken182.

Holers, V.M. 2013. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Immunol.* 25:728–735. doi:10.1016/j.coi.2013.09.018.

Hoovestol, R.A., and T.R. Mikuls. 2011. Environmental exposures and rheumatoid arthritis

risk. *Curr. Rheumatol. Rep.* 13:431–439. doi:10.1007/s11926-011-0203-9.
Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (80-.).* 299:1057–61. doi:10.1126/science.1079490.
Huang, F., and Y.-G. Chen. 2012. Regulation of TGF-β receptor activity. *Cell Biosci.* 2:9. doi:10.1186/2045-3701-2-9.
Humphreys, J.H., a Warner, J. Chipping, T. Marshall, M. Lunt, D.P.M. Symmons, and S.M.M. Verstappen. 2014. Mortality trends in patients with early rheumatoid arthritis over 20 years: Results from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Care Res. (Hoboken).* 66:1296–1301. doi:10.1002/acr.22296.
Janknecht, R., N.J. Wells, and T. Hunter. 1998. TGF-beta-stimulated cooperation of Smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev.* 12:2114–2119. doi:10.1101/gad.12.14.2114.
Joensuu, J.T., S. Huoponen, K.J. Aaltonen, Y.T. Konttinen, D. Nordström, and M. Blom. 2015. The cost-effectiveness of biologics for the treatment of rheumatoid arthritis: A systematic review. *PLoS One*. 10. doi:10.1371/journal.pone.0119683.
Jones, M.A., A.J. Silman, S. Whiting, E.M. Barrett, and D.P. Symmons. 1996. Occurrence of rheumatoid arthritis is not increased in the first degree relatives of a population based inception cohort of inflammatory polyarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 55:89–93. doi:10.1136/ard.55.2.89.
Josefowicz, S.Z., L.-F. Lu, and A.Y. Rudensky. 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30:531–564. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
Josefowicz, S.Z., and A. Rudensky. 2009. Control of Regulatory T Cell Lineage Commitment and Maintenance. *Immunity*. 30:616–625. doi:10.1016/j.immuni.2009.04.009.
Jovanovic, D. V, J.A. Di Battista, J. Martel-Pelletier, F.C. Jolicoeur, Y. He, M. Zhang, F. Mineau, and J.P. Pelletier. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J. Immunol.* 160:3513–21.
del Junco, D., H.S. Luthra, J.F. Annegers, J.W. Worthington, and L.T. Kurland. 1984. The familial aggregation of rheumatoid arthritis and its relationship to the HLA-DR4 association. *Am. J. Epidemiol.* 119:813–829.
Kadowaki, K.M., H. Matsuno, H. Tsuji, and I. Tunru. 1994. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin. Exp. Immunol.* 97:212–218.
Kamiya, K., K. Sakakibara, E.J. Ryer, R.P. Hom, E.B. Leof, K.C. Kent, and B. Liu. 2007. Phosphorylation of the cyclic AMP response element binding protein mediates transforming growth factor beta-induced downregulation of cyclin A in vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell. Biol.* 27:3489–98. doi:10.1128/MCB.00665-06.
Katz, Y., O. Nadiv, and Y. Beer. 2001. Interleukin-17 Enhances Tumor Necrosis Factor alpha-Induced Synthesis of Interleukins 1, 6, and 8 in Skin and Synovial Fibroblasts: A Possible Role as a “Fine-Tuning Cytokine” in Inflammation Processes. *Arthritis Rheum.* 44:2176–2184. doi:10.1002/1529-0131(200109)44:9<2176::AID-ART371>3.0.CO;2-4.
Kelchtermans, H., L. Geboes, T. Mitera, D. Huskens, G. Leclercq, and P. Matthys. 2009. Activated CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 68:744–50. doi:10.1136/ard.2007.086066.
Kikuta, J., Y. Wada, T. Kowada, Z. Wang, G.H. Sun-Wada, I. Nishiyama, S. Mizukami, N. Maiya, H. Yasuda, A. Kumanogoh, K. Kikuchi, R.N. Germain, and M. Ishii. 2013. Dynamic visualization of RANKL and Th17-mediated osteoclast function. *J. Clin. Invest.* 123:866–873. doi:10.1172/JCI65054.
Kinloch, A., K. Lundberg, R. Wait, N. Wegner, H.L. Ngee, A.J.W. Zendman, T. Saxne, V. Malmström, and P.J. Venables. 2008. Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* 58:2287–2295. doi:10.1002/art.23618.

Klareskog, L., V. Malmström, K. Lundberg, L. Padyukov, and L. Alfredsson. 2011. Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Semin. Immunol.* 23:92–98. doi:10.1016/j.smim.2011.01.014.

Kleinschek, M.A., A.M. Owyang, B. Joyce-Shaikh, C.L. Langrish, Y. Chen, D.M. Gorman, W.M. Blumenschein, T. McClanahan, F. Brombacher, S.D. Hurst, R.A. Kastelein, and D.J. Cua. 2007. IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 204:161–70. doi:10.1084/jem.20061738.

Kobayashi, S., S. Momohara, N. Kamatani, and H. Okamoto. 2008. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. *FEBS J.* 275:4456–4462. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06581.x.

Kochetkova, I., T. Thornburg, G. Callis, and D.W. Pascual. 2011. Segregated regulatory CD39+CD4+ T cell function: TGF-β-producing Foxp3- and IL-10-producing Foxp3+ cells are interdependent for protection against collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* 187:4654–66. doi:10.4049/jimmunol.1100530.

Koshiba, M., H. Kojima, S. Huang, S. Apasov, and M. V. Sitkovsky. 1997. Memory of extracellular adenosine A(2a) purinergic receptor-mediated signaling in murine T cells. *J. Biol. Chem.* 272:25881–25889. doi:10.1074/jbc.272.41.25881.

Kramer, I.M., I. Koornneef, S.W. de Laat, and A.J. van den Eijnden-van Raaij. 1991. TGF-beta 1 induces phosphorylation of the cyclic AMP responsive element binding protein in ML-CCl64 cells. *EMBO J.* 10:1083–1089.

Kremer, J.M., M. Dougados, P. Emery, P. Durez, J. Sibilia, W. Shergy, S. Steinfeld, E. Tindall, J.C. Becker, T. Li, I.F. Nuamah, R. Aranda, and L.W. Moreland. 2005. Treatment of rheumatoid arthritis with the selective costimulation modulator abatacept: Twelve-month results of a phase IIb, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 52:2263–2271. doi:10.1002/art.21201.

Kremer, J.M., H.K. Genant, L.W. Moreland, A.S. Russell, P. Emery, C. Abud-Mendoza, J. Szechinski, T. Li, Z. Ge, J.C. Becker, and R. Westhovens. 2006. Effects of abatacept in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 144:865–876. doi:10.1016/S0084-3873(08)70005-1.

Kremer, J.M., R. Blanco, M. Brzosko, R. Burgos-Vargas, A.M. Halland, E. Vernon, P. Ambs, R. Fleischmann. 2011. Tocilizumab inhibits structural joint damage in rheumatoid arthritis patients with inadequate responses to methotrexate: results from the double-blind treatment phase of a randomized placebo-controlled trial of tocilizumab safety and prevention of structural joint damage at one year. *Arthritis Rheum*. 63(3):609-21. doi: 10.1002/art.30158.

Kubiczkova, L., L. Sedlarikova, R. Hajek, and S. Sevcikova. 2012. TGF-beta -- an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.* 10:183. doi:10.1186/1479-5876-10-183.

Kuhn, A., V. Ruland, N. Patsinakidis, and T.A. Luger. 2010. Use of methotrexate in patients with psoriasis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 28.

Kumar, P., and S. Banik. 2013. Pharmacotherapy options in rheumatoid arthritis. *Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.* 6:35–43. doi:10.4137/CMAMD.S5558.

Lappas, C.M., Y.-J. Day, M.A. Marshall, V.H. Engelhard, and J. Linden. 2006. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *J. Exp. Med.* 203:2639–48. doi:10.1084/jem.20061097.

Lee, E.B., R. Fleischmann, S. Hall, B. Wilkinson, J.D. Bradley, D. Gruben, T. Koncz, S. Krishnaswami, G. V Wallenstein, C. Zang, S.H. Zwillich, and R.F. van Vollenhoven. 2014. Tofacitinib versus methotrexate in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 370:2377–86. doi:10.1056/NEJMoa1310476.

Lee, M.K., C. Pardoux, M.C. Hall, P.S. Lee, D. Warburton, J. Qing, S.M. Smith, and R. Derynck. 2007. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* 26:3957–67. doi:10.1038/sj.emboj.7601818.

Lee, Y.H., and G.G. Song. 2010. Associations between the C677T and A1298C polymorphisms of MTHFR and the efficacy and toxicity of methotrexate in rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Clin. Drug Investig.* 30:101–108. doi:10.2165/11531070-000000000-00000.

LeGrand, A., B. Fermor, C. Fink, D.S. Pisetsky, J.B. Weinberg, T.P. Vail, and F. Guilak. 2001. Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor alpha, and Interleukin-17 Synergistically Up-Regulate Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Production in Explants of Human Osteoarthritic Knee Menisci. *Arthritis Rheum.* 44:2078–2083. doi:10.1002/1529-0131(200109)44:9<2078::AID-ART358>3.0.CO;2-J.

Leipe, J., M. Grunke, C. Dechant, C. Reindl, U. Kerzendorf, H. Schulze-Koops, and A. Skapenko. 2010. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 62:2876–2885. doi:10.1002/art.27622.

Levings, M.K., R. Sangregorio, C. Sartirana, A.L. Moschin, M. Battaglia, P.C. Orban, and M.-G. Roncarolo. 2002. Human CD25+CD4+ T Suppressor Cell Clones Produce Transforming Growth Factor , but not Interleukin 10, and Are Distinct from Type 1 T Regulatory Cells. *J. Exp. Med.* 196:1335–1346. doi:10.1084/jem.20021139.

Liao, H., M.C. Hyman, A.E. Baek, K. Fukase, and D.J. Pinsky. 2010. cAMP/CREB-mediated transcriptional regulation of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) expression. *J. Biol. Chem.* 285:14791–14805. doi:10.1074/jbc.M110.116905.

Lindley, S., C.M. Dayan, A. Bishop, B.O. Roep, M. Peatman, and T.I.M. Tree. 2005. Defective suppressor function in CD4+CD25+ T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*. 54:92–99. doi:10.2337/diabetes.54.1.92.

Lipsky, P.E., D.M. van der Heijde, E.W. St Clair, D.E. Furst, F.C. Breedveld, J.R. Kalden, J.S. Smolen, M. Weisman, P. Emery, M. Feldmann, G.R. Harriman, and R.N. Maini. 2000. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *N. Engl. J. Med.* 343:1594–1602. doi:10.1056/NEJM200011303432202.

Lu, L., X. Zhou, J. Wang, S.G. Zheng, and D.A. Horwitz. 2010. Characterization of Protective Human CD4+CD25+ FOXP3+ Regulatory T Cells Generated with IL-2, TGF-beta and Retinoic Acid. *PLoS One*. 5:1–12. doi:10.1371/journal.pone.0015150.

Lubberts, E. 2008. IL-17/Th17 targeting: On the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine*. 41:84–91. doi:10.1016/j.cyto.2007.09.014.

Lubberts, E. 2015. The IL-23-IL-17 axis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 11:415–429. doi:10.1038/nrrheum.2015.53.

MacGregor, A.J., H. Snieder, A.S. Rigby, M. Koskenvuo, J. Kaprio, K. Aho, and A.J. Silman. 2000. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 43:30–37. doi:10.1002/1529-0131(200001)43:1<30::AID-ANR5>3.0.CO;2-B.

Makrygiannakis, D., E. af Klint, I.E. Lundberg, R. Löfberg, A.-K. Ulfgren, L. Klareskog, and A.I. Catrina. 2006. Citrullination is an inflammation-dependent process. *Ann. Rheum. Dis.* 65:1219–22. doi:10.1136/ard.2005.049403.

Maloy, K.J., and F. Powrie. 2005. Fueling regulation: IL-2 keeps CD4+ Treg cells fit. *Nat. Immunol.* 6:1071–1072. doi:10.1038/ni1105-1071.

Manivelavan, D., and V. C K. 2012. Anti-cyclic citrullinated Peptide antibody: an early diagnostic and prognostic biomarker of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Diagn. Res.* 6:1393–6. doi:10.7860/JCDR/2012/4692.2367.

Marques Neto, J.F., Gonçalves E.T., Langen L.F.O.B., Cunha M., Radominski S., Oliveira S.M. 1993. Multicentric study of the prevalence of adult rheumatoid arthritis in Brazilian population samples. *Rev. bras. reumatol* 33(5):169-73.

Massagué, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1:169–178. doi:10.1038/35043051.

Mayr, B., and M. Montminy. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:599–609. doi:10.1038/35085068.

Mazzon, E., E. Esposito, D. Impellizzeri, R. Di Paola, A. Melani, P. Bramanti, F. Pedata, and S. Cuzzocrea. 2011. CGS 21680, an Agonist of the Adenosine (A2A) receptor, reduces progression of murine type II collagen-induced arthritis. *J. Rheumatol.* 38:2119–2129. doi:10.3899/jrheum.110111.

McInnes, I.B., and G. Schett. 2007. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 7:429–442. doi:10.1038/nri2094.

McInnes, I.B., and G. Schett. 2011. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* 365:2205–2219. doi:10.1056/NEJMra1004965.

Mease, P.J. 2005. Adalimumab: an anti-TNF agent for the treatment of psoriatic arthritis. *Expert Opin. Biol. Ther.* 5:1491–1504. doi:10.1517/14712598.5.11.1491.

Meier, F.M.P., M. Frerix, W. Hermann, and U. Müller-Ladner. 2013. Current immunotherapy in rheumatoid arthritis. *Immunotherapy*. 5:955–74. doi:10.2217/imt.13.94.

Meinig J.M., B.R. Peterson. 2015. Anticancer/antiviral agent Akt inhibitor-IV massively accumulates in mitochondria and potently disrupts cellular bioenergetics. *ACS Chem Biol*.10(2):570-6. doi: 10.1021/cb500856c.

Michaud, K., and F. Wolfe. 2007. Comorbidities in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 21:885–906. doi:10.1016/j.berh.2007.06.002.

Mills, K.H.G. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat. Rev. Immunol.* 4:841–855. doi:10.1038/nri1485.

Montesinos, M.C., A. Desai, and B.N. Cronstein. 2006. Suppression of inflammation by low-dose methotrexate is mediated by adenosine A2A receptor but not A3 receptor activation in thioglycollate-induced peritonitis. *Arthritis Res. Ther.* 8:R53. doi:10.1186/ar1914.

Montesinos, M.C., A. Desai, D. Delano, J.F. Chen, J.S. Fink, M.A. Jacobson, and B.N. Cronstein. 2003. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis Rheum.* 48:240–247. doi:10.1002/art.10712.

Montesinos, M.C., M. Takedachi, L.F. Thompson, T.F. Wilder, P. Fernandez, and B.N. Cronstein. 2007. 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 Rheum.* 56:1440–1445. doi:10.1002/art.22643.

Morabito, L., M.C. Montesinos, D.M. Schreibman, L. Balter, L.F. Thompson, R. Resta, G. Carlin, M.A. Huie, and B.N. Cronstein. 1998. Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires Ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides. *J. Clin. Invest.* 101:295–300. doi:10.1172/JCI1554.

Möttönen, M., J. Heikkinen, L. Mustonen, P. Isomäki, R. Luukkainen, and O. Lassila. 2005. CD4+ CD25+ T cells with the phenotypic and functional characteristics of regulatory T cells are enriched in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 140:360–7. doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02754.x.

Moustakas, A., and C.-H. Heldin. 2005. Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell Sci.* 118:3573–3584. doi:10.1242/jcs.02554.

Myasoedova, E., J.M. Davis, C.S. Crowson, and S.E. Gabriel. 2010. Epidemiology of rheumatoid arthritis: Rheumatoid arthritis and mortality. *Curr. Rheumatol. Rep.* 12:379–385. doi:10.1007/s11926-010-0117-y.

Nadkarni, S., C. Mauri, and M.R. Ehrenstein. 2007. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J. Exp. Med.* 204:33–9. doi:10.1084/jem.20061531.

Naganuma, M., E.B. Wiznerowicz, C.M. Lappas, J. Linden, M.T. Worthington, and P.B. Ernst. 2006. Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis. *J. Immunol.* 177:2765–2769. doi:10.4049/jimmunol.177.5.2765.

Navarro-Sarabia, F., R. Ariza-Ariza, B. Hernández-Cruz, and I. Villanueva. 2006. Adalimumab for treating rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 33:1075–1081. doi:10.1002/14651858.CD005113.pub2.

Nie, H., Y. Zheng, R. Li, T.B. Guo, D. He, L. Fang, X. Liu, L. Xiao, X. Chen, B. Wan, Y.E. Chin, and J.Z. Zhang. 2013. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-α in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* 19:322–8. doi:10.1038/nm.3085.

Nishimura, K., D. Sugiyama, Y. Kogata, G. Tsuji, T. Nakazawa, S. Kawano, K. Saigo, A. Morinobu, M. Koshiba, K.M. Kuntz, I. Kamae, and S. Kumagai. 2007. Meta-analysis:

Diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* 146:797–808. doi:10.1016/S0084-3873(08)79116-8.

Noack, M., and P. Miossec. 2014. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev*. 13:668–677. doi:10.1016/j.autrev.2013.12.004.

Ogilvie, A.L.J., C. Antoni, C. Dechant, B. Manger, J.R. Kalden, G. Schuler, and M. Loftl. 2001. Treatment of psoriatic arthritis with antitumour necrosis factor-alpha antibody clears skin lesions of psoriasis resistant to treatment with methotrexate. *Br. J. Dermatol.* 144:587–589. doi:10.1046/j.1365-2133.2001.04089.x.

Ohta, A., R. Kini, A. Ohta, M. Subramanian, M. Madasu, and M. Sitkovsky. 2012. The development and immunosuppressive functions of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front. Immunol.* 3. doi:10.3389/fimmu.2012.00190.

Olsson, A.R., T. Skogh, and G. Wingren. 2004. Aetiological factors of importance for the development of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*. 33:300–306. doi:10.1080/03009740310004748.

Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng. 2008. The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation. *Immunity*. 28:454–467. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.004.

Owen, S. a, S.L. Hider, P. Martin, I.N. Bruce, a Barton, and W. Thomson. 2013. Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J.* 13:227–34. doi:10.1038/tpj.2012.7.

Owen, S. a, M. Lunt, J. Bowes, S.L. Hider, I.N. Bruce, W. Thomson, and A. Barton. 2011. MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms. *Pharmacogenomics J.* 201142. doi:10.1038/tpj.2011.42.

Peelen, E., J. Damoiseaux, J. Smolders, S. Knippenberg, P. Menheere, J.W.C. Tervaert, R. Hupperts, and M. Thewissen. 2011. Th17 expansion in MS patients is counterbalanced by an expanded CD39 + regulatory T cell population during remission but not during relapse. *J. Neuroimmunol.* 240-241:97–103. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.09.013.

Pelletier, M., L. Maggi, A. Micheletti, E. Lazzeri, N. Tamassia, C. Costantini, L. Cosmi, C. Lunardi, F. Annunziato, S. Romagnani, and M.A. Cassatella. 2010. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*. 115:335–343. doi:10.1182/blood-2009-04-216085.

Peltier, J., A. O'Neill, and D. V. Schaffer. 2007. PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Dev. Neurobiol.* 67:1348–1361. doi:10.1002/dneu.20506.

Peres, R.S. 2012. Eficácia terapeutica do metotrexato na artrite reumatoide depende da expressão de células Tregs CD39+? Master Degree thesis, Universidade de São Paulo.

Perlis, R.H., S. Purcell, M. Fava, J. Fagerness, a J. Rush, M.H. Trivedi, and J.W. Smoller. 2007. Association between treatment-emergent suicidal ideation with citalopram and polymorphisms near cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in the STAR*D study. *Arch. Gen. Psychiatry*. 64:689–697. doi:10.1001/archpsyc.64.6.689.

Peyrin-Biroulet, L., G. Fiorino, A. Buisson, and S. Danese. 2013. First-line therapy in adult Crohn's disease: who should receive anti-TNF agents? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10:345–51. doi:10.1038/nrgastro.2013.31.

Pincus, T., P. Hines, M.J. Bergman, Y. Yazici, L.C. Rosenblatt, and R. MacLean. 2011. Proposed severity and response criteria for routine assessment of patient index data (RAPID3): Results for categories of disease activity and response criteria in abatacept clinical trials. *J. Rheumatol.* 38:2565–2571. doi:10.3899/jrheum.110262.

Plant, D., A.G. Wilson, and A. Barton. 2014. Genetic and epigenetic predictors of

responsiveness to treatment in RA. *Nat. Rev. Rheumatol.* 10:329–37. doi:10.1038/nrrheum.2014.16.

Prevoo, M.L.L., M.A. Van 'T Hof, H.H. Kuper, M.A. Van Leeuwen, L.B.A. Van De Putte, and P.L.C.M. Van Riel. 1995. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts: Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38:44–48. doi:10.1002/art.1780380107.

Ramanan, A. V, P. Whitworth, and E.M. Baildam. 2003. Use of methotrexate in juvenile idiopathic arthritis. *Arch. Dis. Child.* 88:197–200. doi:10.1136/adc.88.3.197.

Rantapaa-Dahlqvist, S., B.A.W. De Jong, E. Berglin, G. Hallmans, G. Wadell, H. Stenlund, U. Sundin, and W.J. Van Venrooij. 2003. Antibodies Against Cyclic Citrullinated Peptide and IgA Rheumatoid Factor Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 48:2741–2749. doi:10.1002/art.11223.

Raychaudhuri, S. 2010. Recent advances in the genetics of rheumatoid arthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* 22:109–118. doi:10.1097/BOR.0b013e328336474d.

Ren, Y., Z. Yin, K. Li, Y. Wan, X. Li, W. Wu, P. Guan, and B. Zhou. 2015. TGFβ-1 and TGFBR2 polymorphisms, cooking oil fume exposure and risk of lung adenocarcinoma in Chinese nonsmoking females: a case control study. *BMC Med. Genet.* 16:22. doi:10.1186/s12881-015-0170-5.

Reparon-Schuijt, C.C., W.J.E. Van Esch, C. Van Kooten, G.A. Schellekens, B.A.W. De Jong, W.J. Van Venrooij, F.C. Breedveld, and C.L. Verweij. 2001. Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 44:41–47. doi:10.1002/1529-0131(200101)44:1<41::AID-ANR6>3.0.CO;2-0.

Richter, J. 1992. Effect of adenosine analogues and cAMP-raising agents on TNF-, GM-CSF-, and chemotactic peptide-induced degranulation in single adherent neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 51:270–275.

Riise, T., B.K. Jacobsen, J.T. Gran, H.J. Haga, and E. Arnesen. 2001. Total mortality is increased in rheumatoid arthritis. A 17-year prospective study. *Clin. Rheumatol.* 20:123–7. doi:10.1007/PL00011191.

Rissiek, A., I. Baumann, A. Cuapio, A. Mautner, M. Kolster, P.C. Arck, A. Dodge-Khatami, H.W. Mittricker, F. Koch-Nolte, F. Haag, and E. Tolosa. 2015. The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J. Autoimmun.* 58:12–20. doi:10.1016/j.jaut.2014.12.007.

Roberts, a B., and R. Derynck. 2001. Meeting report: signaling schemes for TGF-beta. *Sci. STKE*. 2001:pe43. doi:10.1126/stke.2001.113.pe43.

Ronchetti, S., G. Nocentini, C. Riccardi, and P.P. Pandolfi. 2002. Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood*. 100:350–352. doi:10.1182/blood-2001-12-0276.

Rose, N.R., and C. Bona. 1993. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol. Today*. 14:426–430. doi:10.1016/0167-5699(93)90244-F.

De Rotte, M.C.F.J., P.H.P. De Jong, S.M.F. Pluijm, M.B. Caalasan, P.J. Barendregt, D. Van Zeben, P.A. Van Der Lubbe, P.B. De Sonnaville, J. Lindemans, J.M.W. Hazes, and R. De Jonge. 2013. Association of low baseline levels of erythrocyte folate with treatment nonresponse at three months in rheumatoid arthritis patients receiving methotrexate. *Arthritis Rheum.* 65:2803–2813. doi:10.1002/art.38113.

Rudensky, A.Y. 2011. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol. Rev.* 241:260–268. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x.

Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, and M. Ono. 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*. 133:775–787. doi:10.1016/j.cell.2008.05.009.

Saruhan-Direskeneli, G. 1998. Shared epitope homozygosity' is strongly associated with rheumatoid arthritis in Turkey. Istanbul Rheumatology Study Group. *Br. J. Rheumatol.* 37:1126–1128.

Sato, E.I. 2001. Methotrexate therapy in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 10:162–4. doi:10.1191/096120301666080831.

Schmierer, B., and C.S. Hill. 2007. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:970–982. doi:10.1038/nrm2297.

van Schouwenburg, P. a, T. Rispens, and G.J. Wolbink. 2013. Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 9:164–72. doi:10.1038/nrrheum.2013.4.

Seitz, M. 1999. Molecular and cellular effects of methotrexate. *Curr. Opin. Rheumatol.* 11:226–232. doi:10.1097/00002281-199905000-00012.

Seoane, J., H. Van Le, L. Shen, S.A. Anderson, and J. Massagué. 2004. Integration of smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*. 117:211–223. doi:10.1016/S0092-8674(04)00298-3.

Shahrara, S., Q. Huang, A.M. Mandelin, and R.M. Pope. 2008a. TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 10:R93. doi:10.1186/ar2477.

Shahrara, S., A.E.I. Proudfoot, C.C. Park, M. V Volin, G.K. Haines, J.M. Woods, C.H. Aikens, T.M. Handel, and R.M. Pope. 2008b. Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 ameliorates rat adjuvant-induced arthritis. *J. Immunol.* 180:3447–56. doi:10.4049/jimmunol.180.5.3447.

Shaywitz, A.J., and M.E. Greenberg. 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68:821–861. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.821.

Shima, Y., T. Tomita, T. Ishii, A. Morishima, Y. Maeda, A. Ogata, T. Kishimoto, and T. Tanaka. 2011. Tocilizumab, a humanized anti-interleukin-6 receptor antibody, ameliorated clinical symptoms and MRI findings of a patient with ankylosing spondylitis. *Mod. Rheumatol.* 21:436–439. doi:10.1007/s10165-011-0416-9.

Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* 3:135–142. doi:10.1038/ni759.

Silman, A.J., and J.E. Pearson. 2002. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4 Suppl 3:S265–72. doi:10.1186/ar578.

Silverman, M.H., V. Strand, D. Markovits, M. Nahir, T. Reitblat, Y. Molad, I. Rosner, M. Rozenbaum, R. Mader, M. Adawi, D. Caspi, M. Tishler, P. Langevitz, A. Rubinow, J. Friedman, L. Green, A. Tanay, A. Ochaion, S. Cohen, W.D. Kerns, I. Cohn, S. Fishman-Furman, M. Farbstein, S.B. Yehuda, and P. Fishman. 2008. Clinical evidence for utilization of the A3 adenosine receptor as a target to treat rheumatoid arthritis: data from a phase II clinical trial. *J Rheumatol*. 35:41–48.

Singh, J.A., K.G. Saag, S.L. Bridges, E.A. Akl, R.R. Bannuru, M.C. Sullivan, E. Vaysbrot, C. McNaughton, M. Osani, R.H. Shmerling, J.R. Curtis, D.E. Furst, D. Parks, A. Kavanaugh, J. O'Dell, C. King, A. Leong, E.L. Matteson, J.T. Schousboe, B. Drevlow, S. Ginsberg, J. Grober, E.W. St Clair, E. Tindall, A.S. Miller, T. Mcalindon, J. O 'dell, C. King, A. Leong, E.L. Matteson, J.T. Schousboe, B. Drevlow, and T. Mcalindon. 2016. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)*. 68:1–26. doi:10.1002/ART.39480.

Sinha, a a, M.T. Lopez, and H.O. McDevitt. 1990. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science*. 248:1380–1388. doi:10.1126/science.1972595.

Smolen, J., R.B. Landewé, P. Mease, J. Brzezicki, D. Mason, K. Luijtens, R.F. van Vollenhoven, A. Kavanaugh, M. Schiff, G.R. Burmester, V. Strand, J. Vencovský, D. van der Heijde, J. Vencovsky, and D. van der Heijde. 2009. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Ann. Rheum. Dis.* 68:797–804. doi:10.1136/ard.2008.101659.

Stamp, L.K., P.T. Chapman, J.L. O'Donnell, M. Zhang, J. James, C. Frampton, M.L. Barclay, M. a Kennedy, and R.L. Roberts. 2010. Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Pharmacogenet. Genomics*. 20:367–376. doi:10.1097/FPC.0b013e3283398a71.

Steven, A., and B. Seliger. 2015. Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target. *Oncotarget*. doi:10.18632/oncotarget.7721.

Stolt, P. 2003. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoid arthritis: results from a population based case-control study, using incident cases. *Ann. Rheum. Dis.* 62:835–841. doi:10.1136/ard.62.9.835.

Sullivan, G.W. 2003. Adenosine A2A receptor agonists as anti-inflammatory agents. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 4:1313–9. doi:14758770.

Sun, C.-X., H.W. Young, J.G. Molina, J.B. Volmer, J. Schnermann, and M.R. Blackburn. 2005. A protective role for the A1 adenosine receptor in adenosine-dependent pulmonary injury. *J. Clin. Invest.* 115:35–43. doi:10.1172/JCI22656.

Suri-Payer, E., a Z. Amar, a M. Thornton, and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 160:1212–8.

Suzuki, A., Y. Kochi, Y. Okada, and K. Yamamoto. 2011. Insight from genome-wide association studies in rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 585:3627–3632. doi:10.1016/j.febslet.2011.05.025.

Sweeney, S.E., and G.S. Firestein. 2004. Rheumatoid arthritis: Regulation of synovial inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:372–378. doi:10.1016/S1357-2725(03)00259-0.

Symmons, D.P.M., E.M. Barrett, C.R. Bankhead, D.G.L. Scott, and A.J. Silman. 1994. The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: Results from the norfolk arthritis register. *Rheumatology*. 33:735–739. doi:10.1093/rheumatology/33.8.735.

Szekanecz, Z., L. Sois, Z. Szabe, A. Fekete, A. Kapitany, A. Vigvori, S. Sipka, G. Szacs, S. Szante, and G. Lakos. 2008. Anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: As good as it gets? *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 34:26–31. doi:10.1007/s12016-007-8022-5.

Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 192:303–310. doi:10.1084/jem.192.2.303.

Tanchot, C., F. Vasseur, C. Pontoux, C. Garcia, and A. Sarukhan. 2004. Immune regulation by self-reactive T cells is antigen specific. *J.Immunol.* 172:4285–4291. doi:10.4049/jimmunol.172.7.4285.

Tang, Q., and J.A. Bluestone. 2008. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* 9:239–44. doi:10.1038/ni1572.

Tang, Q., K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi, and J.A. Bluestone. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 199:1455–65. doi:10.1084/jem.20040139.

Tarner, I.H., P. Härle, U. Müller-Ladner, R.E. Gay, and S. Gay. 2005. The different stages of synovitis: Acute vs chronic, early vs late and non-erosive vs erosive. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 19:19–35. doi:10.1016/j.berh.2004.08.002.

Thiel, M., J.D. Chambers, A. Chouker, S. Fischer, C. Zourelidis, H.J. Bardenheuer, K.E. Arfors, and K. Peter. 1996. Effect of adenosine on the expression of beta(2) integrins and L-selectin of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 59:671–82.

Thornton, A.M., P.E. Korty, D.Q. Tran, E.A. Wohlfert, P.E. Murray, Y. Belkaid, and E.M. Shevach. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 184:3433–41. doi:10.4049/jimmunol.0904028.

Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 2000. Suppressor Effector Function of CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Is Antigen Nonspecific. *J. Immunol.* 164:183–190. doi:10.4049/jimmunol.164.1.183.

Toussirot, E., and J. Roudier. 2007. Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: An update. *Jt. Bone Spine*. 74:418–426. doi:10.1016/j.jbspin.2007.05.001.

Trentham, D.E., R. a Dynesius-Trentham, E.J. Orav, D. Combitchi, C. Lorenzo, K.L. Sewell,

D. a Hafler, and H.L. Weiner. 1993. Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science*. 261:1727–1730.

Valencia, X., G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E.M. Shevach, and P.E. Lipsky. 2006. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood*. 108:253–261. doi:10.1182/blood-2005-11-4567.

Viglietta, V., C. Baecher-Allan, H.L. Weiner, and D.A. Hafler. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199:971–9. doi:10.1084/jem.20031579.

Vignali, D. a a, L.W. Collison, and C.J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8:523–532. doi:10.1038/nri2343.

Vossenaar, E.R., T.J.M. Smeets, M.C. Kraan, J.M. Raats, W.J. Van Venrooij, and P.P. Tak. 2004. The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 50:3485–3494. doi:10.1002/art.20584.

Wang, P., Y. Yang, X. Yang, X. Qiu, Z. Qiao, L. Wang, X. Zhu, H. Sui, and J. Ma. 2015. CREB1 gene polymorphisms combined with environmental risk factors increase susceptibility to major depressive disorder (MDD). *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8:906–913.

Warner, D.R., V. Bhattacherjee, X. Yin, S. Singh, P. Mukhopadhyay, M.M. Pisano, and R.M. Greene. 2004. Functional interaction between Smad, CREB binding protein, and p68 RNA helicase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324:70–76. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.017.

Warner, D.R., M.M. Pisano, and R.M. Greene. 2003a. Nuclear convergence of the TGFbeta and cAMP signal transduction pathways in murine embryonic palate mesenchymal cells. *Cell. Signal.* 15:235–42. doi:S0898656802000827 [pii].

Warner, D.R., E.A. Roberts, R.M. Greene, and M.M. Pisano. 2003b. Identification of novel Smad binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312:1185–1190. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.049.

Weinblatt, M.E., J.S. Coblyn, D.A. Fox, P.A. Fraser, D.E. Holdsworth, D.N. Glass, and D.E. Trentham. 1985. Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 312:818–22. doi:10.1056/NEJM198503283121303.

Wen, A.Y., K.M. Sakamoto, and L.S. Miller. 2010. The role of the transcription factor CREB in immune function. *J. Immunol.* 185:6413–9. doi:10.4049/jimmunol.1001829.

Wolfe, F., D.M. Mitchell, J.T. Sibley, J.F. Fries, D.A. Bloch, C.A. Williams, P.W. Spitz, M. Haga, S.M. Kleinheksel, and M.A. Cathey. 1994. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 37:481–494. doi:10.1002/art.1780370408.

Xing, J., D.D. Ginty, and M.E. Greenberg. 1996. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*. 273:959–963. doi:10.1126/science.273.5277.959.

Xinqiang, S., L. Fei, L. Nan, L. Yuan, Y. Fang, X. Hong, T. Lixin, L. Juan, Z. Xiao, S. Yuying, and X. Yongzhi. 2010. Therapeutic efficacy of experimental rheumatoid arthritis with low-dose methotrexate by increasing partially CD4+CD25+Treg cells and inducing Th1 to Th2 shift in both cells and cytokines. *Biomed. Pharmacother.* 64:463–471. doi:10.1016/j.biopha.2010.01.007.

Yadav, M., C. Louvet, D. Davini, J.M. Gardner, M. Martinez-Llordella, S. Bailey-Bucktrout, B.A. Anthony, F.M. Sverdrup, R. Head, D.J. Kuster, P. Ruminski, D. Weiss, D. Von Schack, and J.A. Bluestone. 2012. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* 209:1713–22, S1–19. doi:10.1084/jem.20120822.

Yan, X., Z. Liu, and Y. Chen. 2009. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 41:263–272. doi:10.1093/abbs/gmp018.Review.

Yanagimachi, M., T. Naruto, T. Hara, M. Kikuchi, R. Hara, T. Miyamae, T. Imagawa, M. Mori, T. Kaneko, S. Morita, H. Goto, and S. Yokota. 2011. Influence of polymorphisms within the methotrexate pathway genes on the toxicity and efficacy of methotrexate in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 71:237–243. doi:10.1111/j.1365-2125.2010.03814.x.

Yang, H., G. Li, J.-J. Wu, L. Wang, M. Uhler, and D. Simeone. 2013. PKA Modulates TGF-

beta Signaling through a Direct Interaction with Smad4. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M113.455675.

Yocum, D.E. 1994. The use of immunomodulators in early rheumatoid arthritis. *Semin. Arthritis Rheum.* 23:44–49. doi:10.1016/0049-0172(94)90084-1.

Yun, J.Y., Y.K. Uhm, H.J. Kim, S.H. Lim, J.H. Chung, M.K. Shin, S. V. Yim, and M.H. Lee. 2010. Transforming growth factor beta receptor II (TGFBR2) polymorphisms and the association with nonsegmental vitiligo in the Korean population. *Int. J. Immunogenet.* 37:289–291. doi:10.1111/j.1744-313X.2010.00923.x.

Zarek, P.E., C.T. Huang, E.R. Lutz, J. Kowalski, M.R. Horton, J. Linden, C.G. Drake, and J.D. Powell. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*. 111:251–259. doi:10.1182/blood-2007-03-081646.

Zhang, Y.E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 19:128–39. doi:10.1038/cr.2008.328.

Zheng, Y., and A.Y. Rudensky. 2007. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* 8:457–462. doi:10.1038/ni1455.

8- ANEXOS

ANEXO A (Ficha para coleta dos dados de pacientes)

Ficha para coleta de dados – Estudo anti-CCP e artrite reumatóide

Nome:_____Registro:_____DN:___/__/_____
Idade:_____ Sexo: □ M □ F Raça: □Caucasiana □Negra □Mulata □Amarela
Est. Civil:_____ Profissão:_____ Natural.:_____□ Urb □ Rur
1º Atendimento:__/__/____ Tempo de Doença:_____
Data da Avaliação:__/__/____ Data da coleta:__/__/____

CRITÉRIOS PARA ARTRITE REUMATÓIDE
□ Rigidez matinal maior que 1 hora
□ Artrite observada pelo médico em 3 ou mais articulações das 14 seguintes: IFP, MCF, punhos, cotovelos, MTF, tornozelos e joelhos. Cada lado (direito ou esquerdo) é considerado uma área
□ Artrite observada pelo médico em pelo menos 1 das articulações das mãos, ou seja IFP, MCF e punhos
□ Artrite simétrica. Acometimento simultâneo da mesma articulação em ambos os lados do corpo. O acometimento das IFP, MCF e MTF é aceitável sem absoluta simetria
□ Nódulos subcutâneos observados pelo médico
□ Presença de títulos anormais de Fator Reumatóide
□ Alterações radiológicas características da AR

Pode-se dizer que o paciente tem Artrite Reumatóide caso sejam satisfeitos 4 ou mais dos 7 critérios acima, sendo que os quatro primeiros devem estar presentes por pelo menos 6 semanas

---

ENVOLVIMENTO EXTRA-ARTICULAR
□ Perda de peso_____Kg
□ **Cutâneo**: □ Púrpura □ Úlcera □ Outros_____
□ **Ocular**: □ Uveíte □ Esclerite □ Retinite □ Outros_____
□ **Pulmonar**: □ Doença Intersticial Crônica □ Derrame Pleural □ Outros_____
□ **Cardíaco**: □ Miocardite □ Pericardite □ Outros_____
□ **Hematológico**: □ Sd de Felty □ Anemia dça cr □ Outros_____
□ **Neurológicas**: □ Mononeurite Múltipla □ Compressão nervosa periférica □ Outros_____
□ **Outras manifestações**:_____

CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL
□ Classe I □ Classe II □ Classe III □ Classe IV

CLASSIFICAÇÃO RADIOLÓGICA
Índice de Larsen-Dale
□ Grau 0 □ Grau 1 □ Grau 2 □ Grau 3 □ Grau 4 □ Grau 5 Score de Larsen:_____

TRATAMENTO PRÉVIO
□ Prednisona – AI □ Prednisona – IS □ Pulso de Metilprednisolona
□ Cloroquina □ Metotrexato □ Sulfasalazina
□ Ciclosporina □ Azatioprina □ Ciclofosfamida (□ VO □ EV)
□ Clorambucil □ Anti-TNF □ Outros_____

TRATAMENTO ATUAL
□ Prednisona – AI □ Prednisona – IS □ Pulso de Metilprednisolona
□ Cloroquina □ Metotrexato □ Sulfasalazina
□ Ciclosporina □ Clorambucil □ Ciclofosfamida (□ VO □ EV)
□ Leflunomide □ Anti-TNF □ Outros_____

ANTECEDENTES
□ Alcoolismo □ Tabagismo □ Cushing iatrogênico □ Osteoporose
□ Hepatopatia □ Hepatotoxicidade □ Nefrotoxicidade □ Intolerância GI
□ Infecciosos (□ Tb □ Herpes zoster □ Cutâneo □ Sinusite □ Pneumonia □ ITU)

□ Citopenias por drogas (□ Série vermelha □ Série branca □ Série megacariocítica)

EXAMES LABORATORIAIS

□ Fator Reumatóide_____ □ Anti-CCP_____ □ FAN_____

Tipagem dos genes HLA de Classe II

DRB1_____

DQB1_____

DAS28

Nº artic. dolorosas :_____

Nº artic. inflamadas:_____

VHS:_____

Escala Visual Analógica de Dor:_____

DAS 28:_____

ANEXO B (Comitê de Ética em Pesquisa)

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Departamento de Farmacologia
Prof. Dr.Fernando de Queiroz Cunha

Ribeirão Preto, 28 de junho de 2016.

Prezado Prof. Dr. João Santana da Silva
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da FMRP/USP

Declaro para os devidos fins que os experimentos da tese do doutorando **Raphael Sanches Peres**, intitulada *"A sinalização de TGF-β envolvida na expressão de CD39 em células T reguladoras está associada com a eficácia terapêutica do metotrexato na artrite reumatoide"* seguiu todos os procedimentos éticos em humanos. De fato, todos os experimentos bem como a coleta de amostras realizados nesta tese estão inseridos em projetos mais amplos desenvolvidos pelo nosso laboratório, que foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP de acordo com os protocolos 2981/2009 e 4191/2015.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP - Av. Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - SP
CEP: 14.049-900 - Fone: (016) 3602-3324
FAX: (016) 3633 2301 - E-Mail: fdqcunha@fmrp.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
www.hcrp.fmrp.usp.br
USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 01 de setembro de 2009

Ofício nº 2940/2009
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"PAPEL DO RECEPTOR DE HIDROCARBONETOS DE ARILA (AhR) NA ARTRITE EXPERIMENTAL E A INFLUÊNCIA DE SEUS POLIMORFISMOS NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA ARTRITE REUMATÓIDE"** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 294ª Reunião Ordinária realizada em 31/08/2009 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 2981/2009.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
PROF. DR. PAULO LOUZADA JUNIOR
Prof. Dr. Fernando de Q. Cunha/José C. A. Filho/Fabiana Machado
Depto. de Clínica Médica

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Depto. C... HCRP
Recebi em: 9.9.09
às ... h. ...

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 25 de novembro de 2015

Ofício nº 4191/2015
CEP/MGV

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **"PAPEL DOS microRNA NA ARTRITE REUMATÓIDE" – Versão 3, de 19/09/2015,** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 418ª Reunião Ordinária realizada em 23/11/2015 e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o **Biorrepositório, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - versão Paciente - versão 3, de 19/09/2015, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Doadores do Banco de Sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto – versão 3, de 17/08/2015, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Voluntários Saudáveis do Ambulatório de Ortopedia – versão 3, de 19/09/2015 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico, versão 1, de 17/08/2015,** de acordo com o Processo HCRP nº 5776/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
PAULA BARBIM DONATE YABUTA
Depto. de Farmacologia da FMRP-USP

ANEXO C (Certificado de depósito de patente)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

OF. AG. USP Inovação / 0316 / 2013

São Paulo, 09 de maio de 2013.

REF.: DEPÓSITO DO PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO "MÉTODO DE AVALIAÇÃO DA PREDIÇÃO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA DE UM INDIVÍDUO A UM DADO MEDICAMENTO E KITS PARA SUA REALIZAÇÃO".

Senhor(a) Professor(a),

Informamos a V.Sa. que em 03.05.13, foi protocolado junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial - I.N.P.I./S.P. o depósito do pedido de patente de invenção em referência, o qual recebeu o nº. ***BR 10 2013 010996-7***.

Colocamo-nos à inteira disposição para eventuais esclarecimentos que se fizerem necessários.

Atenciosamente,

Jussara S. Ferreira
Ch. Seç. Apoio a Inovação

ANEXO D (Certificado do Prêmio recebido pelo Ministério da Saúde)

Prêmio de Incentivo em Ciência e Tecnologia para o SUS - 2015

CERTIFICADO

O Ministério da Saúde certifica que o trabalho **Expressão reduzida de CD39 em células T reguladoras (Tregs) como biomarcador de resposta ao tratamento com metotrexato na artrite reumatóide** de autoria de **Raphael S. Peres, Foo Y. Liew, Jhimmy Talbot, Vanessa Carregaro, René D. Oliveira, Sérgio L. Almeida, Rafael F. O. França, Paula B. Donate, Larissa G. Pinto, Flávia I. S. Ferreira, Diego L. Costa, Daniel P. Demarque, Dayana R. Gouvea, Norberto P. Lopes, Regina H. C. Queiroz, João S. Silva, Florêncio Figueiredo, José C. Alves-Filho, Thiago M. Cunha, Sérgio H. Ferreira, Paulo Louzada-Junior, Fernando Q. Cunha**, foi primeiro colocado na categoria **TRABALHO PUBLICADO** do Prêmio de Incentivo em Ciência e Tecnologia para o SUS 2015.

Brasília, novembro de 2015.

Márcia Luz da Motta
Diretora do Departamento de Ciência e Tecnologia

SUS

Ministério da Saúde

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA

9- ARTIGOS

Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis

Raphael Sanches Peres[a], Foo Y. Liew[b,c,1], Jhimmy Talbot[a], Vanessa Carregaro[d], Rene D. Oliveira[e], Sergio L. Almeida[e], Rafael F. O. França[a], Paula B. Donate[a], Larissa G. Pinto[a], Flavia I. S. Ferreira[f], Diego L. Costa[d], Daniel P. Demarque[g], Dayana Rubio Gouvea[g], Norberto P. Lopes[g], Regina Helena C. Queiroz[f], Joao Santana Silva[d], Florencio Figueiredo[h], Jose Carlos Alves-Filho[a], Thiago M. Cunha[a], Sérgio H. Ferreira[a,1], Paulo Louzada-Junior[e,1], and Fernando Q. Cunha[a,1]

Departments of [a]Pharmacology, [d]Biochemistry and Immunology, and [e]Internal Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, Center of Research in Inflammatory Diseases, University of São Paulo, Ribeirão Preto, CEP 14049-900, Sao Paulo, Brazil; [b]Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow G12 8TA, United Kingdom; [c]School of Biology and Basic Medical Sciences, Soochow University, Suzhou 215006, China; [f]Department of Clinical, Toxicological and Bromatological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, CEP 14049-900, Sao Paulo, Brazil; [g]Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos, Department of Physics and Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, CEP 14049-900, Sao Paulo, Brazil; and [h]Laboratory of Pathology, Faculty of Medicine, University of Brasilia, CEP 70910-900, Brasilia, Brazil

Contributed by Sérgio H. Ferreira, January 12, 2015 (sent for review May 2, 2014); reviewed by Luis Eduardo Coelho Andrade and Matthew Liang

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory autoimmune disease characterized by joint destruction and severe morbidity. Methotrexate (MTX) is the standard first-line therapy of RA. However, about 40% of RA patients are unresponsive to MTX treatment. Regulatory T cells (Tregs, $CD4^+CD25^+FoxP3^+$) are thought to play an important role in attenuating RA. To investigate the role of Tregs in MTX resistance, we recruited 122 RA patients (53 responsive, R-MTX; 69 unresponsive, UR-MTX) and 33 healthy controls. Three months after MTX treatment, R-MTX but not UR-MTX showed higher frequency of peripheral blood $CD39^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs than the healthy controls. Tregs produce adenosine (ADO) through ATP degradation by sequential actions of two cell surface ectonucleotidases: CD39 and CD73. Tregs from UR-MTX expressed a lower density of CD39, produced less ADO, and had reduced suppressive activity than Tregs from R-MTX. In a prospective study, before MTX treatment, UR-MTX expressed a lower density of CD39 on Tregs than those of R-MTX or control ($P < 0.01$). In a murine model of arthritis, CD39 blockade reversed the antiarthritic effects of MTX treatment. Our results demonstrate that MTX unresponsiveness in RA is associated with low expression of CD39 on Tregs and the decreased suppressive activity of these cells through reduced ADO production. Our findings thus provide hitherto unrecognized mechanism of immune regulation in RA and on mode of action of MTX. Furthermore, our data suggest that low expression of CD39 on Tregs could be a noninvasive biomarker for identifying MTX-resistant RA patients.

methotrexate | rheumatoid arthritis | adenosine | biomarker | ectonucleotidases

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory autoimmune disease characterized by chronic and deforming destructive polyarthritis and occasionally extraarticular features accompanied by systemic dysfunctions in many patients. Multiple clinical features of RA and heterogeneous therapeutic responses may be influenced by genetic, environmental, and immunologic factors (1). Although some of these features have been used for disease stratification and prognostic (2, 3), they have failed to predict the response to treatments. The first-line pharmacotherapy for RA is low-dose methotrexate (MTX), an antimetabolic drug and an inhibitor of dihydrofolate reductase/folic acid metabolism (4). However, a significant percentage of RA patients are resistant to MTX treatment, which compels the later use of other therapeutic strategies, especially immunobiologics, such as TNF-α targeting (5). The reasons for the unresponsiveness to MTX therapy remain unknown. Understanding MTX resistance would be important, and a biomarker identifying unresponsive MTX (UR-MTX) patients would be valuable to start alternative effective therapies without undue delay.

In addition to its anti-folate effect, MTX also dampens inflammation by maintaining high levels of extracellular adenosine (ADO) (4, 6). MTX inhibits the enzyme 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) transformilase, leading to the accumulation of AICAR. AICAR accumulation culminates in the release of ATP to extracellular compartment. The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (CD39/ENTP1) hydrolyzes ATP and ADP to AMP, and subsequently, the ecto-5′-nucleotidase (CD73) degrades AMP to ADO (7). Blockage of adenosine receptors reduces the anti-inflammatory effect of MTX in humans and in a murine model of arthritis (8, 9). Furthermore, MTX failed to inhibit carrageenan-induced inflammation in CD73-deficient mice (10).

Regulatory T cells (Tregs) are a subset of $CD4^+$ T cells critical for immune homeostasis, preventing the onset of autoimmunity

MEDICAL SCIENCES

Significance

Methotrexate (MTX) is the first-line therapy for rheumatoid arthritis (RA). However, about 40% of patients are resistant to MTX. Furthermore, MTX resistance is only apparent after a prolonged continuous MTX treatment (>3 mo), by which time the disease of the nonresponders would have aggravated. Thus, there is a considerable unmet need for a biomarker to select MTX-resistant patients and place them immediately on alternative therapy. We found here that the low density of CD39 on peripheral regulatory T cells in RA patients is a rapid, convenient, and reliable ($P < 0.01$) biomarker for MTX resistance. Our findings also provide previously unrecognized information on aspects of immune regulation in RA and the mechanism of action of MTX.

Author contributions: R.S.P., J.T., R.D.O., S.L.A., R.F.O.F., P.B.D., L.G.P., F.I.S.F., D.L.C., D.P.D., and D.R.G. performed research; F.Y.L., J.T., V.C., J.C.A.-F., T.M.C., S.H.F., P.L.-J., and F.Q.C. designed research; N.P.L., R.H.C.Q., J.S.S., F.F., P.L.-J., and F.Q.C. contributed new reagents/analytic tools; R.S.P. and J.T. analyzed data; and R.S.P., F.Y.L., P.L.-J., and F.Q.C. wrote the paper.

Reviewers: L.E.C.A., Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo; and M.L., Harvard Medical School.

The authors declare no conflict of interest.

[1]To whom correspondence may be addressed. Email: f.y.liew@clinmed.gla.ac.uk, shferrei@fmrp.usp.br, plouzada@fmrp.usp.br, or fdqcunha@fmrp.usp.br.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1424792112/-/DCSupplemental.

diseases. Human and murine Tregs are identified by high expression of CD25 (IL-2α chain receptor) and the master transcription factor forkhead box P3 (FoxP3), which controls Treg development and function (11–13). Tregs suppress the activation, proliferation, and effector functions of a wide range of immune cells via multiple mechanisms (14). One of these mechanisms is via the production of extracellular ADO mediated by CD39/CD73, which are highly expressed on the Treg surface (7). ADO suppresses effector T-cell function through activation of adenosine receptor 2a (A2aR) and adenosine receptor 2b (A2bR) (15, 16), which promote the blockade of cell proliferation, release of cytotoxic granules, expression of FasL, and proinflammatory cytokines secretion (17). Furthermore, activation of A2aR by ADO also enhances the generation of induced Tregs (iTregs) by inhibiting IL-6 expression and enhancing TGF-β secretion (18). In addition, ADO can also affect dendritic cell (DC) function, modulating their maturation and consequently driving them to a tolerogenic phenotype (19, 20).

Given that the anti-inflammatory effects of MTX are associated with ADO generation by CD39/CD73 and the importance of these ectonucleotidases in Treg suppressive function, we investigated the possibility that MTX unresponsiveness in RA patients is associated with a deficiency of ADO generation by Tregs due to a depressed expression of CD39/CD73 on Tregs. We found that after MTX therapy, responsive patients (R-MTX), but not UR-MTX patients, presented enhanced frequency of Tregs compared with healthy donors. Furthermore, Tregs from UR-MTX patients had impaired ADO production compared with Tregs from R-MTX or healthy controls. This impairment was associated with lower CD39 expression on the Treg surface before and after MTX. Moreover, Tregs from UR-MTX patients are less effective in suppressing T-effector cell proliferation compared with those from R-MTX or healthy controls via reduced production of ADO. Taken together, our results provide a hitherto unrecognized mechanism of immune regulation in RA and on mode of action of methotrexate, in addition to the potential value for prediction of response to methotrexate.

Results

Characterization of RA Patients. We recruited 122 random RA patients who received MTX monotherapy at doses from 15 to 20 mg/wk, maintained for at least 4 wk before peripheral blood collection. In some patients, blood samples were also collected before MTX monotherapy. Disease activity was measured using disease activity score, including a 28-joint count (DAS28). RA patients were stratified according to their response to MTX therapy following these criteria: (*i*) UR-MTX ($n = 69$), treated with MTX doses ≥15 mg/wk for at least 3 mo and still presented active disease (DAS28 > 4.0); and (*ii*) R-MTX ($n = 53$), treated with MTX for >3 mo and presented DAS28 < 3.0. We also recruited 33 healthy blood donors for the study.

The clinical and serological features of RA patients are shown in Table S1. There was no significant difference in demographic (sex and age), clinical (time of disease, smoking habits), and serological variables [rheumatoid factor (RF), anticitrullinated protein antibodies (ACPA)] between R-MTX and UR-MTX patients. Parameters related to disease activity [C-reactive protein (CRP) and DAS28] and plasma concentrations of TNF-α and IL-1β were significantly higher in UR-MTX compared with R-MTX following MTX treatment (Fig. S1 *A* and *B*).

Increased Circulating Tregs and Decreased Th17 and Th1 cells in R-MTX Patients. We first determined the level of serum inflammatory cytokines and the frequencies of blood leukocyte subtypes in peripheral mononuclear cell populations from UR-MTX and R-MTX patients 3 mo after MTX treatment. UR-MTX showed significantly higher levels of serum TNF-α and IL-1β compared with R-MTX and healthy controls, although the levels of these cytokines are generally low (10–70 pg/mL; Fig. S1*B*). R-MTX patients showed a higher frequency of IL-10–producing $CD4^+$ T cells compared with UR-MTX patients or healthy controls. The frequency of $CD4^+$ IL-10^+ cells in UR-MTX was not different from healthy controls. In contrast, the frequencies of $CD4^+$IL-17^+ (Th17) and $CD4^+$IFN-γ^+ (Th1) populations were higher in UR-MTX than in R-MTX or healthy controls (Fig. S1*C*). The frequencies of $CD3^+$, $CD4^+CD3^+$, and $CD8^+CD3^+$ T cells and B cells ($CD19^+CD3^-$) were similar among UR-MTX, R-MTX, and healthy controls (Fig. S2). However, the percentage of dendritic cells (DCs; $CD11b^+$ $CD11c^+$) was higher in RA patients than in healthy controls whether the patients were responsive or not to MTX therapy. Strikingly, R-MTX had markedly higher frequencies and number of peripheral Tregs ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) compared with UR-MTX or controls (Fig. 1 *A* and *B*). There was no difference in the frequency and number of Tregs between healthy controls and UR-MTX groups. These data suggest that the therapeutic effectiveness of MTX could be associated with an increase of circulating Tregs in RA patients.

Expression and Function of CD39 and CD73 on Tregs from RA Patients. We next determined the expression of CD39 and CD73 on the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of RA patients. R-MTX had a higher frequency of $CD39^+$ $CD4^+$ T cells compared with UR-MTX or healthy controls (Fig. 1 *C* and *D*), whereas $CD73^+CD4^+$ T-cell frequencies were not different in all investigated groups (Fig. 1 *E* and *F*). There was also no difference in the percentages of CD39 or CD73 expressing $CD8^+CD3^+$ T cells, B cells, or DCs in all three groups analyzed (Fig. S3). The frequencies of $CD39^+CD4^+CD25^+$ T cells and $CD39^+CD4^+$ $CD25^+FoxP3^+$ Tregs were significantly higher in the R-MTX than those in the UR-MTX or healthy controls (Fig. 1 *G* and *H*). There was no difference in the percentage of $CD39^+$ cells on the Treg population between healthy controls and UR-MTX patients. There was also no difference in the relatively low percentage of $CD39^+$ cells in the population of $CD4^+CD25^-$ cells (effectors T lymphocytes) among the three groups (Fig. 1*I*). There was no difference in the frequency of $CD73^+$ T cells among the Treg populations (Fig. S4*A*).

We then determined the density of CD39 expression [mean fluorescent intensity (MFI)] on Tregs from RA patients. The CD39 MFI on $CD4^+CD25^+$ cells from UR-MTX patients were markedly lower compared with healthy controls or R-MTX patients (Fig. 2 *A* and *B*). This finding is specific for the $CD4^+$ $CD25^+$ cells population, because there was no difference in the relatively low MFI of CD39 expression on $CD4^+CD25^-$ cells in the three investigated groups. There was also no difference in the CD73 MFI on $CD4^+CD25^+$ (Fig. S4*B*). These results suggested an association between CD39 expression on Tregs and responsiveness to MTX. Furthermore, the data also indicate that Tregs from UR-MTX express significantly lower density of CD39 than that on the Tregs from R-MTX or healthy controls.

Next we examined whether the lower expression of CD39 on Tregs from UR-MTX patients leads to impaired conversion of ADP into extracellular ADO. $CD4^+CD25^+$ and $CD4^+CD25^-$ T cells were purified from the peripheral blood of RA patients and healthy donors. The purity of the $CD4^+CD25^+$ were >85%, of which >77% were $FoxP3^+$ (Fig. S5). The cells were incubated with ADP, and the ADO generated in the culture supernatant was quantified by HPLC. The ability of Tregs from UR-MTX to generate ADO was markedly impaired compared with that of the Tregs from R-MTX patients or healthy individuals (Fig. 2 *C* and *D*). This difference was not observed in the relatively lower ADO production by $CD4^+CD25^-$ (effectors T cells) cells from all of the three groups analyzed (Fig. 2*D*). The conversion of ADP by ectonucleotidases was also quantified by the production of inorganic phosphate (Pi) with the colorimetric Malachite Green

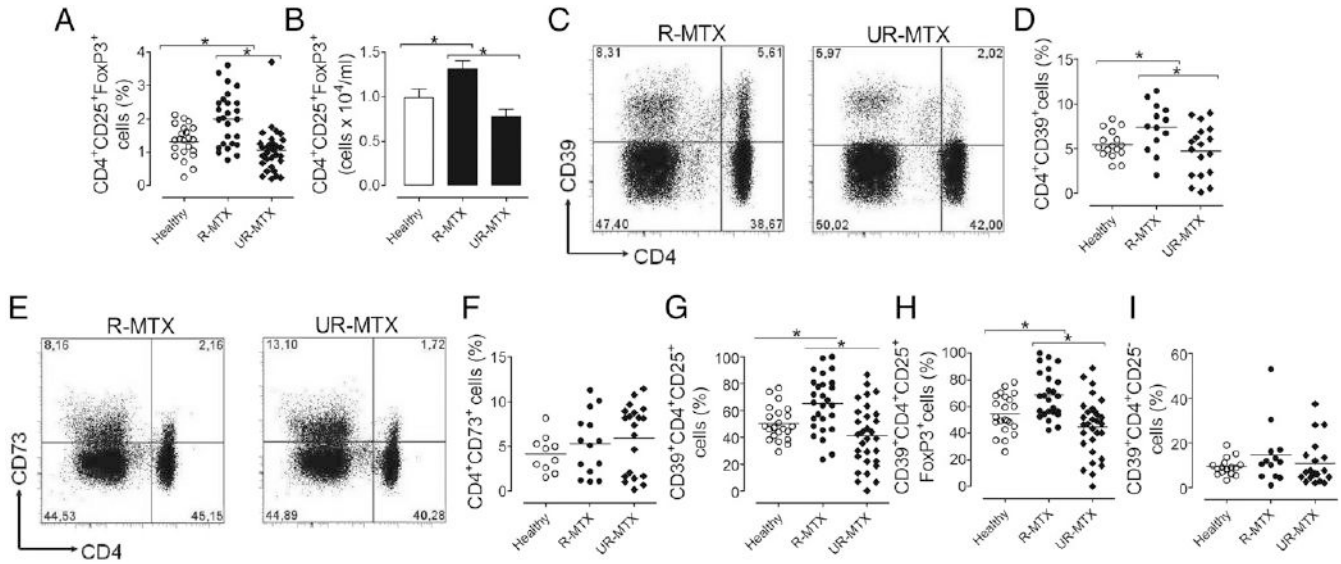


Fig. 1. Increased frequency of circulating Tregs in R-MTX patients. (*A* and *B*) Frequency and absolute number of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ cells from healthy controls (Healthy) (○, $n = 22$), R-MTX (●, $n = 27$), and UR-MTX (♦, $n = 30$) RA patients analyzed by flow cytometry. (*C*) Representative dot plot showing frequency of $CD4^+CD39^+$ cells from R-MTX and UR-MTX patients. (*D*) Percentage of $CD4^+CD39^+$ cells from healthy donors (○, $n = 16$), R-MTX (●, $n = 13$), and UR-MTX (♦, $n = 20$). (*E*) Representative dot plot showing percentage of $CD4^+CD73^+$ cells from R-MTX and UR-MTX patients. (*F*) Percentage of $CD4^+CD73^+$ cells from healthy donors (○, $n = 10$), R-MTX (●, $n = 13$), and UR-MTX (♦, $n = 20$). (*G* and *H*) Frequency of $CD4^+CD25^+$ (*G*) and $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (*H*) cells expressing CD39 in healthy donors (○, $n = 22$), R-MTX (●, $n = 27$), or UR-MTX (♦, $n = 30$). (*I*) Frequency of $CD4^+CD25^-$ cells expressing CD39 in healthy donors (○, $n = 16$), R-MTX (●, $n = 13$), or UR-MTX (♦, $n = 20$). Horizontal bars = mean; vertical bars = SEM. $^*P < 0.05$.

assay. Consistent with results from the ADO assay, the Pi concentration in the supernatants of $CD4^+CD25^+$ cells from UR-MTX was significantly lower compared with those of R-MTX or healthy controls (Fig. 2*E*). The Pi concentrations in the supernatant of $CD4^+CD25^-$ cells remained at the background level for all of the three groups.

We then investigated the relative suppressive activity of the Tregs from the RA patients. $CD4^+CD25^+$ T cells were purified from RA patients and healthy donors and cultured with $CD4^+CD25^-$ T cells at a graded ratio of Teff: Treg. The proliferation of Teff cells against polyclonal activation (anti-CD3/CD28) was then tracked by Dye Eflour 670. Tregs from UR-MTX show significantly lower potency in suppressing Teff cells compared with those from R-MTX or healthy controls at a 1:1 and 1:0.5 Teff: Treg ratio (Fig. 2 *F* and *G*).

An additional potential mechanism of MTX unresponsiveness in RA patients might involve the reduction of adenosine receptors expression on the surface of leukocytes, especially A2aR and A2bR, which mediates anti-inflammatory response of ADO (21). However, there was no difference in the level of A2aR and A2bR mRNA expression in the PBMC cells from the three groups analyzed (Fig. S6).

Together, these data demonstrate that the reduced CD39 expression observed on Tregs from UR-MTX patients leads to decreased production of extracellular ADO, with subsequent diminished Treg suppressive potential.

CD39 Expression on Tregs Before and After MTX Treatment in RA Patients. We next investigated whether the increase in the frequency of Tregs and $CD39^+$ Tregs in R-MTX patients is a consequence of MTX treatment or is it intrinsic to these patients. To address this question, we determined the frequency of Tregs and $CD39^+$ Tregs, as well as the density of CD39 expression on Tregs in RA patients before and after MTX treatment (at least 3 mo of MTX administration at doses ≥15 mg/wk). First, we demonstrated that the MTX resistance is not a consequence of a low availability of intracellular active MTX (22, 23). We measured total MTX polyglutamate metabolites levels in erythrocytes from RA patients treated at least 3 mo with MTX. The concentrations of MTX polyglutamate are at reported saturation level and similar in R-MTX and UR-MTX groups (Fig. S7).

There was no difference in the frequency and absolute number of Tregs between R-MTX and UR-MTX patients before MTX treatment (Fig. S8 *A* and *B*). However, R-MTX showed a significant increase in frequency and number of circulating Tregs after MTX treatment, whereas the Tregs of UR-MTX remained unchanged. We also examined the frequency of $CD39^+$ Tregs before and after MTX treatment. There was no difference in the percentage of peripheral $CD39^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T cells among the two groups before MTX treatment. However, the percentage of these cells markedly increased following treatment in the R-MTX but not in the UR-MTX (Fig. S8*C*). These data are consistent with the notion that MTX responsiveness is directly related to the expansion of $CD39^+$ Tregs after MTX treatment in R-MTX but not in UR-MTX, likely via the ADO/A2aR pathway.

Tregs of UR-MTX Patients Express Low Density of CD39 Before and After MTX Treatment. We then examined the density of CD39 expression on Tregs from the RA patients before and after MTX treatment. The MFI of CD39 on $CD39^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T cells from R-MTX was significantly higher than those from the UR-MTX (Fig. 3 *A* and *B*). Importantly, the CD39 MFI of UR-MTX was significantly lower than those of the R-MTX and healthy controls before and after MTX treatment (Fig. 3*C*; $P < 0.01$). Strikingly, the MFI of CD39 expression was not altered following MTX treatment in all RA patients. Fig. 3*D* shows the combined data of CD39 density on Tregs from RA patients after MTX treatment. These results show that reduced density of CD39 on Tregs is strongly associated with the failure to responsive to MTX. Crucially, the low level of CD39 expression before MTX treatment could be used to predict MTX unresponsiveness, with >99% confidence.

Effect of MTX on the Development of Experimental Arthritis. To examine the relevance of our finding in vivo, we used the murine antigen-induced arthritis (AIA) model. C57BL/6 FoxP3-GFP

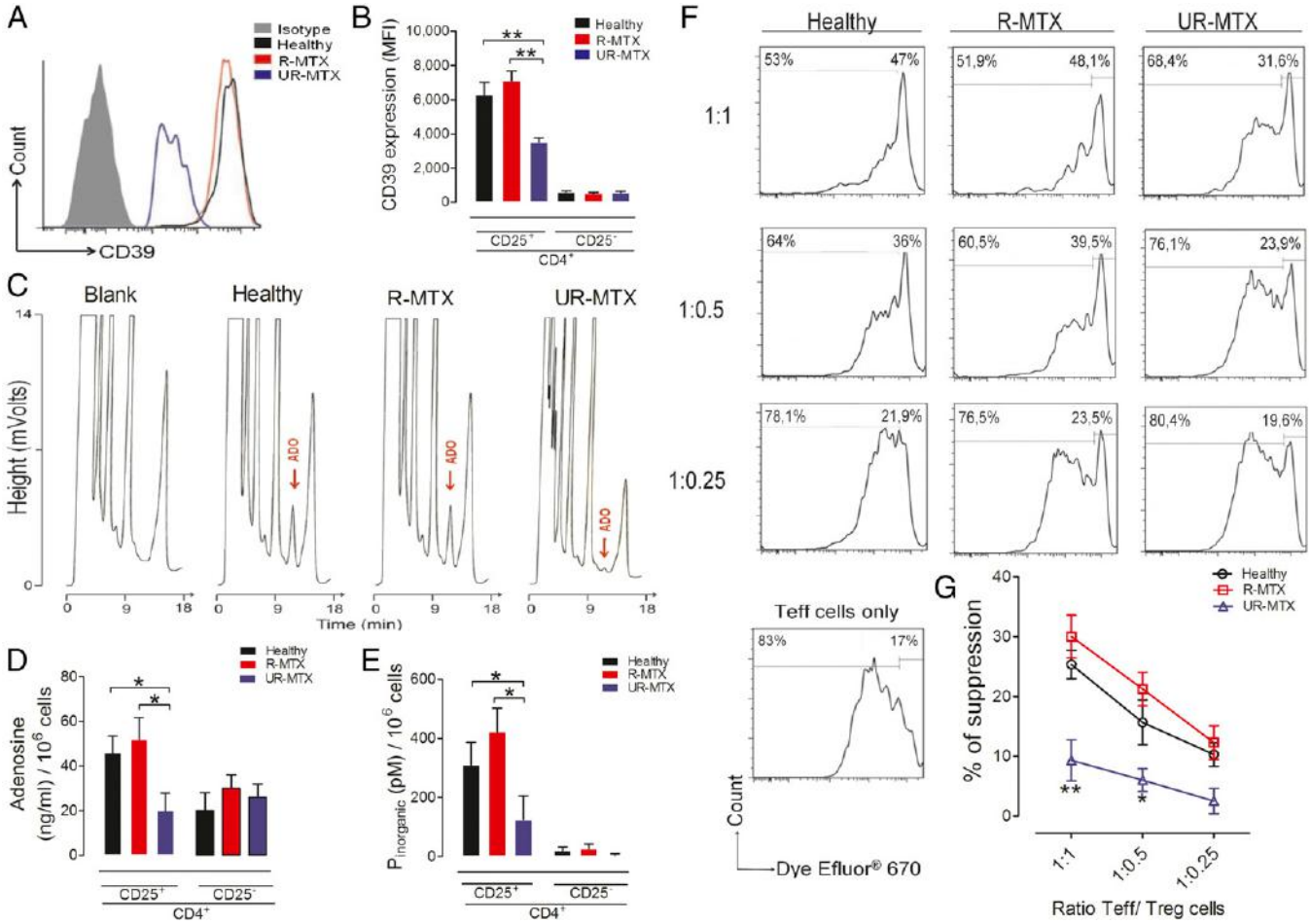


Fig. 2. Low CD39 expression, impaired ADO production, and reduced suppressive function of Tregs from UR-MTX patients. (*A*) Representative histogram of CD39 expression on $CD4^+CD25^+$ cells from healthy individuals, R-MTX, and UR-MTX patients. (*B*) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD39 on $CD4^+CD25^+$ and $CD4^+CD25^-$ cells from healthy donors ($n = 10$), R-MTX ($n = 13$), and UR-MTX ($n = 20$) 3 mo after MTX treatment. $^{**}P < 0.01$. (*C*) Representative chromatograms of ADO levels in culture supernatant of Tregs from healthy donors, R-MTX, and UR-MTX patients incubated with ADP. Tregs from healthy donors cultured without ADP serve as control (Blank). (*D*) Concentration of ADO in the supernatant of $CD4^+CD25^+$ and $CD4^+CD25^-$ cells from healthy individuals ($n = 5$), R-MTX ($n = 6$), and UR-MTX patients ($n = 6$). $^*P < 0.05$. (*E*) Concentration of Pi in the supernatant of $CD4^+CD25^+$ and $CD4^+CD25^-$ cells of healthy controls ($n = 5$), R-MTX ($n = 6$), and UR-MTX ($n = 6$) patients. $^*P < 0.05$. (*F*) Representatives histograms of the percentages of proliferation of Teff cells stained with Dye Efluor 670 and incubated with Treg cells from healthy or MTX-treated RA donors at the indicated Treg:Teff ratio. (*G*) Percentage of suppression of Teff by Tregs from healthy ($n = 5$), R-MTX ($n = 5$), and UR-MTX ($n = 4$) donors, using the formula [Teff only − (Treg + Teff)/Teff only] × 100. $^*P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$ compared with healthy controls. All data are mean ± SEM.

mice were immunized with methylated BSA (mBSA) in Freund's complete adjuvant and challenged in the joint with soluble mBSA after two booster injections. MTX was administered orally (2 mg/kg) once a week for 5 wk during the immunization protocol. MTX markedly reduced arthritis development as evidenced by a decrease of neutrophil migration into the joint and attenuation of mechanical articular hyperalgesia (Fig. 4 *A* and *B*). The effect of MTX treatment was not due to impaired mBSA priming, because the plasma titers of specific anti-mBSA IgG were similar between the MTX- and PBS-treated groups (Fig. 4*C*). To address the possibility that MTX treatment could induce apoptosis of activated T cells (24, 25), we assess the level of apoptotic $CD4^+$ T cells in the spleen and draining lymph nodes of MTX-treated mice. Under our experimental conditions, the apoptosis rate of activated ($CD44^+$) and naive ($CD44^-$) $CD4^+$ cells were similar in naïve, immunized, and MTX-treated and untreated mice (Fig. S9 *A* and *B*). Similar to that seen in the RA patients, MTX treatment significantly increased the Treg ($CD4^+FoxP3^+$) population in the spleen of arthritic mice (Fig. 4*D*).

To determine whether the effectiveness of MTX therapy is dependent on Treg expansion, mice were treated with α-CD25 antibody during MTX treatment. In our model, α-CD25 antibody had only a modest effect on arthritis development in mice not treated with MTX, but completely reversed the antiarthritic effect of MTX (Fig. 4 *E* and *F*). Naive mice treated with vehicle, anti-CD25, or MTX did not induce signs of hyperalgesia or neutrophil infiltration. These results show that the antiarthritic effect of MTX is likely Treg dependent.

To assess the role of CD39 in the antiarthritic effect of MTX in vivo, mice were treated with a selective CD39 inhibitor (CD39i, ARL67156, 1 mg/kg) (26) during MTX treatment. CD39i increased the arthritic severity in immunized mice not treated with MTX and completely abolished the antiarthritic effect of MTX as measured by neutrophil infiltration and hyperalgesia (Fig. 4 *G* and *H*). Consistent with this observation, the increased frequency of Tregs induced by MTX was also abrogated by CD39i (Fig. 4*I*). This finding was confirmed by histological analysis. The joints of immunized mice 14 d after challenge developed severe synovitis (inflammatory cell influx)

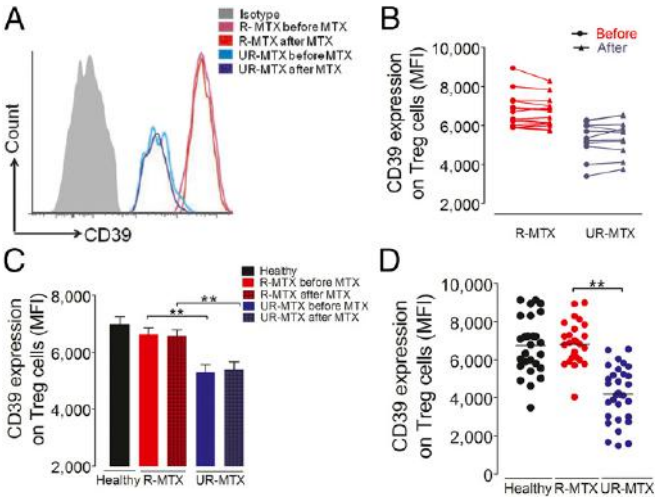


Fig. 3. Low CD39 expression density on Tregs in UR-MTX patients before and after MTX treatment. (*A*) Representative histogram of CD39 expression on the Tregs from R-MTX and UR-MTX patients before and after MTX treatment. (*B*) MFI of CD39 on $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Tregs from R-MTX ($n = 15$) and UR-MTX ($n = 11$) before (●) and after (▲) MTX treatment. (*C*) MFI of CD39 on the Tregs from R-MTX ($n = 15$) and UR-MTX ($n = 11$) before and after MTX treatment and healthy controls ($n = 16$). $^{**}P < 0.01$. (*D*) MFI of CD39 on $CD4^+CD25^+$ cells from healthy donors ($n = 26$), R-MTX ($n = 28$), and UR-MTX ($n = 31$) after MTX treatment. $^{**}P < 0.01$.

and tissue destruction compared with that of the naïve mice (Fig. S10 *A* and *B*). The inflammation and cartilage destruction in the joints of the immunized mice was not affected by the administration of CD39i. The joints of immunized mice treated with MTX show minimal cellular infiltration and tissue destruction, clearly demonstrating the protective effect of MTX in this model of arthritis. The joint-protective effect of MTX was completely abolished by CD39i (Fig. S10*C*). Together, these data show that CD39 is strongly associated with the antiarthritic effect of MTX and is key to the in vivo expansion of the MTX-induced Treg population.

Discussion

A number of studies reported potential genetic and epigenetic biomarkers predicting therapeutic efficacy to MTX. Polymorphisms within the *MTHFR* (methylenetetrahydrofolate reductase) gene, which encodes methylene-tetrahydrofolate reductase, an essential enzyme in the folate pathway, were associated with MTX response (27). Polymorphisms in the *SCL19A1* (solute carrier family 19, member 1) gene encoding the protein folate transporter 1 have also been described to implicate the therapeutic efficacy of the MTX (28). However, subsequent investigations produced conflicting results (29, 30). Thus, the mechanisms of, and functional biomarker for, the development of MTX resistance remains poorly understood (31).

We demonstrate here that failure of MTX treatment in RA patients is closely associated with a low expression density (MFI) of CD39 on Tregs. This phenomenon is observed on Tregs and is related to impaired production of ADO and reduced suppressive activity of these cells. Furthermore, MTX treatment increases the frequency of circulating CD39-expressing Tregs in R-MTX patients but not in UR-MTX patients. In a prospective study, before MTX treatment, UR-MTX patients presented lower density of CD39 expression on Tregs compared with that of R-MTX patients or healthy controls. However, the density of CD39 on the Tregs was not affected by MTX treatment. These data therefore strongly indicate that low expression density of CD39 on Tregs could be a biomarker for predicting unresponsiveness to MTX in RA patients. Whether a similar mechanism also applies to other disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) is currently under investigation.

MTX was developed as an analog of folic acid. Thus, the mechanism by which MTX affects cellular functions is expected to be similar to those involved in folate metabolism. The rationale for using MTX to treat RA was based on the assumption that by inhibiting purine and pyrimidine synthesis required for cellular proliferation, MTX would prevent the expansion of the most rapidly dividing lymphocytes or other cells responsible for synovial inflammation. However, neither folic acid nor folinic acid can reverse the anti-inflammatory effects of MTX in RA (4). Thus, it is likely that a mechanism other than the folic acid pathway is responsible for the antiarthritic effect of low-dose MTX treatment.

Recent studies strongly suggest that MTX mediates its anti-inflammatory role in RA via the AICAR pathway, inhibiting the enzyme AICAR transformilase. A consequence of the inhibition of this enzyme is the increase in ADO concentration (Fig. S11). Our results provide clinical and experimental evidence for the mechanism by which MTX attenuates RA via CD39 on Tregs, leading to the increased production of ADO, which is not only directly anti-inflammatory but can also induce more Tregs (iTregs) in a feedback

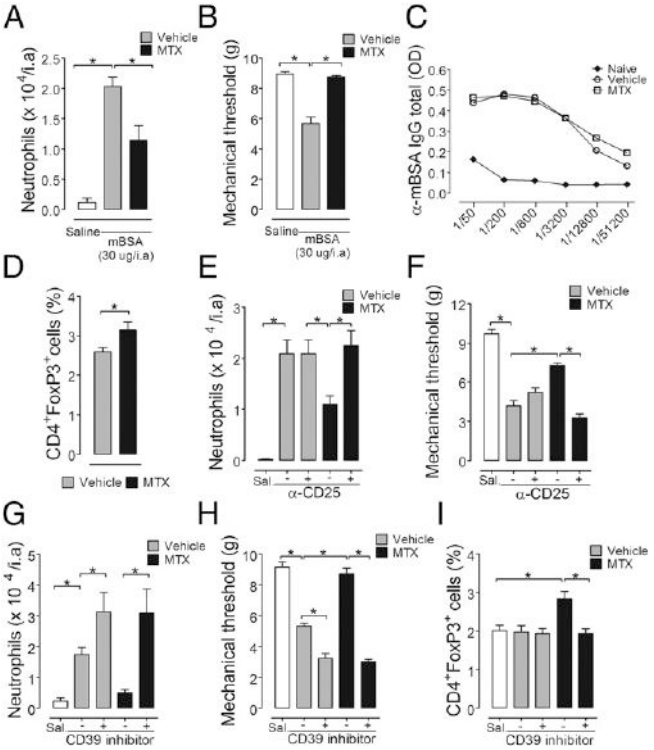


Fig. 4. Effect of MTX on AIA. C57BL/6 FoxP3-GFP mice immunized and boosted with mBSA and treated with MTX or vehicle were challenged intraarticular (i.a.) with mBSA or saline. Neutrophils in the joints (*A*) and intraarticular mechanical hyperalgesia (*B*) were determined. mBSA-specific IgG concentration in the serum was determined by ELISA (*C*). Frequency of $CD4^+FoxP3^+$ cells in the spleen was determined by FACS (*D*). Immunized mice pretreated with MTX or vehicle were injected with anti-CD25 or normal IgG (–) and challenged i.a. with mBSA or saline (Sal). Neutrophils in the joints (*E*) and mechanical hyperalgesia (*F*) were determined. Immunized mice pretreated with MTX or vehicle and injected with a CD39 inhibitor (CD39i, ARL67156) or not (–) were challenged i.a. with mBSA or saline. Neutrophils in the joints (*G*) and mechanical hyperalgesia (*H*) were determined. Frequency of $CD4^+FoxP3^+$ cells in the spleen was determined by FACS (*I*). Data represent mean ± SEM ($n = 5$), representative of two experiments. $^*P < 0.05$.

amplification manner. This may partly explain the markedly elevated Treg population in the R-MTX patients. Importantly, we demonstrate that the relative level of CD39 on Tregs plays a central role in determining the responsiveness to MTX treatment in vivo in a mouse model of arthritis.

The basis for the low CD39 expression on Tregs in UR-MTX patients is not immediately apparent. Association of genetic polymorphisms in UR-MTX patients with low CD39 expression may be involved. Genetic polymorphisms in the *ETNP-1* (ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1) gene (encoding CD39) that confer a lower CD39 expression have been associated with increased susceptibility to type 2 diabetes (32, 33). Cell signaling pathways that regulate CD39 expression on Tregs may also be involved such as the activation of cAMP-induced increase in CD39 mRNA (34). These possibilities are currently being investigated.

Due to its clinical importance, numerous efforts have been made to identify a biomarker for predicting MTX unresponsiveness. Thus far, pharmacogenetic approaches have produced equivocal results. Here, using an immunological approach, we provide evidence that low expression of CD39 density on Tregs is a potential biomarker for identifying RA patients who would be refractory to MTX treatment. The identification of low CD39 MFI on Tregs by FACS on a small sample of whole peripheral blood represents a noninvasive, rapid, and convenient procedure in predicting MTX unresponsiveness of RA patients with >99% confidence and would thus provide a valuable option for RA therapy.

Materials and Methods

Patients and Healthy Donors. We recruited 122 RA patients who fulfilled the 1987 revised American College of Rheumatology Criteria for RA classification. All patients received MTX monotherapy (15–20 mg/wk) for at least 4 wk before blood collection. Disease activity was measured by DAS28 (Disease Activity Score, including a 28-joint count). RA patients were stratified according to their response to MTX: (*i*) unresponsive RA patients (UR-MTX, $n = 69$), who received MTX doses ≥15 mg/wk for at least 3 mo and still presented DAS28 >4.0; and (*ii*) responsive RA patients (R-MTX, $n = 53$), who received MTX for >3 mo and presented DAS28 < 3.0. No other drugs such as leflunomide, sulfasalazine, cyclosporine, and biologic agents (TNF-α blockers, anti-CD20, and anti-IL-6) were in use at the time of sample collection. The clinical features of RA patients groups are shown on Table S1. Peripheral blood samples of healthy donors ($n = 33$), paired by sex and age, were also collected. All donors provided informed consent to participate in the study, approved by the Local Ethics Committee (Protocol 2981/2009). Subjects presenting other autoimmune or rheumatic diseases and infectious disorders or were serologic positive for Chagas disease, hepatitis B and C, or HIV were excluded. All laboratory analyses of the samples were performed blind to the donor status. Others information regarding the materials and methods are available in *SI Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Giuliana Bertozi for assistance with ELISAs and Sônia Dreossi for help with HPLC analysis. Financial support was provided by The European Union Seventh Framework Programme [FP7-2007-2013, HEALTH-F4-2011-281608, TIMER (targeting novel mechanisms of resolution in inflammation)]; the São Paulo Research Foundation (FAPESP, 2011/19670-0, Thematic Project) and 2013/08216-2 (Center for Research in Inflammatory Disease); University of São Paulo NAP-DIN (Research Group on Inflammatory Diseases) (11.1.21625.01.0); The Wellcome Trust; and the Medical Research Council, United Kingdom.

1. McInnes IB, Schett G (2011) The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 365(23):2205–2219.
2. Aletaha D, et al. (2010) 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 69(9):1580–1588.
3. Emery P, Dörner T (2011) Optimising treatment in rheumatoid arthritis: A review of potential biological markers of response. *Ann Rheum Dis* 70(12):2063–2070.
4. Cronstein BN (2005) Low-dose methotrexate: A mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacol Rev* 57(2):163–172.
5. Bansard C, et al. (2009) Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted? *Rheumatology (Oxford)* 48(9):1021–1028.
6. Cronstein BN, Eberle MA, Gruber HE, Levin RI (1991) Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(6):2441–2445.
7. Deaglio S, et al. (2007) Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* 204(6):1257–1265.
8. Montesinos MC, et al. (2000) Reversal of the antiinflammatory effects of methotrexate by the nonselective adenosine receptor antagonists theophylline and caffeine: Evidence that the antiinflammatory effects of methotrexate are mediated via multiple adenosine receptors in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 43(3):656–663.
9. Nesher G, Mates M, Zevin S (2003) Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48(2):571–572.
10. Montesinos MC, et al. (2007) 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 Rheum* 56(5):1440–1445.
11. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4(4):330–336.
12. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609):1057–1061.
13. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+ CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4(4):337–342.
14. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M (2008) Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 133(5):775–787.
15. Sitkovsky MV, Ohta A (2005) The 'danger' sensors that STOP the immune response: The A2 adenosine receptors? *Trends Immunol* 26(6):299–304.
16. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 7(9):759–770.
17. Haskó G, Cronstein BN (2004) Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol* 25(1):33–39.
18. Zarek PE, et al. (2008) A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111(1): 251–259.
19. Carregaro V, et al. (2011) Nucleosides from Phlebotomus papatasi salivary gland ameliorate murine collagen-induced arthritis by impairing dendritic cell functions. *J Immunol* 187(8):4347–4359.
20. Li L, et al. (2012) Dendritic cells tolerized with adenosine A_2AR agonist attenuate acute kidney injury. *J Clin Invest* 122(11):3931–3942.
21. Palmer TM, Trevethick MA (2008) Suppression of inflammatory and immune responses by the A(2A) adenosine receptor: An introduction. *Br J Pharmacol* 153(Suppl 1):S27–S34.
22. Dervieux T, Greenstein N, Kremer J (2006) Pharmacogenomic and metabolic biomarkers in the folate pathway and their association with methotrexate effects during dosage escalation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54(10):3095–3103.
23. Dalrymple JM, et al. (2008) Pharmacokinetics of oral methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 58(11):3299–3308.
24. Cronstein BN, Merrill JT (1996) Mechanisms of the effects of methotrexate. *Bull Rheum Dis* 45(5):6–8.
25. Genestier L, et al. (1998) Immunosuppressive properties of methotrexate: Apoptosis and clonal deletion of activated peripheral T cells. *J Clin Invest* 102(2):322–328.
26. Reutershan J, et al. (2009) Adenosine and inflammation: CD39 and CD73 are critical mediators in LPS-induced PMN trafficking into the lungs. *FASEB J* 23(2):473–482.
27. Urano W, et al. (2002) Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene were associated with both the efficacy and the toxicity of methotrexate used for the treatment of rheumatoid arthritis, as evidenced by single locus and haplotype analyses. *Pharmacogenetics* 12(3):183–190.
28. Wessels JA, et al. (2006) Efficacy and toxicity of methotrexate in early rheumatoid arthritis are associated with single-nucleotide polymorphisms in genes coding for folate pathway enzymes. *Arthritis Rheum* 54(4):1087–1095.
29. Owen SA, et al. (2013) MTHFR gene polymorphisms and outcome of methotrexate treatment in patients with rheumatoid arthritis: Analysis of key polymorphisms and meta-analysis of C677T and A1298C polymorphisms. *Pharmacogenomics J* 13(2): 137–147.
30. Owen SA, et al. (2013) Genetic polymorphisms in key methotrexate pathway genes are associated with response to treatment in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J* 13(3):227–234.
31. Plant D, Wilson AG, Barton A (2014) Genetic and epigenetic predictors of responsiveness to treatment in RA. *Nat Rev Rheumatol* 10(6):329–337.
32. Enjyoji K, et al. (2008) Deletion of cd39/entpd1 results in hepatic insulin resistance. *Diabetes* 57(9):2311–2320.
33. Friedman DJ, et al. (2009) Functional ENTPD1 polymorphisms in African Americans with diabetes and end-stage renal disease. *Diabetes* 58(4):999–1006.
34. Liao H, Hyman MC, Baek AE, Fukase K, Pinsky DJ (2010) cAMP/CREB-mediated transcriptional regulation of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) expression. *J Biol Chem* 285(19):14791–14805.

Supporting Information

Peres et al. 10.1073/pnas.1424792112

SI Materials and Methods

Leukocyte Separation from Peripheral Blood. Peripheral blood (15 mL) was collected by venipuncture, and PBMCs were isolated by percoll gradient (Sigma-Aldrich), washed with PBS, resuspended in RPMI-1640 containing 10% (vol/vol) heat-inactivated FBS, and counted in a Neubauer chamber.

Treg Purification. $CD4^+$ T cells were isolated by negative selection from PBMCs using CD4 MACS beads Multisort (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. The cells were then conjugated with α-CD25 beads (3 mL/10^7 cells) for a second round of cell separation. Two distinct cell populations, $CD4^+CD25^-$ (effectors T cells) and $CD4^+CD25^+$ (Tregs) were obtained.

Cell Phenotyping. Cells were washed and resuspended in 100 μL of PBS and incubated with 1.5 μg of monoclonal antibodies specific for CD3, CD4 (clone SK3), CD8 (clone RPA-T8), CD19 (clone SJ25C1), CD25 (clone M-A251), CD39 (clone TU66), CD73 (clone AD2), CD15 (clone W6D3), CD11b (clone ICRF44), CD11c (clone B-ly6), or FoxP3 (clone PCH101) and were conjugated with FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7, or APC (BD Biosciences). For intracellular FoxP3 staining, the Human FoxP3 Buffer kit (BD Biosciences) was used. The cells were analyzed by FACSCanto II (BD Biosciences) using the software FACSdiva (BD Biosciences) and Flow Jo (TreeStar). For intracellular cytokine analysis, PBMCs (1×10^6) were cultured for 12 h in the presence of α-CD3 (5 μg/mL), α-CD28 (2.5 μg/mL), and Brefeldin A (2 μL/10^6 cells) (BD Biosciences) and incubated with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences), followed by staining with antibodies against IL-10, IL-17, or IFN-γ (BD Biosciences) and analyzed by FACSCanto II. In some experiments, unseparated whole blood leukocyte (after lysing RBC) samples were used for staining CD4/CD25/CD39. The results (MFI) were similar to those using purified $CD4^+CD25^+$ cells.

HPLC Analysis. For quantification of ADO, Tregs or effector T cells (5×10^5) were incubated with RPMI-1640 containing 1 mM ADP (Sigma-Aldrich) at 37 °C. After 1 h, 500 μL of culture supernatant was collected, added to 1 mL of acetonitrile, immediately vortexed for 1 min, and centrifuged at 450 × *g* for 5 min at 4 °C to extract proteins and stabilize ADO. The content was air-dried, and the pellet was resuspended in 200 μL of mobile phase (0.1% of acetonitrile, 5.4% of methanol, and 94.5% of phosphate buffer 0.25 M, pH 6.3). Samples (100 μL) were analyzed by HPLC (Shimadsu SPD 10-A) with a HP Altima (C18) column. ADO standards were used to confirm the retention time and the required run time. ADO was quantified by comparing the retention time with the standards. The detection range was 1–200 ng/mL.

Malachite Green Assay. The assays were performed as previously described (1). Briefly, 5×10^5 cells were incubated with RPMI 1640 containing 1 mM ADP (Sigma-Aldrich) in a 48-well plate at 37 °C for 1 h. Malachite green dye solution (200 μL, one part 4.2 g ammonium molybdate dissolved in 100 mL 4 M HCl + three parts 0.045% malachite green in H_2O) was added. After 30 min at room temperature, optical density was measured at 650 nm, and the amount of inorganic phosphate released was calculated from a parallel prepared phosphate standard curve (10–10,000 pM K_2PO_4).

Treg Function Assay. $CD4^+CD25^+$ cells (Tregs) were purified from healthy individuals or R-MTX or UR-MTX patients and cultured with $CD4^+CD25^-$ T cells (Teff) in a 96-well U-bottom plate (Costar). For consistency, the Teff cells were obtained from the same healthy donor throughout the experiments. The Teff cells were labeled with 1 μM Dye Efluor 670 (eBioscience) for 15 min at 37 °C, washed, and then cultured (1×10^5 cells per well) for 4 d with a graded number of Tregs (Teff:Treg: 1:1, 1:0.5, 1:0.25) in the presence of soluble α-CD3 (3 μg/mL) and α-CD28 (1.5 μg/mL). Proliferation of Teff cells was determined by dye dilution in FACS analysis. Under this culture condition, there was minimum Treg proliferation. The results were expressed as percentage of suppression under each Treg:Teff ratio using the following formula: [proliferation of Teff only − (proliferation of Teff + Treg)/proliferation of Teff only] × 100.

Quantitative RT-PCR. Total RNA extraction was performed using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized by reverse transcription using kit ImpronII (Promega) and oligo d(T)16 (Invitrogen). cDNAs were used to quantify the expression of A2aR and A2bR and HPRT-1 by real-time PCR using a SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen) in an ABI 7500 Real-Time PCR System. Primer sequences were as follows: A2aR F: 5′-TTCTTCGCCTGCTTTGTCCT-3′, R: 5′-ATACCCGTCACCAAGCCATT-3′; A2bR F: 5′-CTGCTCATAATGCTGGTGATCT-3′, R: 5′-ATCAGTTCCATGCGCTGA-3′; HPRT-1 F: 5′-GCAG TACAGCCCCAAAATGG-3′, R: 5′-GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3′.

Determination of MTXglu. Whole-blood samples (5 mL) from R-MTX or UR-MTX patients were collected in an EDTA-coated tube and centrifuged to isolate the erythrocytes (RBCs). The RBCs were washed twice in two volumes of 1× Hanks' solution and centrifuged at 450 × *g* for 10 min. The washed RBCs were counted to normalize total MTXglu concentrations to 1×10^{10} RBCs. Plasma (100 μL) was mixed to reconstitute 50 μL of RBC hemolysate in an Eppendorf tube (RBC lysis occurred during the cycle freeze-thaw process). After thoroughly mixing the sample for 30 s, buffer (100 μL) containing 100 mmol/L potassium phosphate and 150 mmol/L mercaptoethanol was added. Samples were incubated for 12–14 h in the dark at 37 °C. After incubation and cooling, 25 μL of 700 mL/L perchloric acid was added, and the mixture was centrifuged for injection into the UPLC-MS/MS (ultra-performance liquid-chromatography tandem mass spectrometry) system.

UPLC-MS/MS System and Operating Conditions. The UPLC-MS/MS analyses were performed using an Acquity UPLC (Waters) coupled to an Acquity TQD detector equipped with an ESI interface and an Acquity UPLC BEH C18 (Bridged Ethylsiloxane Hybrid; 2.1 × 50 mm, 1.7 μM) column protected by an Acquity UPLC Vanguard column of the same material. The mobile phase was composed of water (deionized water, Direct-Q; Millipore) (A) and acetonitrile (HPLC grade; J.T. Baker) (B), both containing 0.1% of formic acid (vol/vol). The gradient method initiates with 3% B, increasing to 80% B (linear gradient) until 5 min, followed by linear gradient from 80% to 100% until 6 min. An additional time of 3 min was used to wash and return the column to initial conditions. The flow rate was 0.3 mL/min, and the column temperature was set at 35 °C. The samples were conditioned at 10 °C in the auto-sampler, and injection mode

applied was the partial loop with needle overfill, using 5 μL of injection volume. Data were acquired by MassLynx V4.1 software and processed for quantification by QuanLynx V4.1 (Waters). The MS tune parameters used were 0.16 L/h for the collision gas (argon) flow at a pressure of ~3.02×10^{-3} mBar in the collision cell, and desolvation gas flow (nitrogen) was 600 L/h. The capillary voltage used was 2.5 kV, source temperature was 150 °C, cone voltage and collision energy were 20 V, and desolvation temperature was 350 °C. The multiple reaction monitoring (MRM) was used for the quantification in the positive ionization mode and the transition monitored for the methotrexate were m/z 455 > 308.

Mice. Adult C57BL/6 FoxP3-GFP mice of both sexes were used in this study. All mice were bred and maintained in the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (FMRP) at the University of São Paulo (USP). Animal care and handling procedures were in accordance with the International Association for the Study of Pain guidelines and with the approval of the FMRP Ethics Committee of the USP.

AIA. Mice were immunized s.c. with 500 μg of methylated BSA (mBSA; Sigma-Aldrich) in 0.2 mL of an emulsion containing 0.1 mL PBS and 0.1 mL Freund's complete adjuvant (Sigma-Aldrich) on day 0. The mice were boosted on day 7 and 14 with the same preparation in Freund's incomplete adjuvant (Sigma-Aldrich). Arthritis was induced on day 21 by intraarticular (i.a.) injection (challenge) of 30 μg of mBSA/10 μL of PBS.

Therapeutic Protocol. MTX (2 mg/kg; Sigma-Aldrich) was administered orally weekly for 5 wk (2 wk before immunization and 3 wk after immunization, the last treatment being 1 wk before the antigen challenge). Monoclonal anti-CD25 antibody (250 μg/mouse, culture supernatant of clone PC-61) was administered i.p. every 2 d for 5 wk (2 wk before immunization and 3 wk after immunization). CD39 inhibitor, ARL67156 (1 mg/kg; Sigma-Aldrich), was administered i.p. every 3 d throughout the MTX treatment.

Evaluation of Articular Hyperalgesia and Neutrophil Infiltration. Mechanical articular hyperalgesia (hypernociception) of the femur–tibial joint was determined 21 d after immunization and 7 h after i.a. challenge as described previously (2). Neutrophils articular infiltration was also accessed at the same time by washing femur–tibial joint with PBS + EDTA 0. 2 M, and the cells were counted in a Neubauer chamber.

Histological Analysis. Femur–tibial joints were collected on day 14 after challenge, fixed in 4% (vol/vol) buffered formalin, and decalcified in 10% EDTA for 2–3 wk. The tissues were then trimmed, dehydrated in graded ethanol, and embedded in paraffin for preparation of the slides. Histological assessment was carried out following routine staining. Joint sections were stained with H&E to analyze synovitis (inflammatory cell influx and synovial hyperplasia) or Safranin-O to visualize proteoglycan depletion and cartilage destruction. Synovitis and joint destruction were scored from 0 to 4 (0 = usual appearance, 1 = mild erosive changes, 2–3 = moderate erosive changes, 4 = intense erosive changes).

Apoptosis Quantification. A total of 1×10^6 cells from spleen and inguinal lymph nodes from mBSA-immunized mice pretreated or not with MTX were incubated with 1.5 μg of monoclonal antibodies specific for CD4 (BD Biosciences) and CD44 (BD Biosciences) for 30 min. Subsequently, the cells were washed and incubated with Annexin V-FITC (SouthernBiotech; 1:100) in 1× binding buffer (SouthernBiotech). After 30 min of incubation, the frequency of apoptotic cells (Annexin V^+) in activated ($CD44^+$) and nonactivated ($CD44^-$) $CD4^+$ cells was analyzed by FACSCanto II.

Statistical Analysis. For the clinical and laboratory features of the RA patients, the Student t test and Fisher's exact test were used to examine group homogeneity. The comparisons between means ± SEM of different groups regarding age, time of disease, CRP, and DAS28 were performed using a two-sample t test. Fisher's exact test was used to compare differences between different groups regarding sex, smoking habits, RF, and ACPA. The significant differences between groups had $P < 0.001$. In all other experiments, including clinical and experimental data, statistical analyses were performed using one-way nonparametric ANOVA followed by Bonferroni's t test (for three or more groups), comparing all pairs of columns, or two-tailed Student t test (for two groups). $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Software).

1. Chan KM, Delfert D, Junger KD (1986) A direct colorimetric assay for Ca2+ -stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 157(2):375–380.

2. Pinto LG, et al. (2010) IL-17 mediates articular hypernociception in antigen-induced arthritis in mice. *Pain* 148(2):247–256.

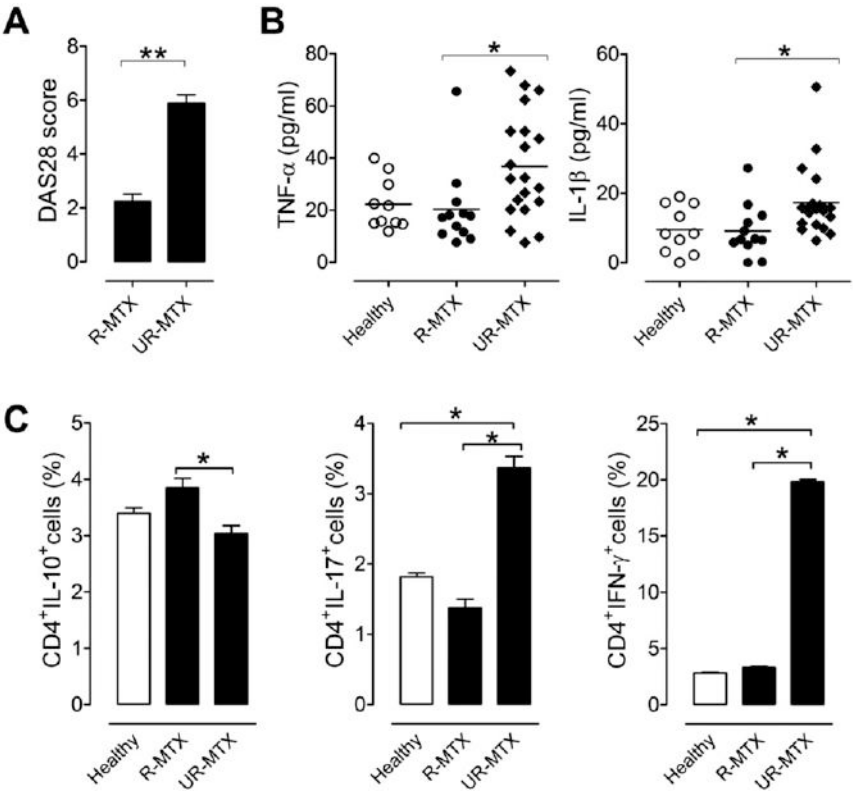


Fig. S1. Characterization of RA patients. (*A*) DAS28 score of R-MTX ($n = 35$) and UR- MTX ($n = 54$) patients to MTX treatment. (*B*) Plasma of R-MTX (●, $n = 12$), UR-MTX patients (♦, $n = 20$), and healthy donors (Healthy) (○, $n = 10$) were measured for TNF-α and IL-1β by ELISA. (*C*) Cells from PBMC of healthy donors, R-MTX, and UR-MTX patients were stimulated with α-CD3 (5 μg/mL) and α-CD28 (5 μg/mL) for 12 h, and percentage of $CD4^+IL\text{-}10^+$, $CD4^+IL\text{-}17^+$ and $CD4^+IFN\text{-}\gamma^+$ cells were analyzed by FACS, $n = 5$. All data are mean ± SEM. $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.001$.

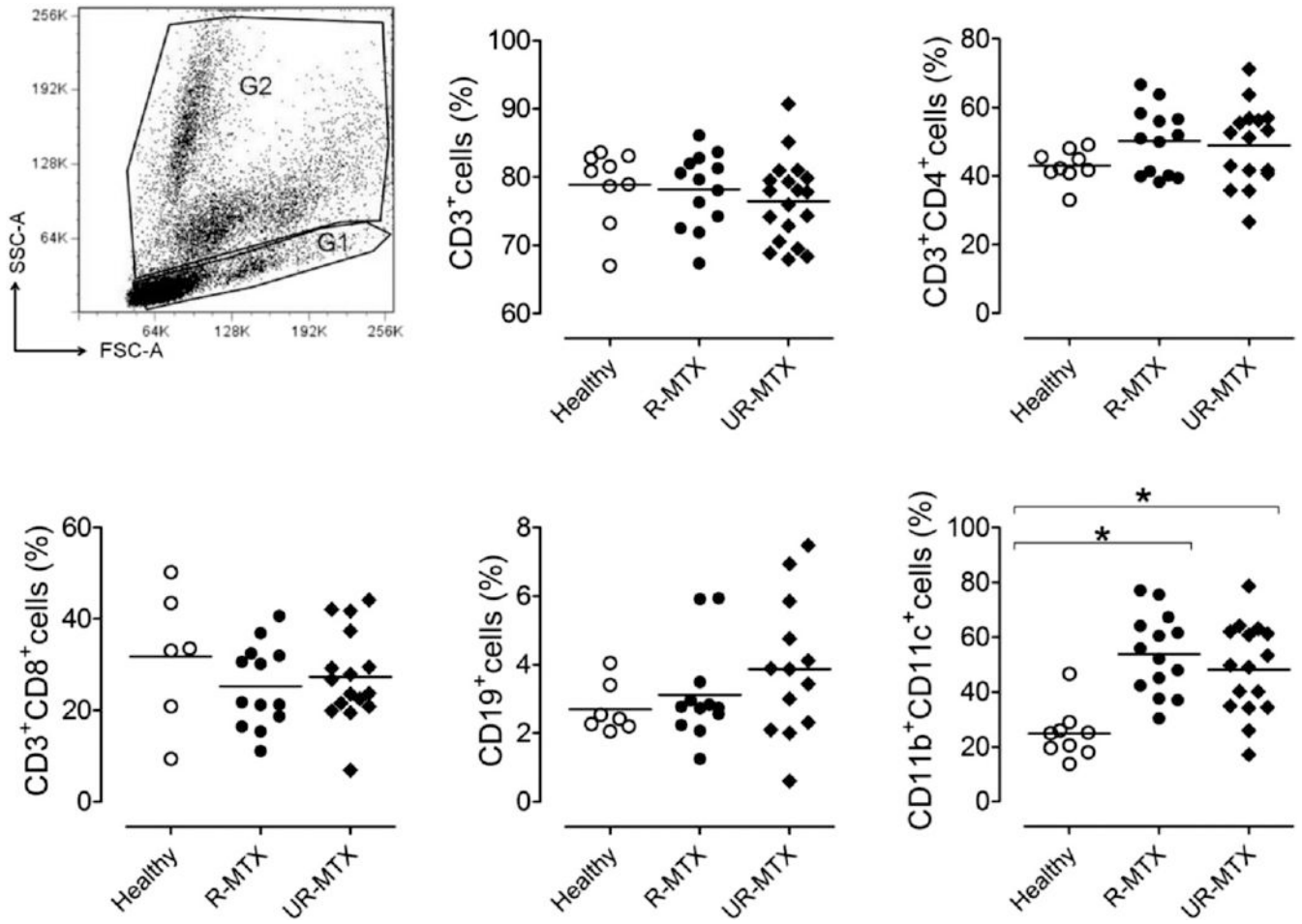


Fig. S2. Phenotypes of PBMC from RA patients. Size (FSC) and granularity (SSC) were used to select the populations of T and B cells (gate G1) and monocytes and dendritic cells (gate G2). PBMC of healthy donors (○, $n = 8$), R-MTX (●, $n = 15$), and UR-MTX (♦, $n = 20$) patients were analyzed by FACS. Data are percentage of $CD3^+$, $CD4^+CD3^+$, $CD8^+CD3^+$ T cells, $CD19^+$ B cells, and $CD11b^+CD11c^+$ dendritic cells, $*P < 0.05$.

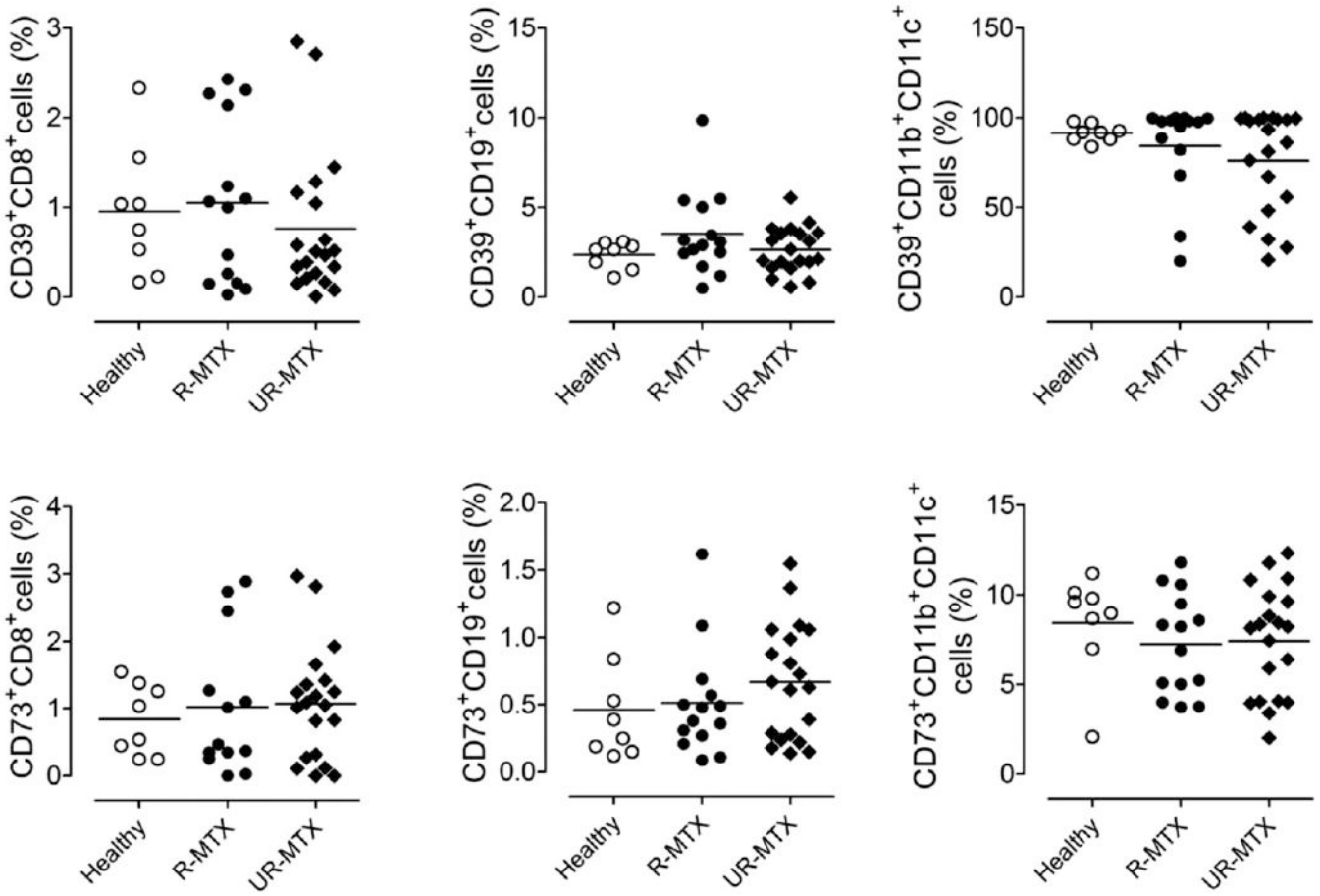


Fig. S3. Expression of CD39 and CD73 on the surface of leukocyte subsets. PBMC of healthy donors (○, $n = 8$), R-MTX (●, $n = 15$), and UR-MTX (♦, $n = 20$) were analyzed for CD39 and CD73 expression by FACS. Data show percentage of $CD39^+CD8^+$, $CD39^+CD19^+$, $CD39^+CD11b^+CD11c^+$, $CD73^+CD8^+$, $CD73^+CD19^+$, and $CD73^+CD11b^+CD11c^+$ cells of individual subjects. There were no significant differences among the three groups.

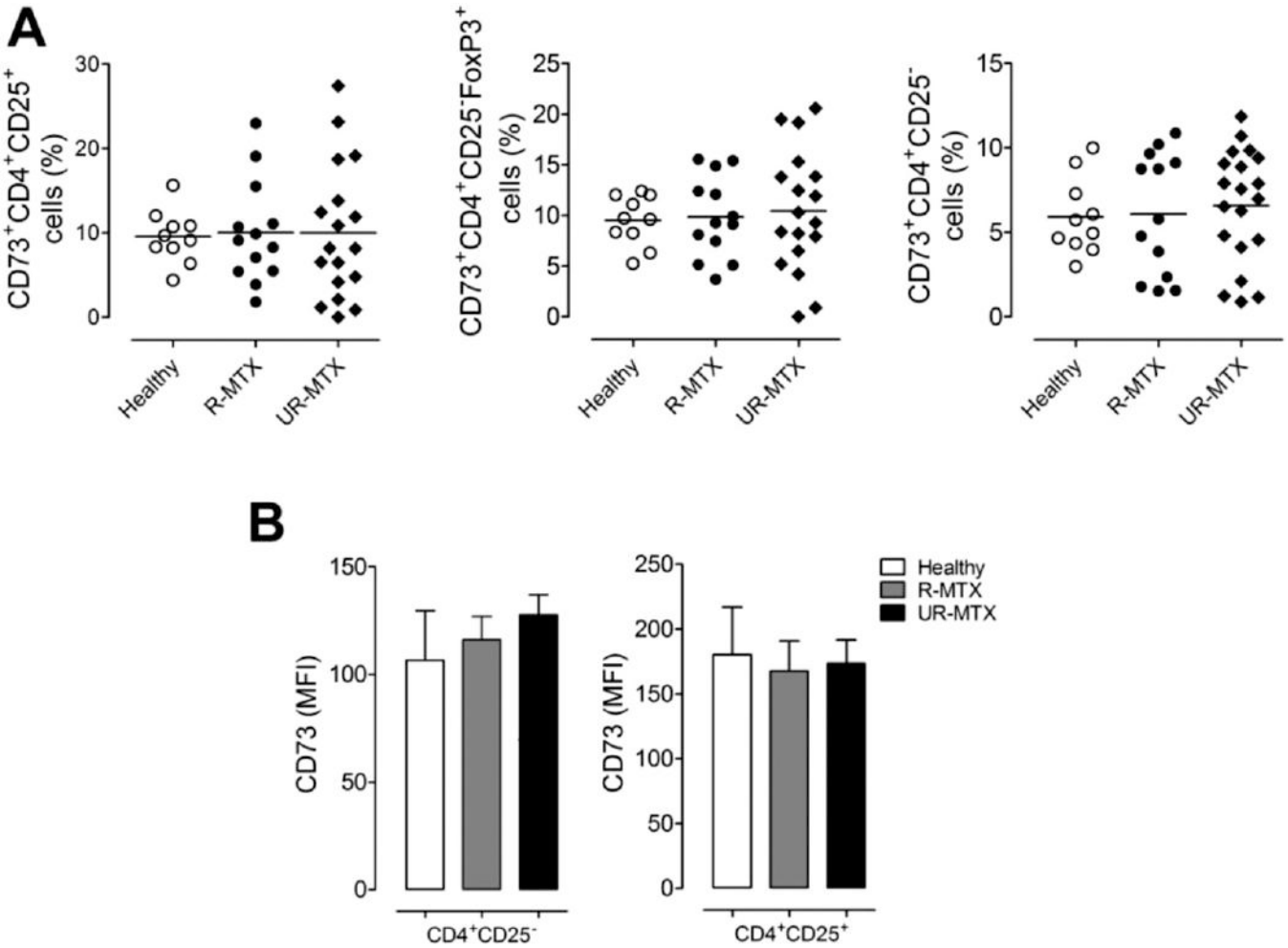


Fig. S4. Expression of CD73 on Tregs. (*A*) Percentage of CD73$^+$ cells on CD4$^+$CD25$^+$, CD4$^+$CD25$^+$FoxP3$^+$, and CD4$^+$CD25$^-$ cells in the PBMCs of healthy donors (○, n = 10), R-MTX (●, n = 13), and UR-MTX (◆, n = 20) was analyzed by FACS. (*B*) MFI of CD73 on CD4$^+$CD25$^+$ and CD4$^+$CD25$^-$ cells. Data represent mean ± SEM. There was no significant difference among the three groups.

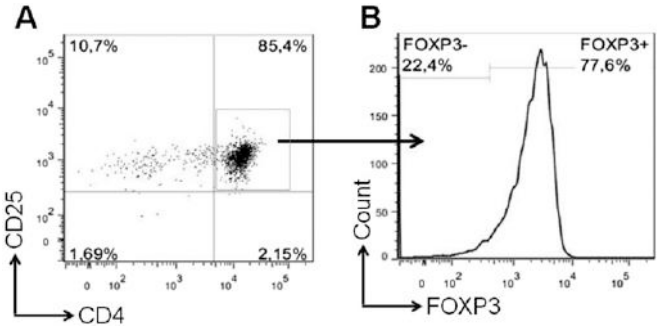


Fig. S5. Purification of Tregs. (*A*) Percentage of CD4$^+$CD25$^+$ cells gated on lymphocytes and (*B*) frequency of FoxP3$^+$ cells in the CD4$^+$CD25$^+$ population.

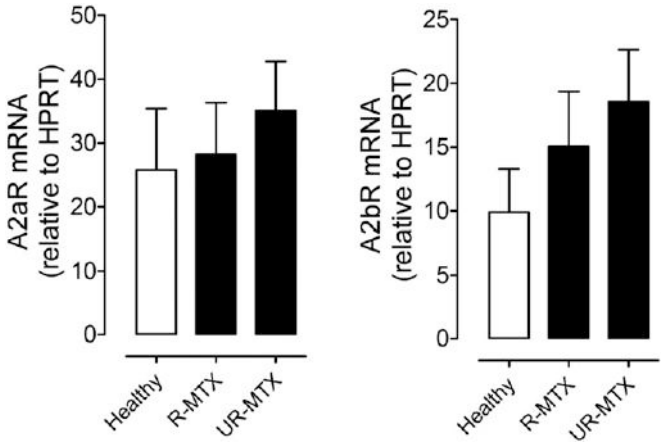


Fig. S6. Expression of A2aR and A2bR in the PBMCs. *A2aR* and *A2bR* mRNA expression in the PBMCs from healthy donors (n = 10), R-MTX (n = 15), and UR-MTX patients (n = 21) were analyzed by quantitative PCR. Data represent mean ± SEM relative to endogenous control HPRT-1. There was no significant difference among the three groups.

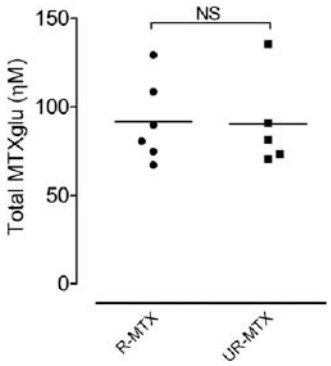


Fig. S7. Concentrations of total MTX polyglutamate (MTXglu) in the erythrocytes from RA patients. Total MTXglu was measured in the lysate of erythrocytes from R-MTX (n = 6) and UR-MTX patients (n = 5) at least 3 mo after beginning MTX treatment. Levels of MTXglu were quantified by MS. MTXglu was not detected in samples from healthy donors. NS, not significant.

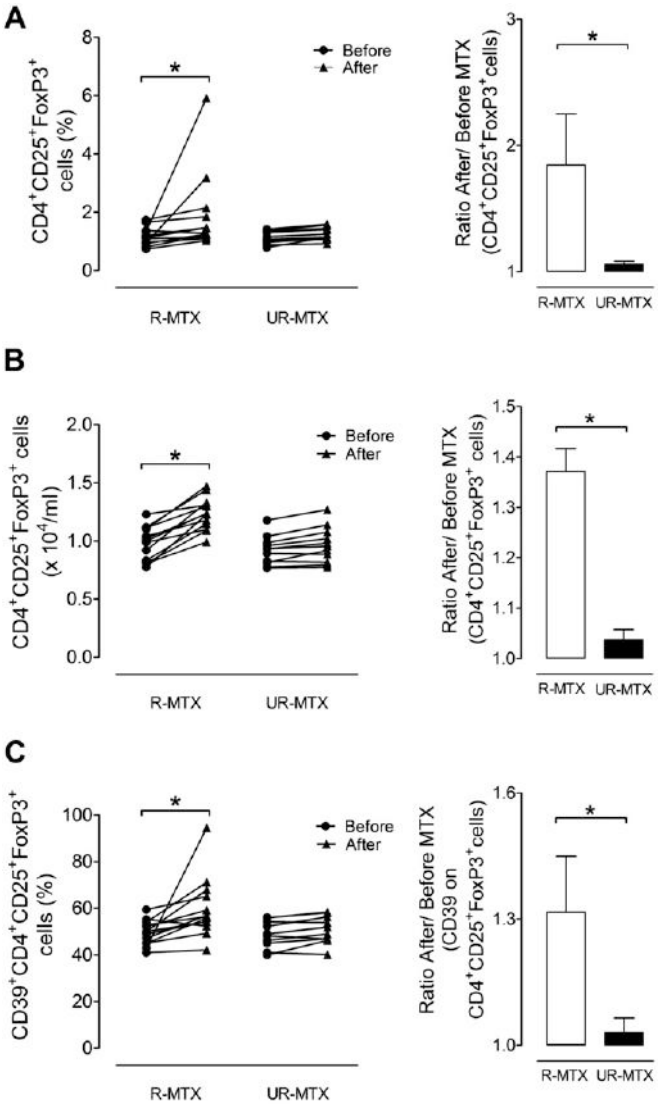


Fig. S8. Phenotype of Tregs from RA patients before and after MTX treatment. (*A*) Frequency of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ cells in individual R-MTX and UR-MTX patients before (●) and after (▲) MTX treatment. Histogram shows ratio of % of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ cells after/before MTX treatment in R-MTX (n = 15) and UR-MTX (n = 11). (*B*) Number of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ cells per milliliter of peripheral blood in individual R-MTX and UR-MTX patients before (●) and after (▲) MTX treatment. Histogram shows ratio of the number of $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ cells after/before MTX treatment in R-MTX (n = 15) and UR-MTX (n = 11). (*C*) Frequency of $CD39^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ cells in individual R-MTX and UR-MTX patients before (●) and after (▲) MTX treatment. Histogram shows ratio of the % of $CD39^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ cells after/before MTX treatment in R-MTX (n = 15) and UR-MTX (n = 11). *$P < 0.05$.

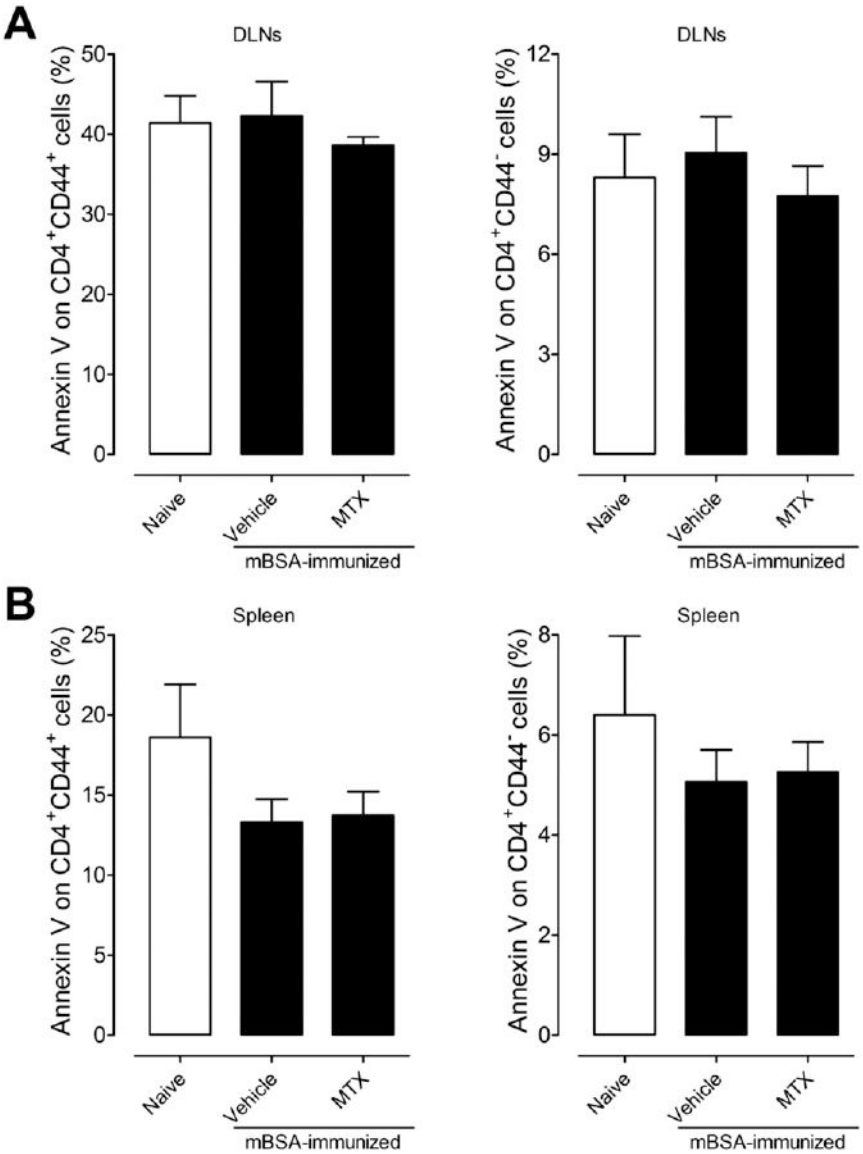


Fig. S9. Effect of MTX treatment on the frequency of apoptotic $CD4^+$ cells. C57BL/6 mBSA-immunized mice were treated or not with MTX weekly (2 mg/kg) during immunization protocol. After 21 d of first immunization, draining lymph nodes and spleen were collected and analyzed for apoptotic (Annexin V^+) $CD4^+$ cells. The graphs show the frequency of Annexin V^+ on activated ($CD44^+$; *Left*) and naive ($CD44^-$; *Right*) $CD4^+$ cells in the draining lymph nodes (*A*) and spleen (*B*) from naive and mBSA-immunized mice treated with MTX or not. Data represent mean ± SEM ($n = 5$). There was no significant difference among the three groups.

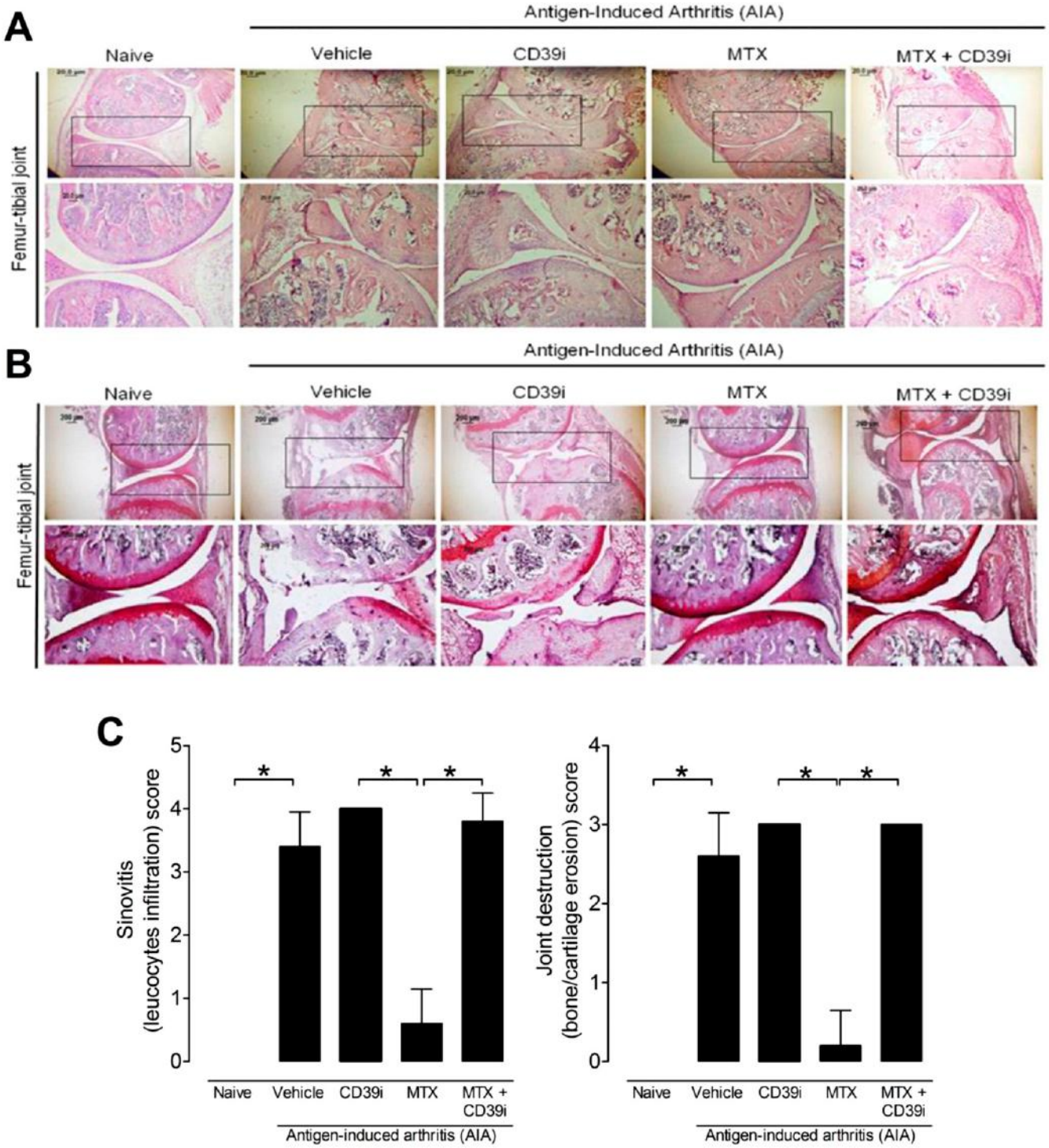


Fig. S10. Histological analysis of mBSA-immunized mice treated with MTX and CD39 inhibitor. Mice were treated with MTX (2 mg/kg) ± CD39 inhibitor (CD39i, ARL67156, 1 mg/kg) during the immunization protocol. H&E (inflammatory cell influx) (*A*) and Safranin O staining (proteoglycan depletion and cartilage destruction) (*B*) were performed on the knee joint sections prepared from AIA mice on 14 d after challenge (mBSA, 30 μg/cavity). (*C*) AIA severity was measured by histological score for sinovitis (*Left*) and joint destruction (*Right*). Data represent mean ± SEM ($n = 5$). $P < 0.01$.

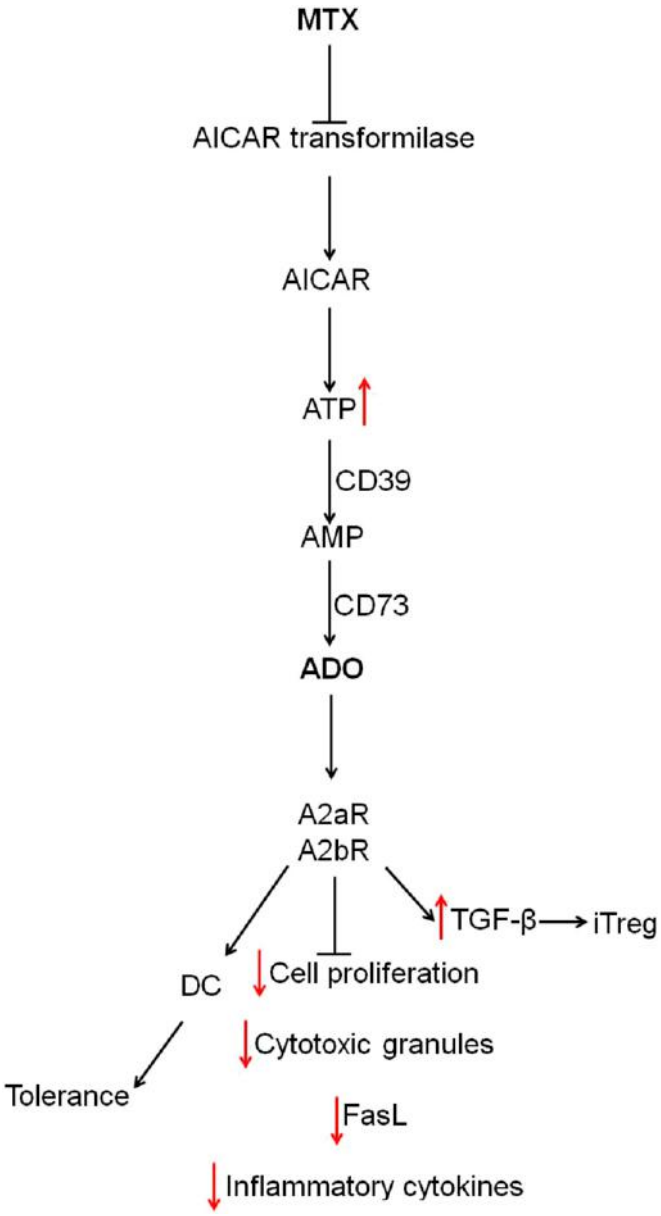


Fig. S11. Schematic representation of the MTX-ADO pathway. Blunted arrows indicate suppression; red arrows indicate increase or decrease.

Table S1. Clinical features of RA patients

	RA patients			
Clinical features	R-MTX patients (n = 53)	UR-MTX patients (n = 69)	P	Control group (n = 33)
Mean age (y)	53.2 ± 5.1	51.8 ± 3.2	NS*	48.2 ± 5.7
Women (%)	84.9	86.9	NS†	7.0
Smoking (%)	28.3	40.5	NS†	27.2
Mean of disease duration (y)	6.2 ± 1.5	5.1 ± 2.7	NS*	NA
RF positive (%)	75.4	79.7	NS†	NA
ACPA positive (%)	69.8	75.3	NS†	NA
DAS28 (mean ± SD)	2.25 ± 0.33	5.83 ± 0.56	$P < 0.001$*	NA
MTX use (%)	100	100	NS†	NA
CRP (mean ± SD)	0.82 ± 0.7	1.7 ± 0.5	$P < 0.001$*	NA

NA, not applicable; NS, not significant.
*Two-sample exact test.
†Fisher's exact test.

Impairment of TGF-β signalling accounts for lower CD39 expression on regulatory T cells associated with methotrexate resistance in rheumatoid arthritis

Raphael S. Peres[1], Paula B. Donate[1], Jhimmy Talbot[1], Nerry T. Cecilio[1], Rene D. Oliveira[2], Vanessa Carregaro[3], Helder I. Nakaya[4], Thiago M. Cunha[1], José C. Alves-Filho[1], Foo Y. Liew[5], Paulo Louzada-Júnior[2*], Fernando Q. Cunha[1*]

Affiliations:

[1]Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

[2]Department of Internal Medicine, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

[3]Departament of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

[4]Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

[5]Institute of Infection, Immunity and Inflammation, University of Glasgow, Glasgow, UK

*Email address of the corresponding author: plouzada@fmrp.usp.br; fdqcunha@fmrp.usp.br

Running title: TGF-β signalling contributes for resistance to methotrexate therapy

Key Words: Rheumatoid Arthritis, regulatory T cells, CD39, Methotrexate, TGF-β signalling pathway.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune arthropathy characterized by chronic articular inflammation associated with progressive joint destruction. The current first-line therapy for RA comprises the administration of methotrexate (MTX), an inhibitor of dihydrofolate reductase/folic acid metabolism, which anti-inflammatory effects by maintaining high levels of extracellular adenosine (ADO). However, a considerable percentage of RA patients is resistant to MTX treatment, whose condition is linked to reduction on circulating regulatory T (Tregs) cells of the CD39 expression, an ectoenzyme involved in the generation of extracellular ADO by ATP metabolism. Despite these previous findings, the molecular mechanisms that mediate the reduction of CD39 expression on Tregs cells observed in unresponsive patients to MTX (UR-MTX) still remain poorly understood. Herein, we investigated the signalling pathways involved in the induction of CD39 expression on Tregs cells. Subsequently, we addressed if possible impairments in the triggering of these signalling pathways could be associated with reduction of CD39 expression on Tregs cells from UR-MTX patients. In this way, we demonstrated that *in vitro* stimulation with TGF-β increased CD39 expression in both isolated and differentiated Tregs cells from healthy donors by participation/activation of the TGFBRII and TGFBRI, SMAD2 and transcription factor CREB, which is activated through p38-dependent manner and induces CD39 expression by promoting *ENTPD1* gene transcription. Interestingly, we demonstrated that TGF-β stimulation was unable to promote CD39 induction on Tregs from healthy individuals with intrinsic lower CD39 expression. Moreover, we found that cells from these individuals also exhibit a compromised ability to polarize to Tregs cells *in vitro*. Finally, we found that UR-MTX patients showed a reduction of mRNA for TGFBRII and CREB in addition to decreased expression of p-SMAD2 and p-CREB on Tregs. Collectively, our findings suggest that an impairment in TGF-β signalling triggering directs the reduction of CD39 expression on Tregs cells, which contributes for ineffective response to MTX treatment**.**

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune multifactorial arthropathy with unknown etiology that affects approximately 1% of the adult population (1, 2). Despite advances in the treatment of RA, such as immunobiologics implementation (mainly TNF-α targeting), the standard first-line therapeutic strategy for RA comprises the use of low-dose methotrexate (MTX), an inhibitor of dihydrofolate reductase/folic acid metabolism (3, 4). Indeed, the therapeutic choice for MTX takes into account mainly its low-cost compared to other agents, associated with a satisfactory effectiveness and safety (5, 6). In addition to its anti-folate effects, MTX-mediated anti-inflammatory effects by maintaining high levels of extracellular adenosine (ADO) through activity of the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (CD39/ENTP1) and 5′-nucleotidase (CD73), ectoenzymes present in the surface of the leucocytes that generate extracellular ADO by ATP metabolism (3, 7–9). However, around 30-40% of RA patients are resistant to MTX and currently unresponsive patients (UR-MTX) are just conducted to alternative therapy after a prolonged treatment with MTX, time by which the disease has promoted irreversible articular lesions (10). Thus, it is important to conduct studies aiming to elucidate the molecular mechanisms that contribute for MTX resistance and to identify possible biomarkers that allow predicting the therapeutic response to MTX (11).

In this context, studies have reported genetic and epigenetic biomarkers with a potential to predict the therapeutic efficacy to MTX (Plant et al. 2014). In fact, we have been demonstrated that UR-MTX patients show a reduction of the CD39 expression on circulating regulatory T cells (Tregs), which culminates in an impairment of their capacity to generate extracellular ADO, leading to inability to dampen inflammation (12). Moreover, we found that UR-MTX patients lower CD39 expression on Tregs cells even before MTX treatment, suggesting that the evaluation of the CD39 expression on Tregs cells is possibly a non-invasive biomarker able to predict MTX resistance in RA (12). However, the genetic and environment factors that contribute for CD39 reduction on Tregs

cells observed in UR-MTX patients as well as the molecular mechanisms underlying regulation of the CD39 expression on Tregs cells are still poorly understood.

A range of evidences has been described that genetic factors could have implications for CD39 expression in different types of leucocytes. Indeed, genetic polymorphisms in *ENTPD1* gene (which encoding CD39) account for lower CD39 expression in immune cell blasts from AA individuals related to the SNP rs10748643 in the first intron of the *ENTPD1* gene (13, 14). Moreover, the presence of the haplotype AA was associated with a higher susceptibility to Crohn's disease and type 2 diabetes (13, 14). Of note, other analysis in this SNP revealed also that individuals with AA show lower percentage of $CD39^+$ Tregs compared to GG homozygous individuals (15). Furthermore, $CD39^+$ Tregs from AA individuals have an impairment of the their suppressive capacity (15). Besides the genetic factors, environment factors also have influence in the induction and regulation of the CD39 expression. In accordance, it was shown that activation of the transcription factor CREB (cAMP response element-binding), which has an important role in proliferation, differentiation and survival of the cells from the immune system (16–18), induces the transcription of the *ENTPD1* gene on macrophages by a mechanism dependent of the PKA (protein kinase A) activity (19). In this way, it already described the stimulation with TGF-β, a cytokine crucially involved in the differentiation and maintenance of Tregs cells (20), is also able to induce CREB activation on these cells (21, 22).

The TGF-β signalling pathway is initiated when TGF-β interacts with both type II (TGFBRII) and type I (TGFBRI) receptors, members of the family of serine/threonine kinase, forming a hetero-tetrameric complex with the ligand (23). Subsequently, occurs a rearrangement of the kinase cytoplasmic domains from the receptors in attempt to facilitate a transphosphorylation process. Indeed, TGFBRII phosphorylates serine residues of the cytoplasmic domain of the TGFBRI, leading its activation and subsequent phosphorylation of the intracellular targets denominated SMAD (Mothers against decapentaplegic homolog)(23, 24). The SMADs are intracellular signal transducers

that when activated translocate to the nucleus, where induce directly or by interacting with other transcription factors, including CREB, the transcription of their target genes (25–28). TGFBRI phosphorylates the serine residue in both SMAD2 and SMAD3 classified as R-SMADs (receptor-regulated SMADs). Still, the phosphorylated R-SMADs have a high affinity for co-SMAD (common-mediator SMAD, e.g. SMAD4), which forms a complex that enters into the nucleus and regulates the transcription of the target genes (28, 29). Besides the SMADs, it was also reported that TGF-β stimulation can activate direct or indirectly others downstream molecules, including Erk, p38, GTPases and PI3K/AKT (30–33). Interestingly, it was described that TGF-β-activated kinases from non-SMAD signalling pathways can also phosphorylate CREB (34–36). Additionally, others evidences also reported that TGF-β-driven downregulation of the transcription factor GFI-1 (zinc finger protein growth factor independent-1) that acts as a repressor of the *ENTPD1* transcription (37).

In general, these evidences suggest that the TGF-β signalling pathway may be involved with modulation of CD39 expression on Tregs cells. Moreover, possibly UR-MTX patients may present alterations in the TGF-β signalling constituents that could be associated with depressed CD39 expression on Tregs cells. In the present study, we found that TGF-β stimulation enhanced CD39 expression in both isolated and differentiated Tregs cells from healthy subjects. Furthermore, we dissected the molecular pathway that contributes for TGF-β-induced CD39 expression, characterized by activation of the TGFBRII and TGFBRI, signal transducer SMAD2 and transcription factor CREB by mechanism dependent of the p38 activity. Of note, TGF-β's effects on induction of CD39 expression were exclusively observed in Tregs cells. Interestingly, we showed that TGF-β did not increase CD39 expression on Tregs cells from individuals with lower CD39 expression. Moreover, we demonstrated that CD39 activity is a booster of the Tregs cells differentiation, since individuals with reduced CD39 expression also had a depressed capacity to polarize Tregs cells *in vitro*. Finally, we observed that UR-MTX patients presented an intrinsic impairment in the TGF-β signalling

triggering, evidenced by a reduction of mRNA for TGFBRII and CREB as well as activation of SMAD2 and CREB on isolated Tregs and $CD4^+$ cells even in basal conditions. Taken together, these data suggest that an impairment of TGF-β signalling triggering orchestrates the reduction of CD39 expression on Tregs cells associated with the resistance to MTX treatment.

METHODS

Reagents

The following materials were used: agonist of the receptor A2a, NECA (5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine, Tocris Bioscience); CD39 inhibitor (CD39i, ARL67156, Sigma-Aldrich); CREB inhibitor (CREBi, Naphthol AS-E phosphate, Sigma-Aldrich); PKA inhibitor (H89, Sigma-Aldrich); TGFBRI inhibitor (SB 431542, Sigma-Aldrich); p38 inhibitor (SB 203580, Calbiochem); AKT inhibitor (AKT inhibitor IV, Calbiochem); anti-CD3 and anti-CD28 (BD Biosciences); methylated Bovine Serum Albumin (mBSA) (Sigma-Aldrich) and RPMI 1640 (Sigma-Aldrich).

Patients and Healthy Donors

We recruited 88 RA patients who fulfilled the 2010 American College of Rheumatology and European League against Rheumatism criteria for RA classification (38). All patients received MTX monotherapy (15–20 mg/wk) for at least 4 week before blood collection. Disease activity was measured by DAS28 (Disease Activity Score, including a 28-joint count). RA patients were stratified according to their response to MTX: (i) unresponsive RA patients (UR-MTX, n = 38), who received MTX doses ≥15 mg/week for at least 3 months and still presented DAS28 > 4.0; and (ii) responsive RA patients (R-MTX, n = 50), who received MTX for >3 months and presented DAS28 < 3.0. No other drugs such as leflunomide, sulfasalazine, cyclosporine, and biologic agents (TNF-α blockers, anti-CD20, and anti-IL-6) were in use at the time of sample collection. The clinical features of RA patients groups are shown on Supplementary Table 1. Peripheral blood samples of healthy donors (n

= 30), paired by sex and age, were also collected. All donors provided informed consent to participate in the study, approved by the Local Ethics Committee (Protocol 4191/2015). Subjects presenting other autoimmune or rheumatic diseases and infectious disorders or were serologic positive for Chagas disease, hepatitis B and C, or HIV were excluded. All laboratory analyses of the samples were performed blind to the donor status.

Leukocyte Separation from Peripheral Blood

Peripheral blood (20 mL) was collected by venipuncture, and PBMCs were isolated by percoll gradient (Sigma-Aldrich), washed with PBS, resuspended in RPMI-1640 containing 10% (vol/vol) heat-inactivated FBS, and counted in a Neubauer chamber.

Tregs and naïve $CD4^+$ cells purification

Tregs and Teff cells from MTX-R patients, UR-MTX and healthy individuals were isolated of the PBMC using the *$CD4^+CD25^+$ Regulatory T Cell Isolation Kit human* (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. For the isolation of naïve $CD4^+$ cells ($CD4^+CD45^+$), we used *Naive $CD4^+$ T Cell Isolation II* (Miltenyi Biotec) also according to the manufacturer's recommendations.

Tregs polarization protocol

Tregs cells were differentiated in 96 well plates U-bottom (Corning). A total of 1 x 10^5 isolated naïve $CD4^+$ ($CD4^+CD45^+$) cells from healthy individuals were incubated in 96 wells plates U-bottom (Corning) with RPMI-1640 10% fetal bovine serum (FBS) in the presence of soluble anti-CD3 (BD Biosciences, 3 µg/ml), anti-CD28 (BD Biosciences, 1.5 µg/ml) and cocktail polarizing containing TGF-β (R&D Systems, 3 ηg/ml, 10 ηg/ml, 30 ηg/ml) and IL-2 (R&D Systems, 10 ηg/ml) for 4 days. In some experiments, cells were differentiated simultaneously in the presence of CD39 inhibitor (ARL67156, Sigma-Aldrich, 10 µM) or A2a receptor agonist (NECA, Tocris Bioscience, 10 µM).

Cell culture

A total of 1 x 10^5 isolated Tregs cells from healthy subjects were incubated at different times with TGF-β (R&D Systems) in different concentrations in the presence of soluble anti-CD3 (BD Biosciences, 3 µg/ml) and anti-CD28 (BD Biosciences, 1.5 µg/ml). In some experiments, Tregs cells were simultaneously incubated with TGFBRI inhibitor (SB 431542, Tocris Bioscience, 10 µM) or PKA inhibitor (H89, Sigma-Aldrich, 10 µM) or CREB inhibitor (Naphthol AS-E phosphate, Sigma-Aldrich, 3 µM, 10 µM, 30 µM) or p38 inhibitor (SB 203580, Calbiochem, 10 µM) or AKT inhibitor (AKT inhibitor IV, Calbiochem, 100 ηM).

Flow cytometry analysis

After TGF-β stimulation on isolated Tregs cells or after Tregs polarization protocol, cells were washed and resuspended in 100 µL of PBS and incubated with 1.5 µg of monoclonal antibodies specific for CD4 (clone SK3), CD25 (clone M-A251), CD39 (clone TU66) or FoxP3 (clone PCH101) and were conjugated with FITC, PE, PE-Cy7 or APC (BD Biosciences). For intracellular FoxP3 staining, the *Human FoxP3 Buffer kit* (BD Biosciences) was used. The cells were analyzed by FACSCanto II (BD Biosciences) or FACSVerse (BD Biosciences) using the software FACSdiva (BD Biosciences), FACSsuite (BD Biosciences) and Flow Jo (TreeStar).

TGF-β quantification

The levels of TGF-β on plasma were determined using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's recommendations. The results were expressed as pg/ml.

Real time PCR

Total RNA was extracted from isolated $CD4^+$ cells of patients R-MTX, UR-MTX and healthy individuals using *PureLinkTM RNA Mini Kit* (Ambion Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. After extraction protocol, 500 ηg of the extracted RNA was used for conversion into cDNA using *High Capacity kit* (Life Technologies). The quantification of the expression of the target genes were carried out by real time PCR using *Syber Green Master Mix*

(Thermo Fisher Scientific) as amplification reporter. Quantitative real-time reaction was performed in *ViiaTM 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). The results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$. The primers pair approached are listed below.

Gene	Sense (5'-3')	Anti-sense (5'-3')
HPRT1	GCAGTACAGCCCCAAAATGGC	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
TGFBR2	AGGGGTCCGGGAAGGC	CTGGGCCTCCATTTCCACAT
TGFBR1	TGCTCGACGATGTTCCATTG	CTCTCAAGGCTTCACAGCTC
ENTPD1	GTGGGGTTGACCCAGAACAA	GTGAGAAGAACCCGCATCCA
GFI1	CAATGCCTGTGGACAAGATG	GCAGTCAGGGGTTGTGACTT
SMAD7	CCTCCTTACTCCAGATACCCGAT	AGCTGACTCTTGTTGTCCGAATT
CREB1	TGAAGAAGCAGCACGAAAGA	TTTCAAGCACTGCCACTCTG
SMAD2	ACCGAAATGCCACGGTAGAA	TGGGGCTCTGCACAAAGAT
p38	ACTCAGATGCCGAAGATGAAC	GTGCTCAGGACTCCATCTCT

Western Blot analysis

A total of 1 x 10^5 isolated Tregs cells treated or not with TGF-β were lysed in RIPA buffer (Sigma). Equal amounts (30 µg) of total cell lysate proteins were separated in Mini-Protean TGX 4–20% gradient SDS-PAGE gels (BioRad). After proteins were transferred into nitrocellulose membrane, target proteins were detected by immunoblotting by specific antibodies. The Western blot was revealed using a kit containing chemiluminescence (ECL) reagent (GE Healthcare) in a Chemidoc XRS device (Biorad).

Antibodies

Proteins were detected using antibodies against CREB (cat. ab7540, Abcam, 1:1000; cat. 48H2, Cell Signalling Technology, 1:1000), p-CREB (cat. ab10564, Abcam, 1:500; cat. 87G3, Cell Signalling Technology, 1:500), SMAD2 (cat. 86F7, Cell Signalling Technology, 1:250), p-SMAD2 (cat. 3101S, Cell Signalling Technology, 1:500) e CD39 (cat. ab189258, Abcam, 1:500), followed by incubation

with HRP-conjugated goat anti-rabbit antibody (Pierce, 1:5000) or HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (Pierce, 1:3000).

Healthy individuals with high or low expression of CD39 on Tregs cells

Individuals were stratified as high or low expression of CD39 on Tregs cells according to the levels of CD39 expression (mean fluorescence intensity, MFI) on circulating Tregs from a previous study conducted by our research group (12). Indeed, samples of the same individuals were again collected in this study. Individuals with low expression of CD39 on Tregs were those with CD39 MFI <5000 and individuals with high expression were those with CD39 MFI >7500.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using analysis of variance one-way nonparametric (ANOVA) followed by Bonferroni's t test (for three or more groups) comparing all pairs of columns, or two-tailed Student's t test (for two groups). P <0.05, P <0.01, P <0.001 were considered statistically significant. For the analysis of correlation, Spearman test was carried out. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

TGF-β stimulation promotes induction of CD39 expression on isolated Tregs cells from healthy individuals

We previously demonstrated that UR-MTX patients presented a depressed CD39 expression on Tregs cells even before MTX treatment, providing evidences that the evaluation of CD39 expression on Tregs cells is a biomarker able to predict the resistance to MTX (12). In an attempt to clarify the molecular mechanisms that drive the reduction of CD39 expression on Tregs observed in UR-MTX, we firstly investigated the factors that contribute for induction of CD39 expression on Tregs. In this way, it has been described that activation of CREB induces CD39 expression on macrophages (19). Therefore, it is important to determine whether similar mechanism participates in

the induction of CD39 expression on Treg cells. In addition to this finding, it was established that TGF-β is able to induce CREB activation on Tregs cells (21, 22). Thus, we firstly determined whether TGF-β could promote induction of CD39 expression on Tregs cells. For this, we isolated Tregs cells from peripheral blood of healthy donors and incubated them with polyclonal stimulus plus different concentrations of TGF-β at different times to examine CD39 expression [mean fluorescent intensity (MFI)] by FACS. We found an increase of CD39 expression on Tregs cells incubated with TGF-β in the concentration of 30 ηg/ml after 24 h. The peak of the increase in the CD39 expression was observed at 48 h after incubation, wherein both concentrations of 30 ηg/ml and 10 ηg/ml were able to increase CD39 expression when compared to non-incubated Tregs cells ($P < 0.01$, Supplementary Figure 1). However, it was noted that after 72 h of incubation the ability to increase CD39 expression was reduced when compared to 48 h. Thus, in all subsequent experiments with isolated Tregs cells we have adopted 48 h of incubation for evaluation of the induction of CD39 expression on Tregs cells (Figure 1, A-B). Simultaneously, we addressed if this enhancement in the CD39 expression on Tregs cells by TGF-β also could occurs in other leukocytes subtypes, such as effector T lymphocytes (Teff, $CD4^+CD25^-$), granulocytes and $CD11c^+$ cells. In contrast to Tregs cells, we found that TGF-β stimulation did not affect CD39 expression on these cells (Supplementary Figure 2), suggesting that TGF-β stimulation mediates induction of CD39 expression exclusively on Tregs cells.

TGF-β stimulation promotes induction of CD39 expression during differentiation of Tregs cells *in vitro*

Next we assessed whether TGF-β stimulation could affect CD39 expression on differentiated Tregs cells *in vitro*. To this end, we isolated naïve $CD4^+$ ($CD4^+CD45RA^+$) cells from the peripheral blood of healthy donors and incubated them for 4 days with polyclonal stimulus in the presence or not of cocktail of cytokines for Tregs cells polarization containing different concentrations of TGF-β (3 ηg/ml 10 ηg/ml or 30 ηg/ml). We found that all TGF-β concentrations employed were able to

promote similarly Tregs differentiation, evidenced by an increase of the frequency of $CD4^+$ cells that simultaneously express FoxP3, a transcription factor that characterizes Tregs cells (20), compared to un-stimulated cells (medium) (Figure 1, C-D). In addition to their capacity to promote differentiation, we observed that TGF-β also promoted an increase of CD39 expression independently of the concentration employed during the differentiation protocol (Figure 1E). These data were compared to CD39 MFI from cells that were not exposed to the cocktail of cytokines for cells polarization (No Treg) (Figure 1E). However, when we addressed the CD39 density within the population of $CD4^+FoxP3^+$ cells, we observed that Tregs cells differentiated with TGF-β in the concentration of 10 ηg/ml and 30 ηg/ml had a marked increase of the CD39 expression compared to $CD4^+FoxP3^+$ cells that were not incubated with cocktail of cytokines (medium) (Figure 1F). Of note, these findings also were supported by Western Blot analysis in differentiated Tregs cells with different concentrations of TGF-β (Figure 1G). Furthermore, we confirmed our data conducting experiments of second round of TGF-β stimulation in differentiated Tregs cells. In accordance, we firstly differentiated Tregs cells with TGF-β (10 ηg/ml) and removed the culture supernatant for a subsequent re-stimulation with different concentrations of TGF-β (3 ηg/ml 10 ηg/ml or 30 ηg/ml). Corroborating with the previous findings, we observed that higher concentrations of TGF-β (i.e.: 10 ηg/ml and 30 ηg/ml) enhanced the CD39 density on differentiated Tregs cells (Figure 1H). Together, we demonstrated that TGF-β induces CD39 expression on both isolated and differentiated Tregs cells.

Downstream molecules that participates of TGF-β-induced CD39 expression on Tregs cells

We next assessed the downstream activated molecules by TGF-β stimulation that could contribute for the increase of CD39 expression on Tregs cells. The firsts steps to trigger TGF-β signalling pathway comprise the activation of the receptors TGFBRII and TGFBRI via interaction with the ligand, which subsequently promotes the phosphorylation of the target molecules by TGFBRI activity (28). Therefore, we evaluated whether activity of the TGBFRI would be required

for TGF-β-induced CD39 expression on Tregs cells. Flow cytometric analysis revealed that simultaneously administration of a specific inhibitor of the TGFBRI activity (SB 431542, 10 μM) reversed the effects of the TGF-β by promoting CD39 expression on isolated Tregs cells (Figure 2A). Next we addressed if TGBFRI-activated downstream molecules would be associated with TGF-β-induced CD39 expression on Tregs cells. In this way, it is described that TGFBRI can activate PKA (25, 39–41). Further, it is shown that CREB phosphorylation by PKA induces CD39 mRNA in macrophages (19). We again isolated Tregs cells from healthy donors and incubated them for 48 h with TGF-β (10 ηg/ml) in the presence or not of inhibitor of the PKA activity [H89, 10 mM, (42)]. We demonstrated that the administration of H89 did not modulate the induction of CD39 expression on Tregs cells by TGF-β, providing evidences that PKA activity is not crucial to drive this phenomenon (Figure 2B). According to these findings, it is plausible that other molecules from non-canonical pathways of TGF-β signaling have an important role in CREB activation. Indeed, it is well described that other kinases such as Erk, p38 and PI3K/AKT activate CREB indirect or directly of the TGFBRI after TGF-β stimulation (30–33). To understand this, we performed experiments using other inhibitors of kinases activity that would have a role in induction of CD39 expression by TGF-β. We found that incubation of isolated Tregs with a pharmacological inhibitor of AKT activity [AKT inhibitor IV, 100 ηM, (43)] did not modulate the induction of CD39 expression on Treg cells via TGF-β (Figure 2C). In contrast, the incubation of an inhibitor of p38 activity [SB 203580, 10 uM)(44)] completely abolished the induction of CD39 expression by TGF-β on Tregs cells (Figure 2D), suggesting that p38 activity has a crucial role for CD39 induction by TGF-β leading CREB activation and further induction of the transcription of *ENTP1* gene.

The role of others TGBFRI-activated downstream molecules with induction of CD39 expression on Tregs cells were investigated. We evaluated whether activation of the SMADs and CREB on Tregs cells could be involved with the increase of CD39 expression after TGF-β stimulation. Notably, we observed an increase in the expression of activated SMAD2 (p-SMAD2) on

Tregs cells incubated with TGF-β in a concentration-dependent manner (Figure 2E). Similarly to SMAD2, we also found an increase in p-CREB levels (Figure 2F). Altogether, the TGF-β-induced CD39 expression on Tregs cells is associated with a remarkable enhance of p-SMAD2 and p-CREB levels.

In an attempt to confirm the participation of CREB in TGF-β-induced CD39 expression on Tregs cells, we again isolated Tregs cells from healthy donors and incubated them with TGF-β in the presence or not of inhibitor of the CREB activity (iCREB, Naphthol AS-E phosphate). We showed that inhibition of the CREB activity abolished the TGF-β effects in mediating induction of CD39 expression on Tregs cells, independently of iCREB concentrations employed (Figure 2G). Taken together, our findings suggest that the TGF-β-induced CD39 expression on Tregs cells is associated with activation of the TGF-β receptors (TGFBRII and TGFBRI), signal translocator SMAD2 and transcription factor CREB, whose activation is dependent of p38 activity. Still, these findings provide relevant insights to investigate if possible alterations in the expression and/or activation of molecules related to TGF-β signalling could be associated with lower CD39 expression on Tregs cells from UR-MTX.

Effect of variable levels of CD39 expression on Tregs cells differentiation

The CD39 levels on Tregs cells are variable even in individuals from the healthy population (12, 15). Next we addressed whether these variable levels of CD39 expression could influence the Tregs cells differentiation and in the TGF-β-induced CD39 expression on Tregs cells. For this, we conducted Tregs differentiation protocol using isolated cells from healthy individuals with low or high CD39 expression previously addressed on circulating Tregs cells. Details of the healthy individuals stratification are available in Methods Section. Regarding to Tregs cells differentiation, naïve $CD4^+$ cells from both groups (high or low CD39 expression) were able to polarize for Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) cells by a TGF-β concentration-independent manner (Figure 3, A-C). However, we also found for all concentrations of TGF-β employed that individuals with high CD39 expression had

a remarkable more ability to polarize Tregs cells than individuals with low CD39 expression (Figure 3, A-C). This polarization process was highly reduced when an inhibitor of the CD39 activity (iCD39, ARL67156) was added during the differentiation protocol, evidenced by similar frequencies of $CD4^{+}FoxP3^{+}$ cells between individuals with high and low CD39 expression (Figure 3D). The iCD39 has no effects on Tregs cells from individuals who express low levels of CD39. Thus, these findings indicate that CD39 activity is an enhancer of the Tregs differentiation.

Subsequently, to clarify how CD39 activity increases Tregs cells differentiation, we hypothesized that higher CD39 expression provide a concomitant higher supply of the extracellular ADO, which would result in a boosting of Tregs differentiation due to ADO effects. Supporting this hypothesis, it has been described that ADO is a potent enhancer of Tregs cells polarization by a mechanism dependent of A2a receptors (45). To test our hypothesis, we performed *in vitro* Tregs cells differentiation using isolated cells from individuals with high or low CD39 expression in the presence of an A2a receptor agonist (NECA, 5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine). We observed that Tregs cells differentiation in the presence of NECA resulted in an increase of the frequency of Tregs ($CD4^{+}FoxP3^{+}$) cells in both groups of individuals (Figure 3E). It is important to mention that NECA supplementation in individuals with reduced CD39 expression restored their capacity of Tregs cells differentiation, since we found similar frequencies of differentiated Tregs ($CD4^{+}FoxP3^{+}$) of NECA-stimulated cells of individuals with low CD39 expression and non-incubated cells from individuals with high CD39 expression (Figure 3E), suggesting that CD39 is an enhancer of Tregs cells differentiation by producing extracellular ADO, which in turn boosts Tregs cells polarization.

In addition to Tregs differentiation, we also assessed if variable levels of CD39 expression could influence in the TGF-β-induced CD39 expression on Tregs cells. While differentiated Tregs cells from individuals with high CD39 showed an increase of CD39 expression compared to un-stimulated Tregs cells (medium), individuals with low CD39 were unable to induce CD39 expression after TGF-β stimulation (Figure 3, F-G). According to these findings, we then hypothesized that

possible alterations in the expression and/or activation of the molecules that participate of TGF-β signalling could be related with the inability to induce CD39 expression on Tregs cells by TGF-β stimulation in these individuals.

UR-MTX patients have an intrinsic impairment in TGF-β signalling triggering

We then investigated whether UR-MTX patients could have alterations in the expression and/or activation of the molecules that participate of the TGF-β signalling. First of all, one of these alterations could be related to a decrease of systemic levels of the ligand (i.e.: TGF-β) in UR-MTX patients. To answer this question, we measured TGF-β levels on plasma from RA patients. We observed no differences for TGF-β levels on plasma between R-MTX and UR-MTX (Figure 4A). Subsequently, we quantified by real time PCR on isolated $CD4^+$ cells from blood of RA patients the molecules previously related to TGF-β-induced CD39 expression on Tregs cells. In addition to these molecules, we also addressed the expression of other molecules described by modulating TGF-β signalling or even CD39 expression: SMAD7, a regulatory protein for SMAD2 activity whose expression is TGF-β stimulation-induced by negative feedback mechanism of TGF-β signalling pathway (28); GFI-1 (growth factor independent-1) reported by acting as a repressor of the CD39 expression on $CD4^+$ cells (37); p38, a kinase protein whose activity is related to the functional inhibition of GFI-1 and CREB activation (37). Interestingly, while there was no difference between the investigated groups in mRNA levels for *TGFBRI*, *SMAD2*, *p38* and *GFI-1* (Figure 4, B-E), we found that UR-MTX had a marked reduction of *TGFBRII*, *CREB1* and *SMAD7* on isolated $CD4^+$ cells (Figure 4, F-H), suggesting that the decreased levels of these molecules provide an impairment in TGF-β signalling triggering and in the TGF-β-induced CD39 expression on Tregs cells, leading to reduction at basal conditions of the CD39 expression on Tregs cells. Indeed, there was a remarkable correlation between TGFBRII and CREB expression; and TGFBRII and CD39 expression (Figure 4I), indicating that individuals with lower TGFBRII or CREB expression also present a reduction of

CD39 expression. Of note, it is important to mention that we observed an occurrence of well-defined clusters in the correlation analyzes that determined a stratification of UR-MTX and R-MTX patients.

To confirm these findings, we also performed Western Blot analysis on isolated Tregs cells from blood of R-MTX and UR-MTX. We found that isolated Tregs cells from healthy individuals with low CD39 expression presented a decrease of p-CREB levels at basal conditions compared to healthy donors with high CD39 expression (Figure 4, J-K). Interestingly, TGF-β-stimulated cells from both groups had an increase of p-CREB levels compared to un-stimulated Tregs cells, but individuals with low CD39 expression continued to exhibit a reduction of p-CREB levels on Tregs cells even after TGF-β stimulation compared to individuals with high CD39 expression (Figure 4, J-K). This increase of p-CREB levels in TGF-β-stimulated Tregs cells was reversed to basal levels in the presence of TGFBRI inhibitor during TGF-β incubation. Interestingly, individuals with low CD39 expression showed a decrease of CREB levels compared to individuals with high CD39 expression (Figure 4, J-K). The levels of CREB on Tregs cells remained unchanged after stimulation with TGF-β or TGF-β plus TGFBRI inhibitor (Figure 4, J-K). Therefore, we showed that in addition to CREB reduction, individuals with low CD39 expression presented a reduction of p-CREB levels.

Finally, supporting our data in healthy subjects, we also found a decrease of p-CREB and CREB levels from un-stimulated isolated Tregs cells of UR-MTX patients compared to R-MTX patients (Figure 4L). Moreover, while there was no difference for SMAD2 levels, we observed a reduction of p-SMAD2 levels from Tregs cells of UR-MTX patients (Figure 4M). Taken together, these data show that an impairment in TGF-β signalling triggering (account for a TGFBRII reduction) drives a compromised capacity for induction of CD39 expression by TGF-β stimulation on Tregs cells from UR-MTX patients, indicating that this impairment orchestrates the reduction of CD39 expression on Tregs cells and leads to MTX resistance.

DISCUSSION

The understanding of the mechanisms involved in MTX resistance is crucially important to improve the treatment of chronic inflammatory diseases such RA and also to identify possible novel biomarkers able to predict the resistance to MTX therapy. In a prior study, we have demonstrated that UR-MTX patients have a depressed CD39 expression on Tregs cells, which results in a reduced ability to generate extracellular ADO and further compromised suppressive function of their Tregs (12). Interestingly, we also demonstrated that evaluation of CD39 expression on Tregs cells is a biomarker able to predict the therapeutic response to MTX, since UR-MTX patients showed a reduced CD39 expression on Tregs cells even before MTX treatment (12). In the present study, we showed a rationale by which UR-MTX patients have lower CD39 expression on Tregs cells. For this, we firstly investigated the molecular mechanisms that participate of CD39 induction on Tregs, showing that TGF-β stimulation induces CD39 expression in both human isolated and differentiated Tregs cells through activation of TGFBRII, TGFBRI, SMAD2 and CREB by p38 activity-dependent manner. Subsequently, we investigated the expression and/or activation of these molecules on cells from RA patients. We found that UR-MTX patients and healthy individuals with reduced expression of CD39 on Tregs cells have an intrinsic reduction in the expression and activation of TGFBRII and CREB, which results in a compromised ability in the induction of CD39 expression by TGF-β. Still, correlation analysis showed a robust association between TGFBRII and CREB levels with CD39 expression on isolated cells from RA patients. Simultaneously, we clearly observed the role of the intrinsic CD39 expression on differentiation of Tregs cells and induction of CD39 expression by TGF-β stimulation. Indeed, we found that CD39 activity is a booster of the Tregs cells differentiation, since individuals with higher CD39 expression present an increase of the capacity to polarize Tregs cells. Of note, differentiated Tregs cells from individuals with lower CD39 expression were unable to increase CD39 expression in response to TGF-β, suggesting that an involvement in TGF-β signalling triggering leads to the reduction of CD39 expression on Tregs cells associated with inefficacy to MTX treatment.

Strikingly, there are evidences describing that cell signalling pathways can regulate CD39 expression on Tregs cells. In fact, Liao et al. identified the involvement of CREB in the regulation of CD39 expression on macrophages, since it was observed that CREB phosphorylation induces an increase of CD39 mRNA. Thus, our focus was to determine whether similar mechanism contributes for induction of CD39 expression on Tregs cells. In addition, it also was demonstrated that the TGF-β, a crucial cytokine for differentiation of Tregs cells, is able to induce CREB activation on Tregs (21, 22). In this context, we assessed whether TGF-β could promote an increase of CD39 expression on Tregs cells. It is important to highlight that we just evaluated the effect of the TGF-β1 in the induction of CD39 expression because TGF-β1 is the most commonly studied isoform and has a established role in several physiological events (46). In this way, we demonstrated that TGF-β1 stimulation promoted an increase of CD39 expression on Tregs by activation of TGFBRII and TGFBRI receptors, the SMAD2 signal translocator and CREB transcription factor, by p38 activity dependent-manner. Of course, other mechanisms and molecular platforms may be involved with induction of CD39 expression on Tregs cells but these findings provided relevant insights to address whether possible alterations in the expression/activation of these previously identified molecules from Tregs could be associated with the decreased CD39 expression in UR-MTX patients.

Additional comments concerning the molecular pathway involved in the induction of CD39 expression on Tregs cells by TGF-β stimulation should be raised. The firsts one is how SMADs could be participating of this phenomenon. Activated SMAD2 forms a complex with SMAD3 and SMAD4, which translocates to the nucleus and promotes transcription of their molecular targets (28). The SMADs can act directly on the DNA regions called SBE (SMAD-binding element) and induce the transcription of their target genes (24). However, the affinity of SMADs to the DNA in SBE regions is low, and then SMADs can act in cooperation with other transcription factors, including CREB, promoting transcription (25, 47). Additionally, CREB phosphorylation can be mediated after activation of PKA by TGFBRI or SMADs activity, such as SMAD4, which interacts with the

regulatory domain of PKA (25, 40, 48, 49). Taking into account, we found that CREB activation is essential for mediating induction of CD39 expression by TGF-β. Still, CREB activation was independent of PKA activity, indicating that other molecules from non-canonical pathways of TGF-β signalling involved in the activation of CREB. Other kinases such as Erk, p38 and PI3K/AKT are activated in TGF-β signalling cascade and have ability to activate CREB (30–33). Indeed, we found that p38 activity is critical to mediate TGF-β-induced CD39 expression, suggesting that p38 activity promotes CREB activation, which would acts directly or in cooperation with SMADs inducing the transcription of *ENTPD1* gene. Furthermore, it was reported that the TGF-β-induced CD39 expression was exclusively reported on Tregs cells. Notably, this finding can be associated with the higher expression of the TGF-β receptors observed on Tregs cells than in other leucocytes subtypes (50), rendering them more responsive to TGF-β stimulation.

Certainly, this study opened a new avenue of investigation of the mechanisms associated with MTX resistance, since further studies will be conducted to determine the reason by which patients/individuals with reduced CD39 expression on Tregs cells also have a reduced TGFBRII and CREB levels. In this way, genetic polymorphisms might be associated with reduced levels of these molecules. Regarding to TGFBRII receptor, although it was described polymorphisms in *TGFBR2* gene associated with susceptibility and prognosis of a range of disorders, including cancer and vitiligo (51–53), there are not still studies describing an association of these polymorphisms with MTX resistance. For CREB expression, other evidences also demonstrated an association of polymorphisms in *CREB1* gene with susceptibility and severity of the neurological and neuropsychiatric diseases (41, 54, 55), but similarly to *TGFBR2* gene, association of *CREB1* gene polymorphisms with MTX resistance still was not addressed. In accordance, it is plausible that these polymorphisms might be related to reduction of TGFBRII and CREB expression and consequently lead to a depressed CD39 expression on Tregs cells. Collectively, our findings also suggest that the

evaluation of TGFBRII in addition to CD39 expression on Tregs cells could be a suitable biomarker to predict the therapeutic response to MTX in RA.

In conclusion, our findings provide novel perspectives for RA treatment describing marked tools that will allow the optimization in choosing the adequate therapeutic strategy by evaluation of both CD39 and TGFBRII expression on circulating Tregs cells. Finally, the possible further implementation of these biomarkers detection in the clinical practice must bring a variety of benefits and socio-economic impact, improving the life style of RA patients and promoting significant savings from health system with costs regarding to inadequate treatments.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

R.S.P., V.C., P.L.J., F.Q.C, designed the study. R.S.P., H.I.N., T.M.C., J.C.A.-F., P.L.J., F.Q.C planned experiments and analysed data. R.S.P., P.B.D., J.T., N.T.C., R.D.O., performed the experiments. R.S.P., F.Y.L., P.L.J., F.Q.C., wrote the manuscript. F.Q.C. supervised the study.

FUNDING

The research leading to these results received funding from the European Union Seventh Framework Programme [FP7-2007-2013] under grant agreement n° HEALTH-F4-2011-281608 (TIMER), from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) under grant agreements n° 2009/54014-7, 2011/19670 and 2013/08216-2 (Center for Research in Inflammatory Diseases) and from the University of São Paulo NAP-DIN under grant agreement n° 11.1.21625.01.0.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. TGF-β stimulation increases CD39 expression in both isolated and differentiated Tregs cells. Tregs cells were isolated from healthy donors (n = 5) and incubated with polyclonal stimulation and different concentrations of TGF-β (3 ηg/ml, 10 ηg/ml, 30 ηg/ml) for 48h. (A) Representative histogram of CD39 expression on isolated Tregs cells incubated with different concentrations of TGF-β for 48h. (B) Expression of CD39 (MFI) on Tregs cells (n = 5) incubated or not (medium) with different concentrations of TGF-β for 48h. Naive $CD4^+$ ($CD4^+CD45RA^+$) cells were isolated from healthy donors (n = 4) and incubated or not (medium) with polyclonal stimulus and different concentrations of TGF-β (3 ηg/ml, 10 ηg/ml, 30 ηg/ml) and IL-2 (10 ηg/ml) for 4 days. (C) Representative dot plot of the percentage of differentiated Tregs cells ($CD4^+FoxP3^+$). (D) Frequency of differentiated Tregs cells after 4 days. (E) Representative histogram of CD39 expression (MFI) on Tregs and non-Tregs (No Treg) cells incubated with different concentrations of TGF-β during Tregs differentiation protocol. (F) Expression of CD39 (MFI) on Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) cells incubated or not (medium) with polarizing cytokines containing TGF-β at different concentrations. (G) Expression of CD39 and β-actin (endogenous control) by Western Blot in the culture of Tregs cells differentiated or not (medium) with cocktail of cytokines for Tregs polarization containing TGF-β at different concentrations. Data are shown in duplicate in each group. Naive $CD4^+$ ($CD4^+CD45RA^+$) cells were isolated from healthy donors (n = 5) and incubated with TGF-β (10 ηg/ml) and IL-2 (10 ηg/ml) plus polyclonal stimulation for 4 days. Differentiated Tregs cells were re-stimulated with different concentrations of TGF-β (3 ηg/ml, 10 ηg/ml, 30 ηg/ml) and polyclonal stimulation. (H) Expression of CD39 (MFI) on Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) cells re-stimulated or not (medium) with TGF-β. *P <0.05. **P <0.01.

Figure 2. Activation of the molecular cascade TGFBRII/TGFBRI/p38/SMAD2/CREB by TGF-β stimulation is required for CD39 induction on Tregs cells. (A-D) Tregs cells were isolated from the blood of healthy donors (n = 4) and incubated with anti-CD3 (3 µg/ml), anti-CD28 (1.5 µg/ml), TGF-β (10 ηg/ml) simultaneously or not with selective inhibitor of TGFBRI SB 431542 (1 µM, 10

μM) (A) or inhibitor of PKA activity (H89; 10 μM) (B) or inhibitor of AKT activity (AKT inhibitor IV; 100 ηM) (C) or inhibitor of p38 activity (SB 203580; 10 μM) (D) for 48 hours. (E) Western blot analysis showing the expression of p-SMAD2 and SMAD2 on isolated Tregs cells from healthy donors stimulated or not with different concentrations of TGF-β. Data in duplicate for each concentration. (F) Western blot analysis showing the expression of p-CREB and CREB on isolated Tregs cells from healthy donors stimulated or not with different concentrations of TGF-β. Data in duplicate for each concentration. (G) Tregs cells were isolated from the blood of healthy donors (n = 5) and incubated with anti-CD3 (3 μg/ml), anti-CD28 (1.5 μg/ml), TGF-β (10 ηg/ml) simultaneously or not with selective inhibitor of CREB (3, 10 and 30 μM) for 48 hours. Expression of CD39 (MFI) on Tregs cells. *P <0.05. **P <0.01.

Figure 3. Increase of CD39 expression induced by TGF-β is compromised on Tregs cells from individuals with low CD39 expression. Naive $CD4^+$ ($CD4^+CD45RA^+$) cells were isolated from healthy donors with variable levels of CD39 expression on circulating Treg cells and incubated with polyclonal stimulus and different concentrations of TGF-β (3 ηg/ml, 10 ηg/ml, 30 ηg/ml) and IL-2 (10 ηg/ml) for 4 days. (A) Representative dot plots of the percentage of Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) cells differentiated from healthy individual with high CD39 expression previously known. (B) Representative dot plots of the percentage of Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) cells differentiated from healthy individual with low CD39 expression previously known. (C) Frequency of Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) cells differentiated from healthy subjects (n = 4 per group) with high or low CD39 expression previously known. (D-E) Frequency of Tregs ($CD4^+FoxP3^+$) cells differentiated in the presence of CD39 inhibitor (iCD39) (D) or agonist of A2a receptors (NECA) (E) from healthy subjects (n = 4 per group) with high or low CD39 expression previously known. (F) Representative histogram of CD39 expression (MFI) on Tregs cells differentiated with different concentrations of TGF-β from healthy subjects with high or low CD39 expression. (G) Expression of CD39 (MFI) on Tregs

($CD4^+FoxP3^+$) cells from healthy subjects (n = 5 per group) with high or low CD39 expression. *P <0.05.**P <0.01. ***P <0.001.

Figure 4. Impairment in the TGF-β-mediated signalling pathway is associated with reduction of CD39 expression on Tregs cells from UR-MTX patients. (A) Levels of TGF-β on plasma from R-MTX (n = 11) and UR-MTX (n = 18). (B-H) Quantification of mRNA for TGFBRI (B), SMAD2 (C), p38 (D), GFI-1 (E), TGFBRII (F), CREB (G) e SMAD7 (H) on $CD4^+$ cells isolated from blood of R-MTX (n = 23) and UR-MTX (n = 17). (I) Correlation analysis between TGFBRII and CREB (left panel); TGFBRII and CD39 (right panel) on $CD4^+$ cells isolated from blood of R-MTX (n = 18) and UR-MTX (n = 13). (J-K) Tregs cells were isolated from blood of healthy donors (n = 3 per group) with high or low CD39 expression and incubated with anti-CD3 (3 µg/ml), anti-CD28 (1.5 µg/ml), TGF-β (10 ηg/ml) simultaneously or not with selective inhibitor of TGFBRI SB 431542 (10 µM) for 48 hours. (J) Western blot analysis of p-CREB and CREB on isolated Tregs cells. (K) Normalized expression to endogenous control (β-actin) of p-CREB and CREB on isolated Tregs cells. (L) Tregs cells were isolated from the blood of R-MTX (n = 7), UR-MTX (n = 6) and evaluated the expression of p-CREB and CREB by Western blot. Graphs show the normalized expression to endogenous control (β-actin). (M) Tregs cells were isolated from blood of R-MTX (n = 7), UR-MTX (n = 6) and assessed the expression of pSMAD2 and SMAD2 by Western blot. Graphs show the normalized expression to endogenous control (β-actin). *P <0.05. **P <0.01. ***P <0.001.

REFERENCES

1. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85(3):307–310.
2. McInnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. [Internet]. *N. Engl. J. Med.* 2011;365(23):2205–2219.
3. Cronstein BN. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis [Internet]. *Pharmacol Rev* 2005;57(2):163–172.
4. Singh JA et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis [Internet]. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* 2016;68(1):1–26.

5. Curtis JR, Singh JA. Use of Biologics in Rheumatoid Arthritis: Current and Emerging Paradigms of Care. *Clin. Ther.* 2011;33(6):679–707.
6. Kumar P, Banik S. Pharmacotherapy options in rheumatoid arthritis. *Clin. Med. Insights Arthritis Musculoskelet. Disord.* 2013;6:35–43.
7. Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Hask?? G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.* 2013;19(6):355–367.
8. Cronstein BN, Naime D, Ostad E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate: Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *J. Clin. Invest.* 1993;92(6):2675–2682.
9. Montesinos MC 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 Rheum.* 2007;56(5):1440–1445.
10. Bansard C et al. Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted?. *Rheumatology* 2009;48(9):1021–1028.
11. Plant D, Wilson AG, Barton A. Genetic and epigenetic predictors of responsiveness to treatment in RA. [Internet]. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014;10(6):329–37.
12. Peres RS et al. Low expression of CD39 on regulatory T cells as a biomarker for resistance to methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015;112(8):2509–14.
13. Friedman DJ et al. From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009;106(39):16788–16793.
14. Friedman DJ et al. Functional ENTPD1 polymorphisms in african americans with diabetes and end-stage rnal disease. *Diabetes* 2009;58(4):999–1006.
15. Rissiek A et al. The expression of CD39 on regulatory T cells is genetically driven and further upregulated at sites of inflammation. *J. Autoimmun.* 2015;58:12–20.
16. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals.. *Annu. Rev. Biochem.* 1999;68:821–861.
17. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. [Internet]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2(8):599–609.
18. Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS. The role of the transcription factor CREB in immune function. [Internet]. *J. Immunol.* 2010;185(11):6413–9.
19. Liao H, Hyman MC, Baek AE, Fukase K, Pinsky DJ. cAMP/CREB-mediated transcriptional regulation of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) expression. *J. Biol. Chem.*

2010;285(19):14791–14805.
20. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. [Internet]. *Science (80-.).* 2003;299(5609):1057–61.
21. Kamiya K et al. Phosphorylation of the cyclic AMP response element binding protein mediates transforming growth factor beta-induced downregulation of cyclin A in vascular smooth muscle cells. [Internet]. *Mol. Cell. Biol.* 2007;27(9):3489–98.
22. Kochetkova I, Thornburg T, Callis G, Pascual DW. Segregated regulatory CD39+CD4+ T cell function: TGF-β-producing Foxp3- and IL-10-producing Foxp3+ cells are interdependent for protection against collagen-induced arthritis. [Internet]. *J. Immunol.* 2011;187(9):4654–66.
23. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.. *Nature* 2003;425(6958):577–584.
24. Massagué J. How cells read TGF-beta signals.. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000;1(3):169–178.
25. Warner DR, Pisano MM, Greene RM. Nuclear convergence of the TGFbeta and cAMP signal transduction pathways in murine embryonic palate mesenchymal cells. [Internet]. *Cell. Signal.* 2003;15(2):235–42.
26. Warner DR et al. Functional interaction between Smad, CREB binding protein, and p68 RNA helicase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004;324(1):70–76.
27. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility.. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8(12):970–982.
28. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7.. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2009;41(4):263–272.
29. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily.. *Science* 2002;296(5573):1646–1647.
30. Lee MK et al. TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. [Internet]. *EMBO J.* 2007;26(17):3957–67.
31. Engel ME, McDonnell M a, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription.. *J. Biol. Chem.* 1999;274(52):37413–37420.
32. Bhowmick NA et al. Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. [Internet]. *Mol. Biol. Cell* 2001;12(1):27–36.
33. Bakin A V, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL. Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor ß-mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration [Internet]. *J. Biol. Chem.* 2000;275(47):36803–36810.
34. Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by

RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase.. *Science* 1996;273(5277):959–963.
35. Peltier J, O'Neill A, Schaffer D V. PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation. *Dev. Neurobiol.* 2007;67(10):1348–1361.
36. Steven A, Seliger B. Control of CREB expression in tumors: from molecular mechanisms and signal transduction pathways to therapeutic target [Internet]. *Oncotarget* [published online ahead of print: 2015]; doi:10.18632/oncotarget.7721
37. Chalmin F et al. Stat3 and Gfi-1 Transcription Factors Control Th17 Cell Immunosuppressive Activity via the Regulation of Ectonucleotidase Expression. *Immunity* 2012;36(3):362–373.
38. Aletaha D et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010;62(9):2569–2581.
39. Kramer IM, Koornneef I, de Laat SW, van den Eijnden-van Raaij AJ. TGF-beta 1 induces phosphorylation of the cyclic AMP responsive element binding protein in ML-CCl64 cells.. *EMBO J.* 1991;10(5):1083–1089.
40. Moustakas A, Heldin C-H. Non-Smad TGF-beta signals.. *J. Cell Sci.* 2005;118(Pt 16):3573–3584.
41. Wang P et al. CREB1 gene polymorphisms combined with environmental risk factors increase susceptibility to major depressive disorder (MDD). *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015;8(1):906–913.
42. Herbst KJ, Allen MD, Zhang J. The cAMP-dependent protein kinase inhibitor H-89 attenuates the bioluminescence signal produced by Renilla luciferase. *PLoS One* 2009;4(5). doi:10.1371/journal.pone.0005642
43. Meinig JM, Peterson BR. Anticancer/antiviral agent Akt inhibitor-iv massively accumulates in mitochondria and potently disrupts cellular bioenergetics. *ACS Chem. Biol.* 2015;10(2):570–576.
44. Birkenkamp KU et al. The p38 MAP kinase inhibitor SB203580 enhances nuclear factor-kappa B transcriptional activity by a non-specific effect upon the ERK pathway. [Internet]. *Br. J. Pharmacol.* 2000;131(1):99–107.
45. Ohta A et al. The development and immunosuppressive functions of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front. Immunol.* 2012;3(JUL). doi:10.3389/fimmu.2012.00190
46. Kubiczkova L, Sedlarikova L, Hajek R, Sevcikova S. TGF-beta -- an excellent servant but a bad master. *J. Transl. Med.* 2012;10(1):183.
47. Seoane J, Le H Van, Shen L, Anderson SA, Massagué J. Integration of smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 2004;117(2):211–223.

48. Yang H et al. PKA Modulates TGF-beta Signaling through a Direct Interaction with Smad4. [Internet]. *J. Biol. Chem.* [published online ahead of print: 2013]; doi:10.1074/jbc.M113.455675
49. Roberts a B, Derynck R. Meeting report: signaling schemes for TGF-beta. [Internet]. *Sci. STKE* 2001;2001(113):pe43.
50. Cottrez F, Groux H. Regulation of TGF-beta response during T cell activation is modulated by IL-10. [Internet]. *J. Immunol.* 2001;167(2):773–8.
51. Yun JY et al. Transforming growth factor beta receptor II (TGFBR2) polymorphisms and the association with nonsegmental vitiligo in the Korean population. *Int. J. Immunogenet.* 2010;37(4):289–291.
52. Busch S et al. TGF-beta receptor type-2 expression in cancer-associated fibroblasts regulates breast cancer cell growth and survival and is a prognostic marker in pre-menopausal breast cancer. [Internet]. *Oncogene* 2013;(November 2012):1–12.
53. Ren Y et al. TGFβ-1 and TGFBR2 polymorphisms, cooking oil fume exposure and risk of lung adenocarcinoma in Chinese nonsmoking females: a case control study. [Internet]. *BMC Med. Genet.* 2015;16:22.
54. Perlis RH et al. Association between treatment-emergent suicidal ideation with citalopram and polymorphisms near cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in the STAR*D study.. *Arch. Gen. Psychiatry* 2007;64(6):689–697.
55. Calati R et al. Evaluation of the role of MAPK1 and CREB1 polymorphisms on treatment resistance, response and remission in mood disorder patients. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* 2013;44:271–278.

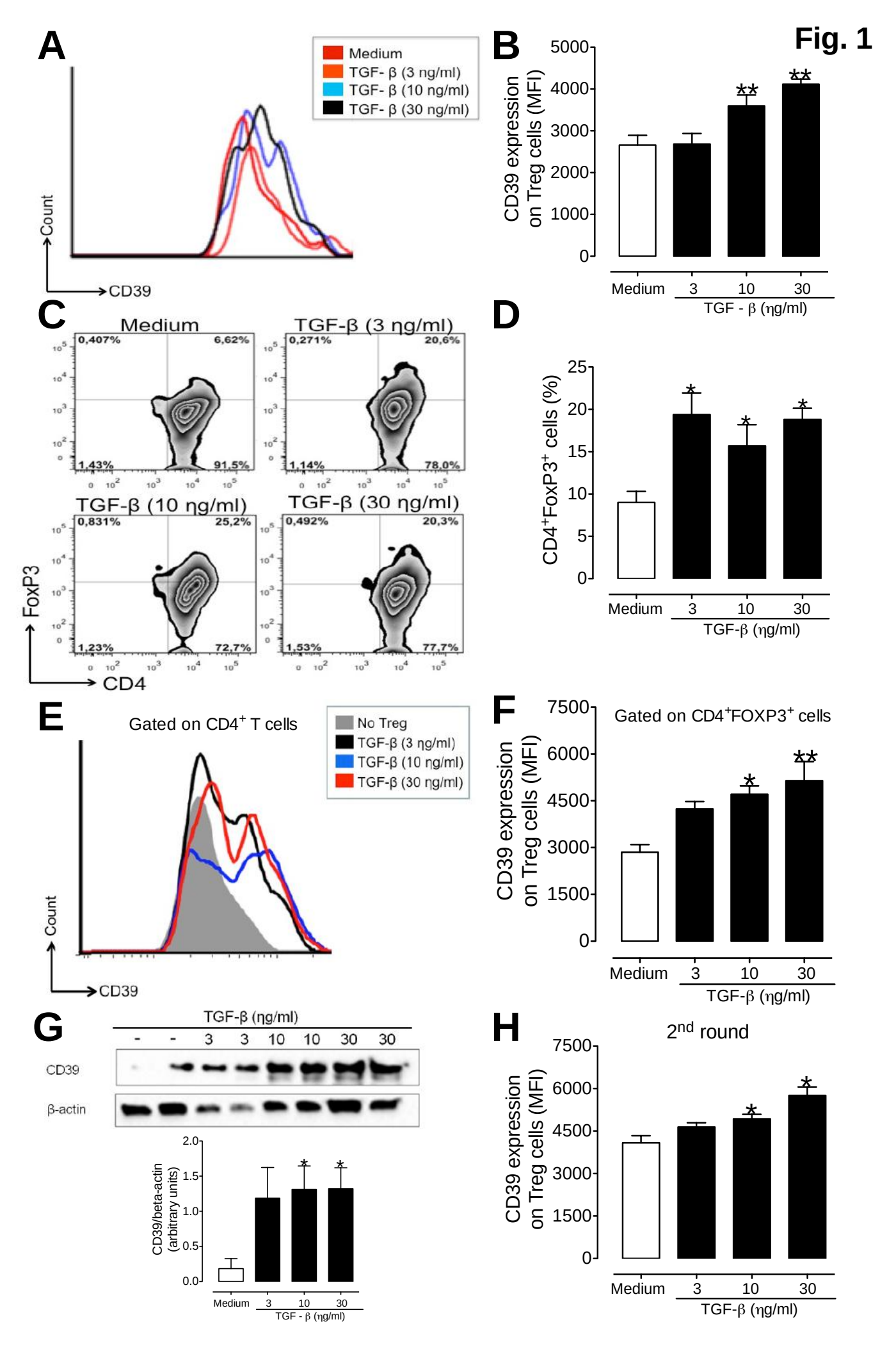


Fig. 1
A
Medium
TGF- β (3 ng/ml)
TGF- β (10 ng/ml)
TGF- β (30 ng/ml)
Count
CD39
B
CD39 expression on Treg cells (MFI)
5000
4000
3000
2000
1000
0
Medium
3
10
30
TGF - β (ηg/ml)
C
Medium
0,407%
6,62%
1,43%
91,5%
TGF-β (3 ηg/ml)
0,271%
20,6%
1,14%
78,0%
TGF-β (10 ηg/ml)
0,831%
25,2%
1,23%
72,7%
TGF-β (30 ηg/ml)
0,492%
20,3%
1,53%
77,7%
FoxP3
CD4
D
CD4+FoxP3+ cells (%)
25
20
15
10
5
0
Medium
3
10
30
TGF-β (ηg/ml)
E
Gated on CD4+ T cells
No Treg
TGF-β (3 ηg/ml)
TGF-β (10 ηg/ml)
TGF-β (30 ηg/ml)
Count
CD39
F
Gated on CD4+FOXP3+ cells
CD39 expression on Treg cells (MFI)
7500
6000
4500
3000
1500
0
Medium
3
10
30
TGF-β (ηg/ml)
G
TGF-β (ηg/ml)
-
-
3
3
10
10
30
30
CD39
β-actin
CD39/beta-actin (arbitrary units)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Medium
3
10
30
TGF - β (ηg/ml)
H
2nd round
CD39 expression on Treg cells (MFI)
7500
6000
4500
3000
1500
0
Medium
3
10
30
TGF-β (ηg/ml)

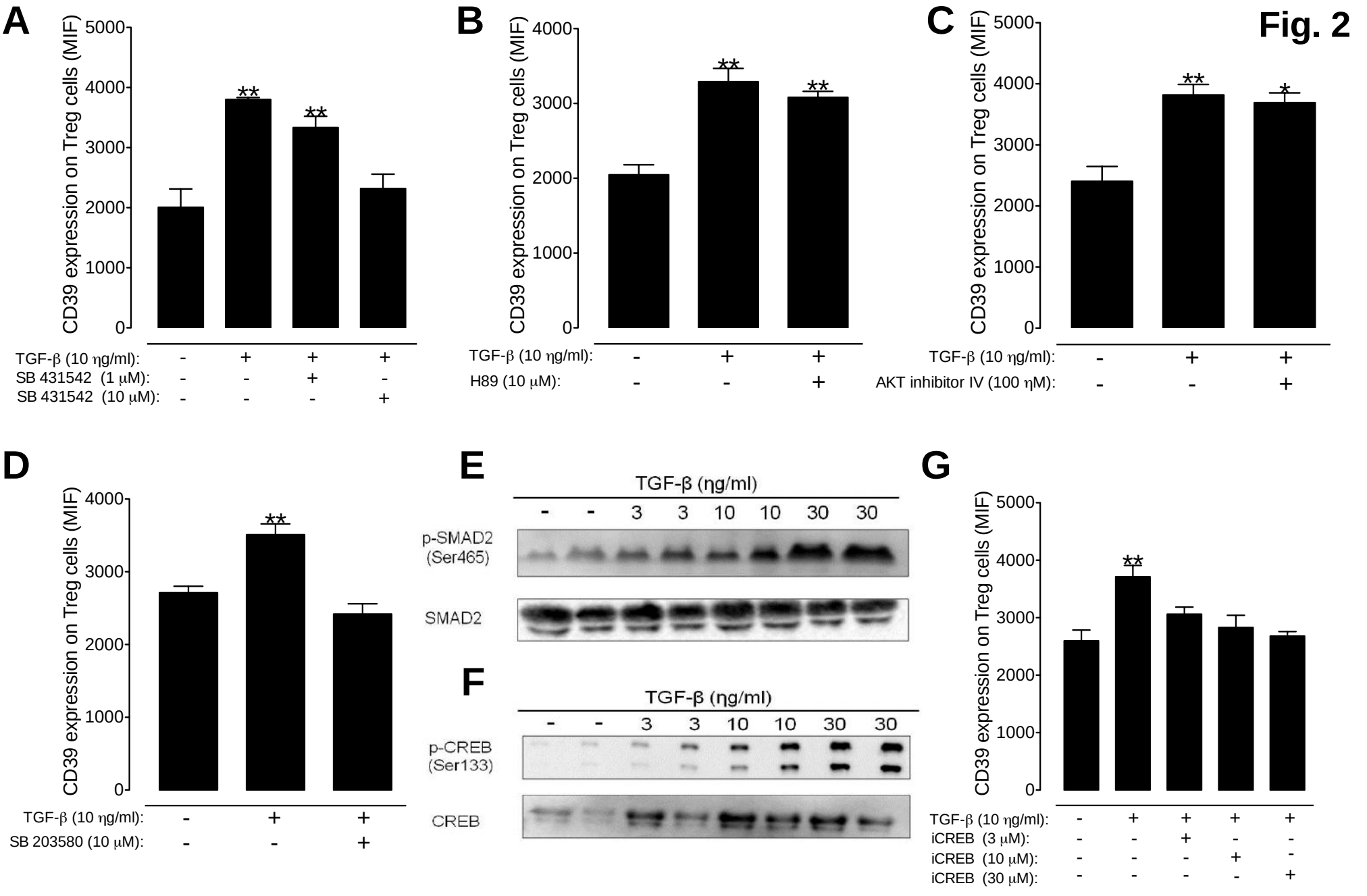


Fig. 2
A
CD39 expression on Treg cells (MIF)
5000
4000
3000
2000
1000
0
**
**
TGF-β (10 ηg/ml): - + + +
SB 431542 (1 μM): - - + -
SB 431542 (10 μM): - - - +
B
CD39 expression on Treg cells (MIF)
4000
3000
2000
1000
0
**
**
TGF-β (10 ηg/ml): - + +
H89 (10 μM): - - +
C
CD39 expression on Treg cells (MIF)
5000
4000
3000
2000
1000
0
**
*
TGF-β (10 ηg/ml): - + +
AKT inhibitor IV (100 ηM): - - +
D
CD39 expression on Treg cells (MIF)
4000
3000
2000
1000
0
**
TGF-β (10 ηg/ml): - + +
SB 203580 (10 μM): - - +
E
TGF-β (ηg/ml)
- - 3 3 10 10 30 30
p-SMAD2 (Ser465)
SMAD2
F
TGF-β (ηg/ml)
- - 3 3 10 10 30 30
p-CREB (Ser133)
CREB
G
CD39 expression on Treg cells (MIF)
5000
4000
3000
2000
1000
0
**
TGF-β (10 ηg/ml): - + + + +
iCREB (3 μM): - - + - -
iCREB (10 μM): - - - + -
iCREB (30 μM): - - - - +

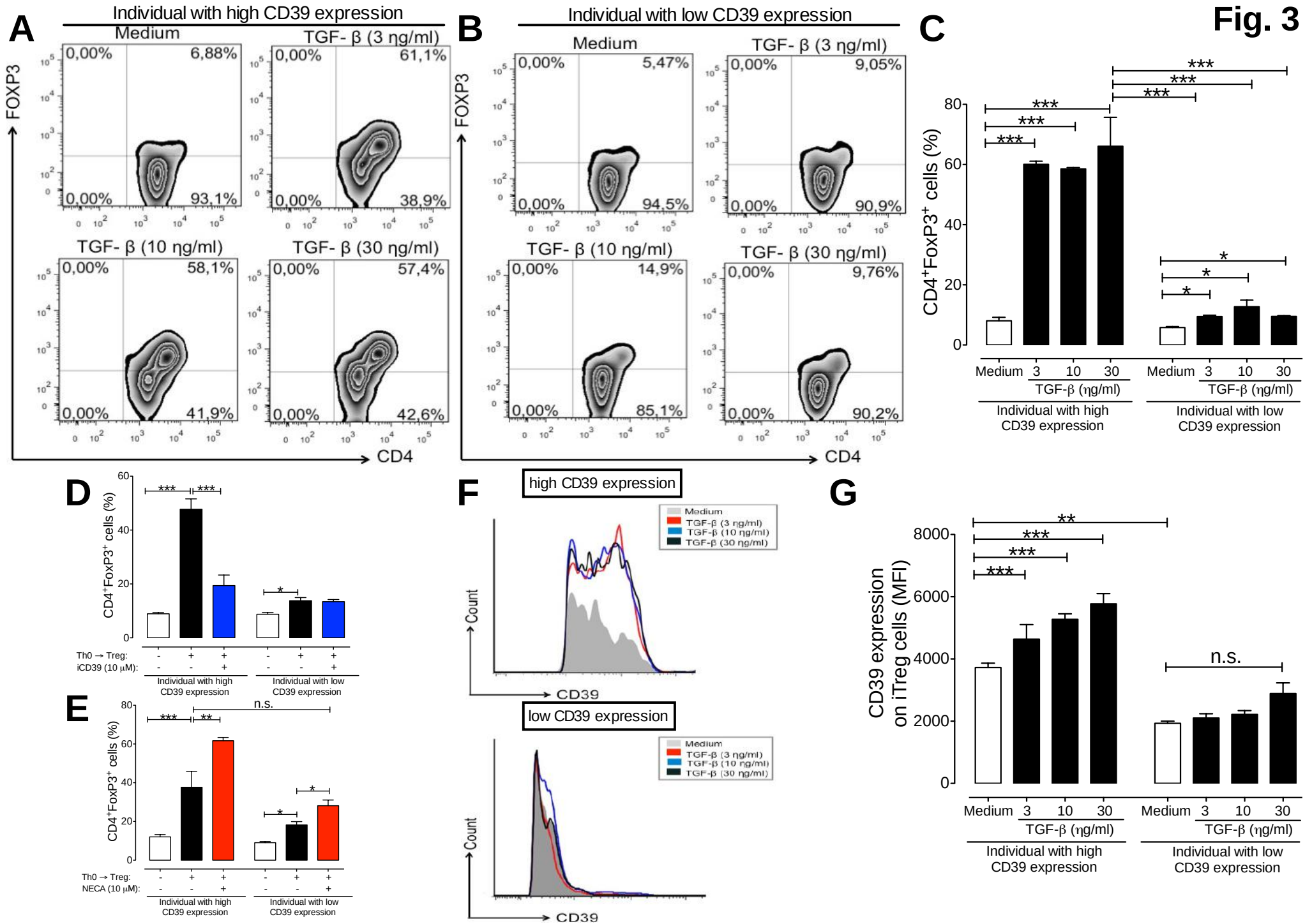
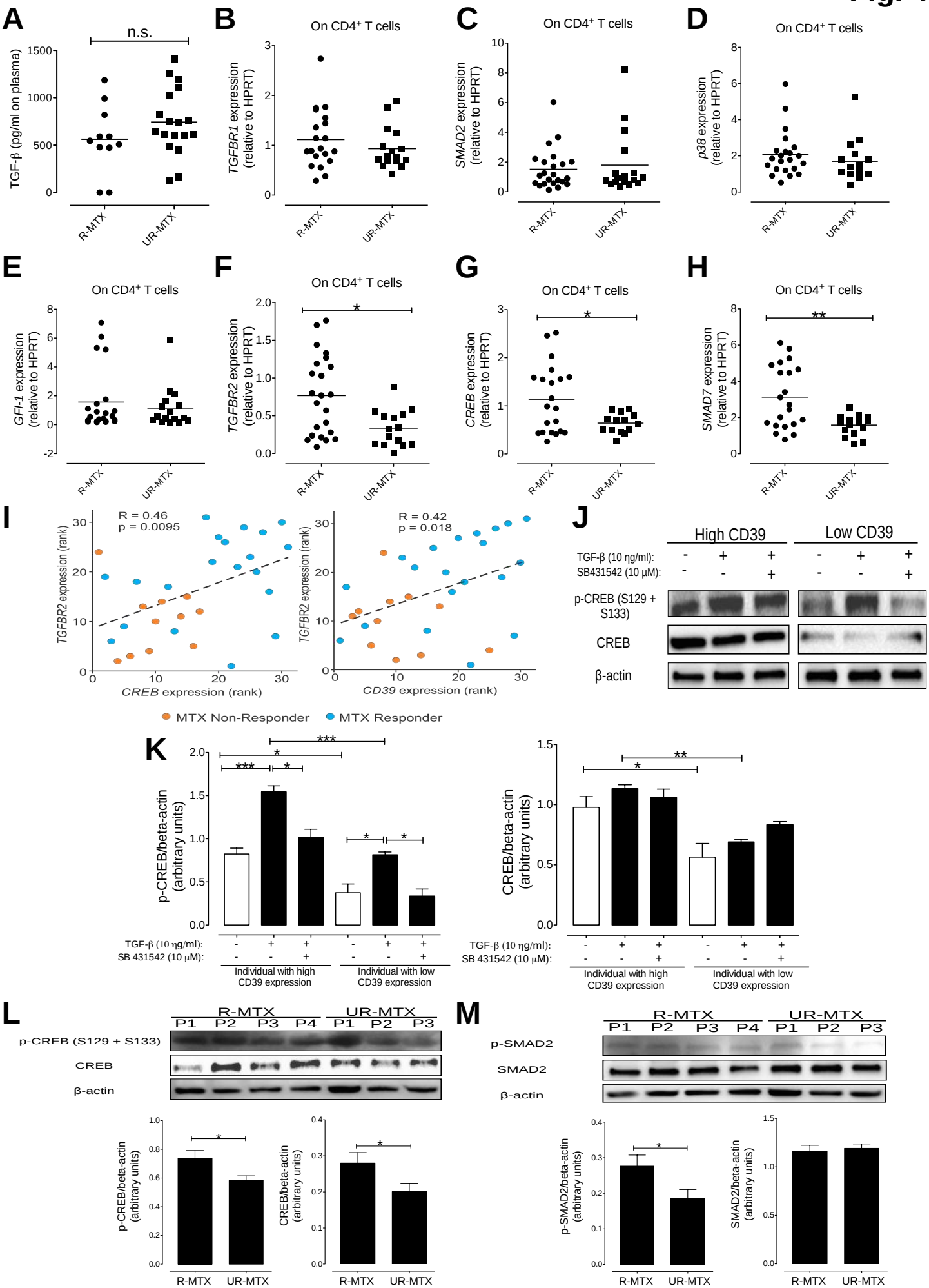


Fig. 3
A
Individual with high CD39 expression
Medium
TGF- β (3 ηg/ml)
TGF- β (10 ηg/ml)
TGF- β (30 ηg/ml)
0,00%
6,88%
93,1%
61,1%
38,9%
58,1%
41,9%
57,4%
42,6%
FOXP3
CD4
B
Individual with low CD39 expression
5,47%
94,5%
9,05%
90,9%
14,9%
85,1%
9,76%
90,2%
C
CD4+FoxP3+ cells (%)
Medium
3
10
30
TGF-β (ηg/ml)
Individual with high CD39 expression
Individual with low CD39 expression
D
Th0 → Treg:
iCD39 (10 μM):
E
n.s.
NECA (10 μM):
F
high CD39 expression
low CD39 expression
Medium
TGF-β (3 ηg/ml)
TGF-β (10 ηg/ml)
TGF-β (30 ηg/ml)
Count
CD39
G
CD39 expression on iTreg cells (MFI)

Fig. 4


A
n.s.
TGF-β (pg/ml on plasma)
R-MTX
UR-MTX
B
On CD4+ T cells
TGFBR1 expression (relative to HPRT)
C
On CD4+ T cells
SMAD2 expression (relative to HPRT)
D
On CD4+ T cells
p38 expression (relative to HPRT)
E
On CD4+ T cells
GFI-1 expression (relative to HPRT)
F
On CD4+ T cells
TGFBR2 expression (relative to HPRT)
G
On CD4+ T cells
CREB expression (relative to HPRT)
H
On CD4+ T cells
SMAD7 expression (relative to HPRT)
I
R = 0.46
p = 0.0095
TGFBR2 expression (rank)
CREB expression (rank)
R = 0.42
p = 0.018
CD39 expression (rank)
MTX Non-Responder
MTX Responder
J
High CD39
Low CD39
TGF-β (10 ng/ml):
SB431542 (10 μM):
p-CREB (S129 + S133)
CREB
β-actin
K
p-CREB/beta-actin (arbitrary units)
CREB/beta-actin (arbitrary units)
Individual with high CD39 expression
Individual with low CD39 expression
L
R-MTX
UR-MTX
P1 P2 P3 P4 P1 P2 P3
p-CREB (S129 + S133)
CREB
β-actin
p-CREB/beta-actin (arbitrary units)
CREB/beta-actin (arbitrary units)
M
p-SMAD2
SMAD2
β-actin
p-SMAD2/beta-actin (arbitrary units)
SMAD2/beta-actin (arbitrary units)

Supplementary Materials for

Impairment of TGF-β signalling accounts for lower CD39 expression on regulatory T cells associated with methotrexate resistance in rheumatoid arthritis

Raphael S. Peres, Paula B. Donate, Jhimmy Talbot, Nerry T. Cecilio, Rene D. Oliveira, Helder I. Nakaya, Thiago M. Cunha, José C. Alves-Filho, Foo Y. Liew, Paulo Louzada-Júnior*, Fernando Q. Cunha*

*Email addresses of the corresponding authors: plouzada@fmrp.usp.br; fdqcunha@fmrp.usp.br

Table of contents

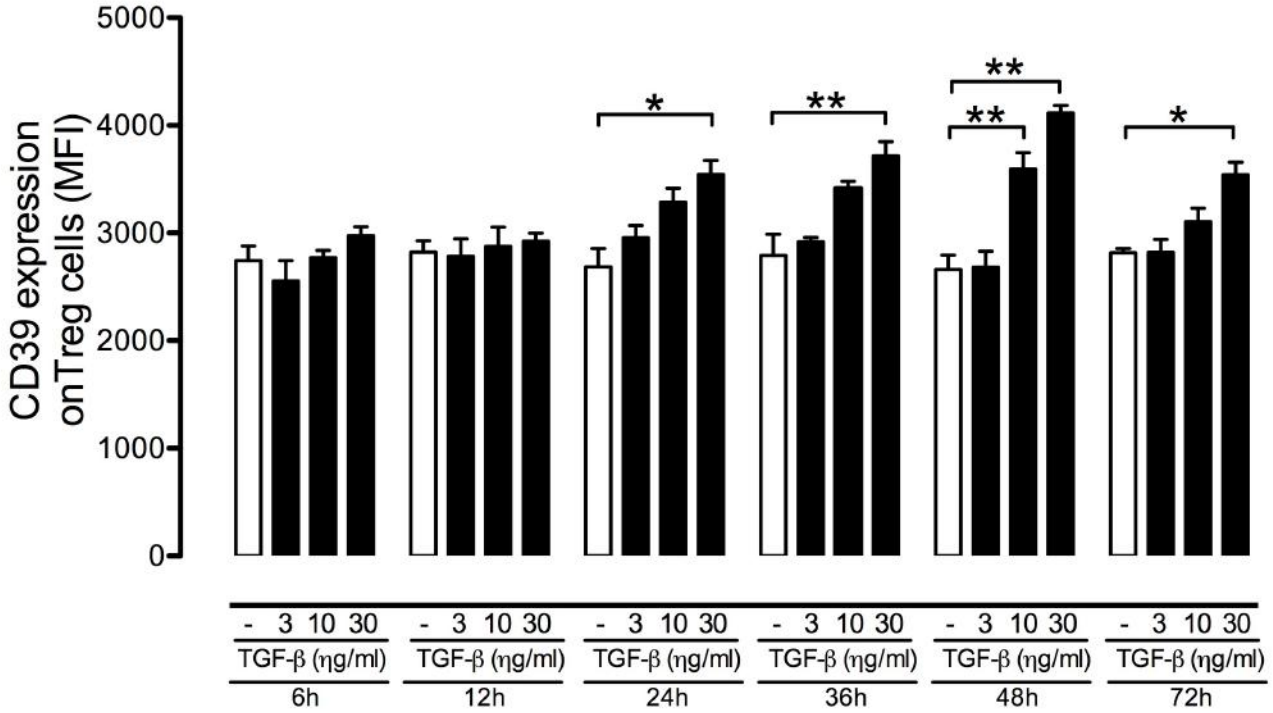
Supplementary Table 1	Clinical features from RA patients
Supplementary Figure 1	Time-course of induction of CD39 expression on Tregs cells by TGF-β stimulation
Supplementary Figure 2	TGF-β stimulation does not affect CD39 expression in other types of leucocytes

Table S1. Clinical features from RA patients

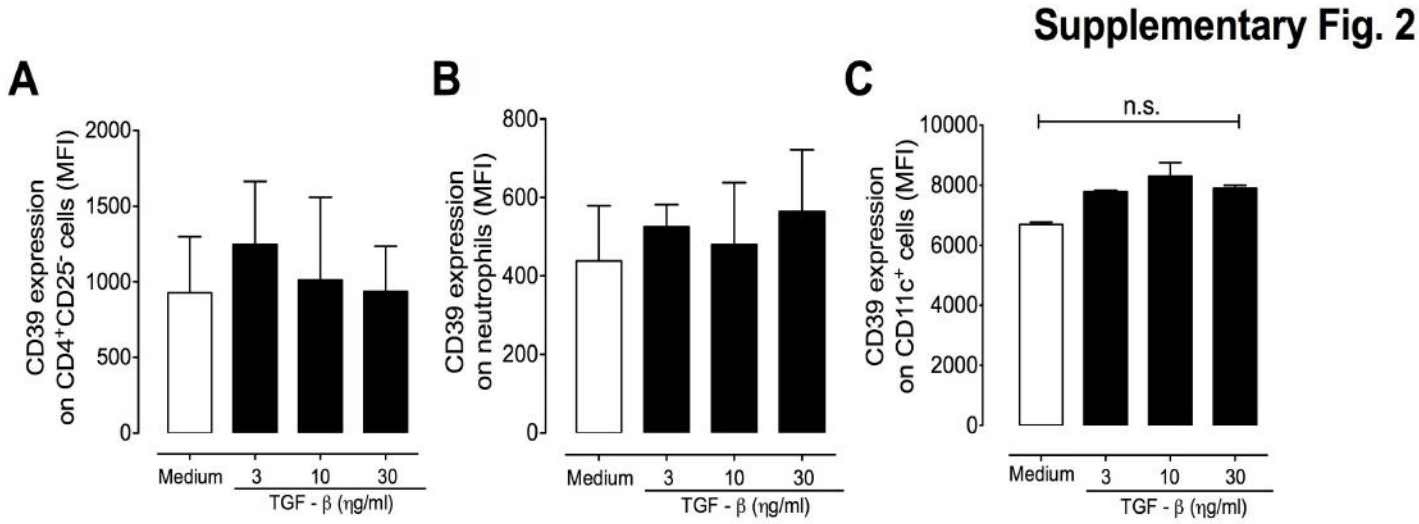
	RA patients			Healthy (n= 30)
	R-MTX (n = 50)	**UR-MTX (n = 38)**	**P**	
Mean of age (years)	56,0 ± 13,72	53,0 ± 16,38	NS[a]	37,6± 9,5
Woman (%)	88	80	NS[b]	66,7
Smoking (%)	30	44,7	NS[b]	23,3
Time of disease (months)	30,54 ± 23,42	32,29 ± 22,52	NS[a]	NA
FR-positive (%)	86	86,84	NS[b]	NA
ACPA-positive (%)	90	92,1	NS[b]	NA
DAS28 (mean ± SD)	2,31 ± 0,58	4,74 ± 1,32	$P < 0.01$[a]	NA
MTX (%)	100	100	NS[b]	NA

RF, rheumatoid factor; ACPA, anticitrullinated protein antibodies; DAS28, disease activity score; MTX, Methotrexate; R-MTX, responsive to MTX; UR-MTX, unresponsive to MTX; NA, not applicable; SD, standard deviation; NS, not significant; a, 2-sample exact test; b, Fisher's exact test

Supplementary Fig. 1



Supplementary Figure S1. Time-course of induction of CD39 expression on Tregs cells by TGF-β stimulation. Tregs cells were isolated from healthy donors (n = 5) and incubated with polyclonal stimulus in the presence or not of different concentrations of TGF-β (3 ηg/ml, 10 ηg/ml, 30 ηg/ml) at different times. The graph shows CD39 expression (MFI) on Tregs cells incubated with different TGF-β concentrations. *P <0.05. **P <0.01.



Supplementary Figure S2. TGF-β stimulation does not affect CD39 expression in other types of leucocytes. (A) CD39 expression (MFI) on effector T ($CD4^{+}CD25^{-}$, n = 4) incubated or not (medium) with different concentrations of TGF-β (3 ηg/ml, 10 ηg//ml, 30 ηg/ml) for 48 hours. (B) CD39 expression (MFI) on granulocytes incubated with different concentrations of TGF-β (3 ηg/ml, 10 ηg//ml, 30 ηg/ml) for 12h. (C) CD39 expression (MFI) of $CD11c^{+}$ cells (n = 4) incubated with different concentrations of TGF-β ((3 ηg/ml, 10 ηg//ml, 30 ηg/ml) for 48h. n.s. = Not significant.