Universidade de São Paulo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

**Eficácia terapêutica do Metotrexato na Artrite Reumatóide
depende da expressão de células T reguladoras CD39⁺?**

Raphael Sanches Peres

Ribeirão Preto

2012

Raphael Sanches Peres

**Eficácia terapêutica do Metotrexato na Artrite Reumatóide
depende da expressão de células T reguladoras CD39⁺?**

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

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando de Queiróz
Cunha

Ribeirão Preto

2012

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

Eficácia terapêutica do Metotrexato na Artrite Reumatóide depende da expressão de células T reguladoras CD39⁺? Ribeirão Preto, 2012.

129p.

Dissertação de mestrado 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 Queiróz Cunha

Palavras-chave: artrite reumatóide, autoimunidade, Tregs, adenosina, ectonucleotidases, metotrexato.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Raphael Sanches Peres

Eficácia terapêutica do Metotrexato na Artrite Reumatóide depende da expressão de células T reguladoras CD39⁺?

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

Área de Concentração: Imunologia

Aprovado em: 10 de maio de 2012

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Paulo Louzada Junior

Instituição: FMRP – USP Assinatura: _____

Prof. Dr. Luis Eduardo Coelho Andrade

Instituição: UNIFESP-EPM 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 do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

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.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiróz 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. Obrigado também por ter me dado a oportunidade de participar do seu renomado grupo de pesquisa.

À minha grande amiga e colaboradora Dra. Vanessa Carregaro, pelo grande auxílio na realização deste trabalho, pelo apoio e incentivo à prática da preparação de relatórios, resumos e manuscritos, e pela grande amizade.

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 dedicação e competência que foram de fundamental importância na realização deste trabalho. Obrigado pela amizade e apoio.

Ao grupo da artrite: Jhimmy, Larissa, Jaqueline, Rafael França e André Saraiva, pelo grande auxílio nos experimentos deste trabalho e pela amizade sincera.

Ao meu grande amigo Jhimmy, que além de contribuir muito para realização deste trabalho, foi um grande irmão para mim!

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: Paulinha, Paula Barbim, Fabiane, Guilherme, Rafael Poloni, Jozi, Fabrício, Gabriela, Thiago Garlet, Adriana, Daniele Nascimento, Daniel, Fernanda, Alexandre Kanashiro, Rangel, David, Andressa

Duarte, Andreza Urba, Flávia, Paulo, Maria Cláudia, Alexandre Lopes, Miriam, Cristina, Sabrina, Silvia, Spiller, Walter e Vanessa.

Aos técnicos de laboratório: Ana Katia, Giuliana, Diva, Ieda e Serginho pela responsabilidade, amizade, dedicação e alegria.

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

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, pelos seus ensinamentos e colaboração para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira, pela colaboração e exemplo de dedicação a ciência.

À Profa. Dra. Regina Helena Queiroz e Flávia Ferreira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, pelo auxílio nas dosagens de adenosina.

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

Aos queridos amigos Diego, Bruno Trindade, Kalil, Rafael, Tiago Medina e Manuela, pela grande amizade e momentos de descontração.

À minha segunda família, amigos e companheiros de república da UNESP-Botucatu.

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

Ao CNPq pelo auxílio financeiro 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. **Eficácia terapêutica do Metotrexato na Artrite Reumatóide depende da expressão de células T reguladoras CD39⁺?** Dissertação de Mestrado – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

Introdução: Artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune caracterizada por uma inflamação crônica das articulações. A estratégia terapêutica mais utilizada na AR consiste no uso de doses baixas de Metotrexato (MTX), um antagonista do folato, que promove a manutenção de altos níveis de adenosina (ADO) extracelular. No entanto, uma parte considerável dos pacientes é refratária ao tratamento com MTX e o mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre ainda não é estabelecido. Estudos demonstram que células Tregs expressam em suas superfícies as ectonucleotidases CD39/ENTPD1 e CD73/ecto-5 'nucleotidase, enzimas que geram ADO através da degradação de ATP. Estes achados, associados ao fato que a ADO possui potente atividade imunomoduladora, sugere que a atividade antiinflamatória do MTX está relacionada com os efeitos das Tregs. **Objetivos:** Investigar se os mecanismos de refratariedade ao MTX em pacientes com AR podem estar relacionados com uma deficiência na atividade bioquímica e função supressora de células Tregs, focando principalmente na expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73. **Pacientes e Métodos:** No presente estudo, amostras do sangue periférico de pacientes com AR (n= 89) e doadores saudáveis (n =16) foram coletadas. Por citometria de fluxo, as populações leucocitárias de PBMC foram fenotipadas para a avaliação da expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 nos diferentes tipos celulares. A atividade das ectonucleotidases em células TCD4⁺ na geração de ADO extracelular foi avaliada por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e ensaios colorimétricos de Verde Malaquita. **Resultados:** Citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α presentes no plasma e a frequência de células TCD4⁺ produtoras de IL-17 e IFN- γ estavam significativamente aumentadas em pacientes não responsivos ao MTX (UR-MTX; DAS28- 5,87 $\pm$ 0,52; média de idade- 54,7 anos) quando comparadas com pacientes responsivos (R-MTX; DAS28- 2,23 $\pm$ 0,57; média de idade- 52,6 anos) e indivíduos saudáveis (IS). Na caracterização fenotípica dos leucócitos de PBMC, não houve diferença na porcentagem de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, células B e células dendríticas entre os grupos analisados. No entanto, observamos um aumento significativo na porcentagem de células Tregs (CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺) em pacientes R-MTX. De maneira interessante, enquanto que a porcentagem de células Tregs expressando CD73 não estava alterada, observou-se um aumento da frequência desta população celular expressando

CD39 em pacientes R-MTX. Adicionalmente, a ADO extracelular presente no sobrenadante de células Tregs de pacientes UR-MTX estava reduzida quando comparada aos outros grupos, visto que esse grupo de pacientes também apresenta uma expressão reduzida de CD39 na superfície das Tregs. **Conclusão:** Em conjunto estes resultados demonstram que a refratariedade de pacientes ao MTX é associada com o número e funções das Tregs, especialmente na geração de ADO extracelular. Esses achados podem gerar novas perspectivas em intervenções terapêuticas para tratamento da AR, proporcionando avanços na escolha de drogas rotineiramente utilizadas para tratar a doença.

Palavras-chave: artrite reumatóide, autoimunidade, Tregs, adenosina, ectonucleotidases, Metotrexato.

ABSTRACT

PERES, RS. **Therapeutic efficacy of Methotrexate in Rheumatoid Arthritis depends of regulatory T cells CD39⁺ expression?** Thesis (Master) – Department of Pharmacology of the School of Medicine of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP.

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterized by chronic inflammation of the joints. The most commonly used therapeutic approach in RA involves the use of low doses of Methotrexate (MTX), a folate antagonist which promotes the maintenance of high levels of adenosine (ADO) extracellular. However, a considerable part of patients is refractory to MTX treatment and the mechanism by which this phenomenon occurs is not yet established. Studies have demonstrated that cells expressing ectonucleotidases CD39/ENTPD1 e CD73/ecto-5 'nucleotidase on their surface, enzymes that generate ADO through ATP degradation. These findings, together with the fact that the ADO has potent immunomodulatory activity, suggest that the anti-inflammatory activity of MTX is related to Tregs effects. **Objectives:** To investigate if the mechanisms of resistance to MTX in RA patients might be related to a deficiency in biochemical activity and suppressive function of Tregs cells, focusing mainly on CD39 and CD73 expression. **Patients and Methods:** In this study, samples of peripheral blood from RA patients (n = 89) and healthy donors (n = 16) were collected. By flow cytometry, the leukocyte populations of PBMC were phenotyped for the evaluation CD39 and CD73 expression on different cell types. The activity of ectonucleotidases in CD4⁺ T cells og extracellular ADO generation was assessed by high performance liquid chromatography (HPLC) and colorimetric Malaquite Green assays. **Results:** Inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α present on plasma and the frequency of CD4⁺ T cells producing IL-17 and IFN- γ were significantly increased in unresponsive patients (UR-MTX; DAS28- 5.87 $\pm$ 0.52; mean age, 54.7 years) compared with responsive patients (R-MTX; DAS28- 2.23 $\pm$ 0.57, mean age, 52.6 years) and healthy subjects (IS). Phenotypic characterization of leukocytes on PBMC, there was no difference in the percentage of CD4⁺T, CD8⁺T, B cells and dendritic cells between groups. However, we observed a significant increase in the percentage of Treg cells (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) in R-MTX patients. Interestingly, while CD73 expression was found not changed, the percentage of Tregs cells expressing CD39 was increased in R-MTX patients. Additionally, the dosage of extracellular ADO in the supernatant of Tregs cells from patients UR-MTX was lower compared to other groups, since this group of patients presents a reduced CD39 expression on Tregs surface. **Conclusions:** Together these results show that unresponsiveness to MTX is related to

the number and function of Treg, especially in the generation of extracellular ADO. These findings can generate new perspectives for therapeutic interventions to attenuate the inflammatory process of RA and provide advances in the selection of drugs routinely used to treat the disease.

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 proteínas citrulinadas

APC: célula apresentadora de antígeno

AR: artrite reumatóide

ATP: adenosina trifosfato

CIA: artrite induzida por colágeno do tipo II

DAS28: índice de atividade da doença baseada em 28 articulações

DCs: células dendríticas

DMARD: droga anti reumática modificadora da doença

DNA: ácido desoxirribonucleico

EAE: encefalomielite autoimune experimental

ELISA: ensaio imunoenzimático

ENTP1: ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1

EULAR: Liga Européia contra Reumatismos

FoxP3: forkhead box P3

FR: fator reumatóide

g: grama (s)

h: hora

HPLC: cromatografia líquida de alta performance

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IFN: interferon

Ig: imunoglobulina

IL: interleucina

IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1

IS: indivíduos saudáveis

Kg: kilograma (s)

L: litro (s)

LPS: lipopolissacarídeo

mg: miligrama (s)

min: minuto (s)

µg: micrograma (s)

µL: microlitro (s)

mL: mililitro (s)

MMP: metaloproteinases

MTX: Metotrexato

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintase

NSAID: antiinflamatório não esteroidal

OPD: ortofenilenodiamino

PBMC: células mononucleares do sangue periférico

PBS: tampão salina fosfato

Pi: fosfato inorgânico

RANTES: citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais

R-MTX: responsivo ao tratamento com MTX

RNA: ácido ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

ROS: espécies reativas de oxigênio

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

TCR: receptor de células T

Th: T auxiliar (*helper*)

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

Tregs: células T reguladoras

UR-MTX: não responsivo ao tratamento com MTX

VHS: valor da velocidade de hemossedimentação

SÚMARIO

1. Introdução.....	22
1.1 Artrite Reumatóide (AR).....	23
1.2 Critérios para classificação diagnóstica da AR.....	24
1.3 DAS28 (índice de atividade da doença).....	27
1.4 Patogênese da AR.....	28
1.4.1 Papel das citocinas na AR.....	31
1.4.2 Linfócitos Th17 na AR.....	32
1.4.3 Células Tregs na AR.....	35
1.5 Estratégias terapêuticas para AR.....	37
2. Objetivos.....	48
3. Material e Métodos.....	50
3.1 Pacientes e indivíduos controles.....	51
3.2 Obtenção de leucócitos do sangue periférico dos pacientes.....	54
3.3 Fenotipagem celular por citometria de fluxo.....	54
3.4 Avaliação da produção de citocinas intracelulares.....	55
3.5 Dosagens de citocinas por ELISA.....	55
3.6 Extração de RNA e avaliação da expressão dos receptores A2a e A2b por RT-PCR.....	56
3.7 Separação das sub-populações de células T.....	57
3.8.1 Análise da atividade ATPase das células CD4 ⁺ CD39 ⁺ por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).....	57
3.8.2 Análise da atividade ATPase das células CD4 ⁺ CD39 ⁺ pelo de ensaio de verde malaquita.....	58
3.9 Análise estatística.....	58
4. Resultados.....	59

5. Discussão.....	81
6. Conclusão.....	88
7. Referências Bibliográficas.....	90
8. Anexos.....	100

1- INTRODUÇÃO

1.1 Artrite reumatóide (AR)

A artrite reumatóide (AR) é uma doença inflamatória crônica de caráter autoimune que afeta cerca de 1-2% da população mundial (Lubberts, 2008). Estudos epidemiológicos demonstram que a incidência da doença predomina entre 35-65 anos e afeta três vezes mais mulheres do que homens (Symmons et al., 1994). Em coorte retrospectivo realizado em quatro hospitais universitários do Estado de São Paulo, a maioria dos pacientes em tratamento encontrava-se entre 30 e 60 anos, sendo a relação entre mulher e homem de 5:1 (Louzada-Junior et al., 2007). Além de reduzir a qualidade, a AR também leva a redução da expectativa de vida (Riise et al., 2001). Os eventos cardiovasculares causados pela doença aparecem como a principal causa de morte (Wallberg-Jonsson et al., 1997; Dessein et al., 2005). A AR tem um alto impacto sócio-econômico, pois com a progressão da doença, os pacientes afetados desenvolvem restrição para desenvolver as atividades diárias básicas e profissionais, com impacto significativo na qualidade de vida do paciente, o que acarreta perdas econômicas individuais e ao sistema de saúde (Silman, 2002; Kobayashi, 2008).

A AR é uma poliartrite crônica e simétrica, ou seja, envolve uma variedade de pequenas e grandes articulações, embora nas fases iniciais da doença apenas uma ou poucas articulações possam ser atingidas, praticamente todas as articulações periféricas podem ser afetadas, no entanto, as articulações mais comumente envolvidas são as das mãos, pés e joelhos, sendo as articulações interfalangeanas distais geralmente poupadas (Smolen et al., 1995). A AR também pode afetar a coluna vertebral, com acometimento da articulação atlanto-axial em pacientes que possuam a enfermidade em atividade por longos períodos (Lodder et al., 2003).

Na maioria dos pacientes as manifestações clínicas da AR são bem definidas, constituindo-se principalmente de alterações músculo-esqueléticas. Porém, alguns pacientes sofrem das manifestações extra-articulares e, praticamente todos,

experimentam algum sintoma geral inespecífico, tais como fadiga, astenia, hiporexia, febre baixa e mialgias (Brasington, 2003).

1.2 Critérios para classificação diagnóstica da AR

Até setembro de 2010, o diagnóstico de AR era feito utilizando-se 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 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* 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 pósterio-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 artrite reumatóide se tiver no mínimo 4 dos critérios acima. Os primeiros quatro devem estar presentes por no mínimo 6 semanas.

Em significativa parcela dos indivíduos que desenvolvem sintomas articulares inflamatórios não é possível o diagnóstico nos primeiros três meses de doença. Nesse sentido, as sociedades internacionais de maior importância na reumatologia (EULAR – *European League Against Rheumatism* e ACR) elaboraram novos critérios para o diagnóstico de AR, visando diminuir o tempo para o diagnóstico e a rápida instituição da terapêutica (Tabela 2).

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

<i>Envolvimento articular</i>	
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
<i>Sorologia</i>	
FR ou anti-CCP negativo	0
FR ou anti-CCP baixos títulos (não maior que 3 vezes limite superior)	1
FR ou anti-CCP altos títulos	3
<i>Duração da sinovite</i>	
Menor que 6 semanas	0
Maior que 6 semanas	1
<i>Reagentes de fase aguda</i>	
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	

O fator reumatóide (FR) consiste no autoanticorpo clássico da AR, que é caracterizado pelas classes IgM, IgA ou IgG contra a porção Fc de uma IgG humana, sendo a classe IgM a que se detecta sorologicamente com maior frequência (Burek & Rose, 1995). O FR reage com os anticorpos produzidos nas articulações sinoviais, produzindo imunocomplexos 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, porém em títulos baixos (Habash-Bseiso et al., 2005; Harty & Veale, 2010). Em adição, o tabagismo tem sido sugerido como um importante fator externo associado com altos títulos de FR (Heliovaara et al., 1993).

Outro autoanticorpo importante no diagnóstico da AR é o direcionado contra peptídeos citrulinados (anti-CCP). A citrulinização ocorre por meio de reações bioquímicas envolvidas com a modificação pós-traducional de determinada proteína, na qual um resíduo de arginina é convertido em citrulina. Esse processo é catalisado pela enzima peptidil arginina deiminase (PAD) e neutraliza o caráter fortemente básico da arginina. Os anticorpos anti-CCP são produzidos localmente por células B presentes na membrana sinovial inflamada e no líquido sinovial de pacientes com AR (Kinloch et al., 2008; Reparon-Schuijt et al., 2001) e são capazes de reagir com diversos peptídios citrulinados (Alessandri et al., 2008). Embora a maioria dos pacientes anti-CCP positivos também apresentem fator reumatóide positivo, os anticorpos anti-CCP 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, anti-CCP, ou ambos (Bridges Jr & Davidson, 2005; Masson-Bassieri et al., 2001; Vossenaar et al., 2004). Indivíduos com AR e que apresentam FR e anti-CCP positivos diferem dos indivíduos com autoanticorpos ausentes, pois apresentam doença mais grave, com maior índice de destruição articular e pior resposta à terapia convencional (Kastibom et al., 2004; Forslindt et al., 2004). A sensibilidade dos anticorpos anti-CCP é a mesma tanto em pacientes com AR inicial quanto em pacientes com a doença estabelecida.

1.3 DAS28 (Índice de Atividade da Doença)

Com objetivo de simplificar a classificação da atividade da doença, critérios de classificação da atividade foram criados pelo Colégio Americano de Reumatologia e pela Liga Européia contra o Reumatismo (EULAR), como o escore clínico DAS28, índice baseado em 28 articulações (ombros, cotovelos, punhos, metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais e joelhos, bilateralmente), calculado através da avaliação de quatro parâmetros clínicos: 1-número de articulações dolorosas (NAD28), 2-número de articulações edemaciadas (NAE28), 3-valor da velocidade de hemossedimentação (VHS), 4- avaliação global de saúde pelo paciente (AGS) – obtida por uma escala visual analógica (EVA). A seguinte fórmula é empregada para este cálculo:

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

Com os valores obtidos através da fórmula, a atividade da doença é designada do seguinte modo: $\leq 2,6$ -remissão, $\leq 3,2$ -baixa, $\leq 5,1$ -moderada, $>5,1$ -alta. Assim, a utilização destes critérios, como o DAS28, possibilitou a otimização do tratamento da doença, visto que avaliações periódicas da resposta clínica dos pacientes são necessárias para a determinação da estratégia terapêutica indicada. Além disso, em virtude da natureza da AR, nenhum parâmetro clínico ou laboratorial, isoladamente, é capaz de traduzir, de forma satisfatória, o nível de atividade da doença em um determinado momento.

Atualmente, o DAS28 é um dos índices mais utilizados na determinação da atividade da AR, pois além de proporcionar uma avaliação satisfatória da atividade da doença, sua praticidade na determinação dos parâmetros clínicos também propicia uma avaliação mais rápida pelos reumatologistas.

1.4 Patogênese da AR

A AR é uma doença inflamatória crônica consequente de uma resposta imune exacerbada contra antígenos de tecidos próprios (Rose, 1993). Em outras palavras, o

sistema imunológico ataca moléculas do próprio organismo, não as reconhecendo como próprias, mas sim como corpos estranhos ou patógenos (autoantígenos). A AR é caracterizada por intenso infiltrado inflamatório presente na membrana sinovial identificado por um afluxo transendotelial e/ou locais de ativação de uma variedade de células mononucleares, como células T, células B, células plasmáticas, células dendríticas, macrófagos, mastócitos, bem como pela formação de novos vasos. O infiltrado leucitário pode ser difuso ou, comumente, formado por estruturas do tipo folicular-linfóide. A camada de revestimento torna-se hiperplásica (espessura de >20 células) e a membrana sinovial se expande formando vilosidades, porção chamada de “pannus”. Com o avanço da doença, há uma destruição gradual do tecido cartilaginoso e ósseo (Goldring, 2003), que ocorre principalmente devido à ativação da população celular de osteoclastos, os quais provocam danos teciduais através da liberação de enzimas degradativas, como metaloproteinases, serino proteases e agrecanases (Firestein, 2003; Harris et al., 1990).

Na AR ainda não há um consenso de qual autoantígeno seria crítico para o desenvolvimento do processo autoimune, porém trabalhos afirmam que a autoimunidade presente na AR está relacionada ao reconhecimento específico de proteínas citrulinadas, visto que autoanticorpos contra essas proteínas estão presentes em aproximadamente 70% dos pacientes com AR (Nishimura et al., 2007). Com base em outros estudos clínicos e também em modelos experimentais de AR, outros autoantígenos também são sugeridos como desencadeadores ou participantes do processo autoimune presente na AR, como o colágeno tipo II, fator reumatóide e a proteína de cartilagem GP39 (Trentham et al., 1993; Rantapää-Dahlqvist et al., 2003; Baeten et al., 2007).

Para o desencadeamento deste fenômeno autoimune, é proposta a necessidade de uma interação complexa entre fatores ambientais e genéticos de susceptibilidade a doença. Vários *loci* genéticos tem sido propostos por ter

associações com a susceptibilidade e gravidade da AR. A associação da prevalência da doença com os alelos HLA-DR4 e HLA-DRB1 é bem estabelecida (Fugger & Svejgaard, 2000). Polimorfismos em outros *loci*, que codificam as proteínas PTPN22, PADI4, CTLA-4, citocinas, como TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IL-18, e outros receptores, como o receptor de hidrocarbonetos arila (Ahr), recentemente descrito pelo nosso grupo, têm sido relacionados com desenvolvimento e/ou prognóstico da doença (van der Helm-van et al., 2005; McInnes & Schett, 2007; Talbot et al., manuscrito em preparação). Além disso, foi demonstrada uma forte associação entre os alelos HLA-DRB1 e o desenvolvimento de autoanticorpos contra antígenos de proteínas citrulinadas (Imboden, 2009).

Inúmeros fatores ambientais têm sido apontados como fatores de risco para o desenvolvimento da AR, dentre eles se destaca o tabagismo (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., 2008). Além disso, estudos epidemiológicos descrevem que o risco de desenvolvimento de AR em indivíduos fumantes é maior do que pessoas que não fumam, sendo mais prevalente em homens (Heliovaara et al., 1993; Stolt et al., 2003). Porém, os possíveis mecanismos pelo quais estes compostos podem estar ativando o sistema imunológico e induzindo doenças autoimunes ainda não está totalmente descrito. Adicionalmente, algumas infecções virais e bacterianas também são descritas como fatores de risco para o surgimento da doença, como em indivíduos acometidos pela infecção da bactéria *Porphyromonas gingivalis*, agente etiológico da doença periodontal em humanos que foi descrita também recentemente pelo nosso grupo de pesquisa (Dissick et al., 2010; Aquino et al., manuscrito em preparação).

Em contrapartida, alguns fatores ambientais também têm sido associados com um papel protetor para o desenvolvimento da AR. Níveis hormonais exacerbados

relacionados com a utilização de métodos contraceptivos orais determinam um risco menor de manifestação de AR, observado em mulheres que fazem uso contínuo de pílulas anticoncepcionais (Doran et al., 2004), e ainda é sugerida a associação da menopausa com o aparecimento da doença, reforçando os dados de prevalência da AR em mulheres nesta etapa da vida (Pikwer et al., 2009). O consumo de álcool com moderação também é observado como um fator protetor na AR, porém ainda não há uma explicação biológica plausível para compreender o efeito do álcool na doença (Jonsson et al., 2007).

1.4.1- Papel das citocinas na AR

Encontra-se bem aceito na literatura que citocinas inflamatórias, como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6 , promovem a indução da expressão de outras citocinas, de quimiocinas e enzimas degradativas responsáveis pelas lesões articulares verificadas na AR (Arend & Dayer, 1995). Mais especificamente a $\text{IL-1}\beta$, promove a amplificação do processo inflamatório pela indução da produção de IL-6 (Tan, 1999), RANKL e quimiocinas como MCP-1 (CCL2) e IL-8 (Goldring et al., 2002; deMarco et al., 1990), além de ativar condrócitos por vias dependentes de MAP quinases (Geng et al., 1996). Em modelos murinos de artrite induzida por colágeno do tipo 2 ou proteoglicana, o uso do antagonista do receptor de IL-1 leva a uma diminuição do infiltrado celular inflamatório, principalmente de polimorfonucleares, e confere proteção contra lesão articular (Arner et al., 1995; Kim et al., 2003; Joosten et al., 2008; Dinarello, 2000). Dados estes que confirmam o papel das citocinas nos mecanismos inflamatórios característicos da AR.

O $\text{TNF-}\alpha$ é outra citocina participante nos processos inflamatórios envolvidos na AR, esta citocina promove a migração de leucócitos para o sítio inflamatório devido a sua capacidade de induzir o aumento da expressão de moléculas de adesão em células do sistema imune e endoteliais, além de induzir aumento da permeabilidade vascular facilitando a saída de leucócitos da circulação (Sasaki et al., 2003). Além

disso, trabalhos descrevem a importância do TNF- α na indução da produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e fatores quimiotáticos (IL-8, MCP-1) por células presentes no foco inflamatório (van den Berg et al., 1999; McKay, 2000; Zwerina et al, 2007; Mueller et.al., 2010). Adicionalmente, dados clínicos em pacientes com AR revelam níveis elevados de TNF- α nas articulações combinados também com um aumento nos níveis séricos quando comparados com indivíduos saudáveis (Choy et al., 2001).

A IL-6 é também uma citocina importante nos fenômenos de lesão articular, a qual pode ter sua produção induzida pelo TNF- α e IL-1 β , sendo capaz de ativar macrófagos e osteoclastos (Axmann et al., 2009; Mussachio et al., 2009). Além do mais, dados da literatura mostram que camundongos deficientes para a IL-6 têm menor susceptibilidade para o desenvolvimento de doenças autoimunes experimentais como encefalomielite autoimune experimental (EAE) e artrite induzida por colágeno (CIA) (Okuda, 1998; Alonzi, 1998).

O papel das citocinas na AR não se restringe à lesão articular, mas está também relacionado com o processo de geração da resposta autoimune. Estudos demonstram que o desequilíbrio de citocinas pró e antiinflamatórias possuem um papel central no desencadeamento do fenômeno autoimune da AR. A tendência pronunciada para exacerbação espontânea e remissão da AR sugere que haja um balanço entre fatores regulatórios positivos e negativos (Petri, 1989). Dois tipos de linfócitos T CD4⁺ têm sido associados com este balanço da resposta imune: os linfócitos Th17 (auxiliadores, pró inflamatórios) e os linfócitos “T reguladores” (Tregs, supressores) (Boissier et al., 2008).

1.4.2- Linfócitos Th17 na AR

As células T *helper* CD4⁺ produtoras de IL-17, denominadas Th17 (Infante-Duarte et al., 2000), constituem a principal população celular envolvida com o

desencadeamento da inflamação e a quebra da autotolerância presente na AR. A descoberta dos linfócitos Th17 veio com o achado de que camundongos deficientes da subunidade p40 de IL-12 são resistentes à indução de doenças autoimunes órgão-específicas, como a EAE (Cua et al., 2003), uma doença até então considerada como dependente de resposta imune celular de padrão Th1. Visto que a IL-12 é necessária para a diferenciação de células Th1, este dado foi considerado contraditório. No entanto, a subunidade p40 da IL-12 é compartilhada por outra citocina, a IL-23. As duas são heterodiméricas, sendo que a IL-12 é constituída das subunidades p40 e p35, enquanto a IL-23 das subunidades p40 e p19. Considerando que a IL-23 é uma importante citocina que sinaliza para a produção de IL-17, a ausência de IL-17 poderia explicar a maior resistência a EAE em animais deficientes de p40. Adicionalmente, camundongos deficientes de p19 não produzem IL-17 e são resistentes à indução de EAE e AR induzida por colágeno (Cua et al., 2003; Langrish et al., 2005). Estes resultados mostraram que as células Th1 não eram as responsáveis pela indução da doença, no entanto, a produção de IL-17 foi essencial para o desencadeamento de EAE. Esta população de células produtoras de IL-17 passou a ser chamada de Th17.

Com base em trabalhos publicados nos últimos anos, é demonstrado que células Th17 desempenham um papel crítico na patogênese e perpetuação de diversas doenças autoimunes, dentre elas destacamos a AR, encefalite autoimune experimental (EAE), vasculite autoimune, psoríase, colite, entre outras (Bettelli et al., 2008). Com relação a AR, evidências suportam que altos níveis de IL-17 são encontrados na sinóvia de pacientes artríticos (Hwang et al., 2005; Kotake et al., 1999). Patologicamente esta citocina pode ativar e amplificar todos os mecanismos relacionados com a injúria tecidual os quais tem sido descritos na AR. Em particular, a IL-17 pode aumentar e/ou sinergizar com os mediadores inflamatórios presentes no local da inflamação, tais como: IL-6, IL-1 β e TNF- α (Chabaud et al., 1998; Katz et al., 2001; Le Grand et al., 2001); pró-oxidantes como óxido nítrico (Lubberts et al., 2000)

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., 2001; 2000). A IL-17 também estimula fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e macrófagos a produzirem quimiocinas RANTES, GM-CSF, IL-1, IL-6, ICAM-1, PGE₂, metaloproteinases, NOS-2, dentre outros mediadores que também estão envolvidos com a migração neutrofílica. Além disso, a IL-17 induz a expressão de RANKL, o qual é crucial para diferenciação de osteoclastos funcionais resultando em reabsorção óssea. Assim, intervenções farmacológicas que reduzam ou bloqueiam a produção e/ou liberação de IL-17 pode apresentar um alvo com potencial efeito terapêutico para o tratamento da AR.

Com relação à AR, os linfócitos T representam a maior proporção das células inflamatórias presentes no tecido sinovial e inúmeras evidências suportam que a ativação e migração de linfócitos Th17 para o compartimento articular são supostamente fundamentais para os danos teciduais desta condição inflamatória (Bettelli et al., 2008). Dessa forma, estudos nos quais utilizam fatores solúveis e/ou mecanismos celulares que bloqueiam ou suprimem seletivamente as células efectoras, principalmente células Th17, podem representar um particular interesse numa tentativa de conter as lesões teciduais observadas em diversas doenças autoimunes, aqui representadas pela AR.

Além dos linfócitos T, os linfócitos B também desempenham um papel importante na iniciação e perpetuação do processo inflamatório presente na AR (Wang et al., 2011). Na membrana sinovial inflamada de pacientes acometidos há numerosas células B, organizadas em pseudofolículos nodulares, similares a centros germinativos (Weyand et al., 2003), envolvidas na apresentação de antígenos para células T e com a produção de anticorpos contra autoantígenos, como anticorpos anti-CCP e o fator reumatóide (Nozaki et al., 2010), que contribuem diretamente e indiretamente na

patogênese da AR através da formação de imunocomplexos e fixação do complemento na articulação (Steiner, 2007).

1.4.3- Células Tregs na AR

As células T reguladoras (Tregs) são células capazes de suprimir a resposta de células inflamatórias, controlando desta forma, processos inflamatórios. As Tregs naturais constituem uma população homogênea derivada do timo (Suri-Payer et al., 1998), que necessitam da ativação via TCR para se tornarem supressoras (Piccirilo et al., 2003; Thornton et al., 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 (Piccirilo et al., 2003; Thornton et al., 2000; Dieckman et al., 2000; Levings et al., 2002), embora haja evidências de regulação antígeno específica (Nishimura et al., 2004; Tanchot et al., 2004; Belkaid et al., 2005). 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 Tregs, sendo que a IL-2 é essencial para sua sobrevivência e manutenção nos sítios periféricos (Powrie, 2004). É importante ressaltar que a IL-6 inibe o desenvolvimento de Tregs em detrimento de Th17 (Wan et al., 2005; Kleinschek et al., 2007), que por sua vez tem sua ação controlada negativamente por IL-25 e IL-27 (Kleinschek et al., 2007).

Os outros subtipos de células com função reguladora diferenciam-se a partir de células T convencionais e têm características fenotípicas distintas das Tregs naturais. As Tr1 e Th3 são diferenciadas a partir de linfócitos T “naives” e dependem de IL-10 e TGF- β , respectivamente (Mills, 2004). As Tregs naturais 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, GITR, CD62L, CD45RO e CD45RB^{low} são utilizadas para caracterizar as células Tregs naturais (Ostroukhova et al., 2005). A molécula CTLA-4 é expressa nas Tregs e sua interação com CD80 ou CD86 resulta em indução de atividade supressora. De fato, a população de células CD4⁺CD25⁺CTLA-4⁺ apresenta forte atividade reguladora *in vitro* e o bloqueio de CTLA-4 reduz sua atividade (Birebent et al., 2004; Manzotti et al., 2006; Read et al., 2000; Takahashi et al., 2000; Tang et al., 2004). Quando ocorre a interação CTLA-4 com CD80 e/ou CD86 em células dendríticas (DC) há ativação da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), secreção de imunossuppressores, bloqueio da resposta proliferativa e inibição da produção de citocinas por células T efectoras (Munn et al., 2005). Outra molécula presente na superfície das Tregs, o receptor induzido por glicocorticóide (GITR), da família do TNFR, regula a produção de citocinas e a proliferação celular (Ronchetti et al., 2002), sendo que seu bloqueio impede a atividade reguladora (Shimizu et al., 2004). É possível que a expressão de GITR possa influenciar também a hiporresponsividade de células TCD4⁺CD25⁻. Outra molécula associada à função de Tregs é a que resulta da expressão do gene *FoxP3*, o qual codifica um fator de transcrição pertencente à família FOX (“forkhead box”), necessário no ambiente tímico durante o desenvolvimento e diferenciação da população de Tregs naturais (Coffier et al., 2004). A expressão de *FoxP3* não se restringe às Tregs (Vieira et al., 2004), visto que células TCD4⁺CD25⁻, na presença de TGF-β podem expressá-lo, tornando-as funcionalmente similares às Tregs. No entanto, a expressão de *Foxp3* em células TCD4⁺CD25⁻ é cerca de 100 vezes menor que a das Tregs naturais (Chen et al., 2003; Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003). Dessa forma, a indução e concomitante transferência de Tregs poderiam prevenir uma diversidade de doenças autoimunes incluindo a diabetes, colite, EAE e AR (Salomon et al., 2000; Wu et al., 2002).

Dentro deste contexto, Kelchtermans et al. (2009) purificaram células Tregs, expandiram *in vitro* com anti-CD3 e anti-CD28 e as injetaram em animais DBA/1J imunizados com colágeno tipo II. Os autores demonstram que a transferência de Tregs a animais DBA/1J previne o desenvolvimento da CIA, acompanhada de uma diminuição dos níveis de TNF- α e IL-6. A diferenciação de osteoclastos em cultura de células de baço é significativamente reduzida na presença das células Tregs pré-estimuladas. A expressão das citocinas que são inibidoras da osteoclastogênese, tais como, GM-CSF, IFN- γ , IL-5 e IL-10 apresentam valores elevados na presença das células Tregs. Além disso, as células do baço de animais colocadas em cultura com células Tregs mostram uma capacidade reduzida de se diferenciarem em osteoclastos maduros, sugerindo que as células Tregs reverterem a capacidade de osteoclastogênese *in vivo* e dessa forma podem prevenir o desenvolvimento da AR, mas também de outras doenças autoimunes descritas (Salomon et al., 2000; Wu et al., 2002; Read, et al., 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que células Tregs CD4⁺CD25^{high} estão presentes na sinóvia inflamada de pacientes artríticos e sua função supressora é normal *in vitro*. Entretanto, alguns trabalhos demonstram que essas células apresentam um defeito da sua capacidade em suprimir a proliferação de células T efectoras presentes no compartimento articular. Ainda, a transferência adotiva de células Tregs falha em curar doenças autoimunes bem estabelecidas, indicando que dentro de certas condições inflamatórias crônicas as Tregs são incapazes de exercer sua função. Embora pouco seja sabido se a deficiência dos mecanismos supressores das Tregs é um dos fatores preponderantes para a patogênese da AR, estratégias farmacológicas que reforçam a função supressora e/ou indução de Tregs pode representar um alvo terapêutico para o tratamento da doença.

1.5 Estratégias terapêuticas para AR

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 e moléculas envolvidas na patogênese da AR (agentes biológicos) trouxe novas opções e perspectivas para o tratamento da AR. Os agentes biológicos atualmente aprovados para uso clínico são inúmeros. O primeiro modificador de resposta biológica aprovado para AR foi o anankira, um antagonista do receptor de IL-1 (Fleischmann et al., 2003; Bresnihan et al., 2004). A administração diária de anankira por via subcutânea possui eficácia razoável quando utilizado individualmente ou em combinação com MTX. O anankira deixou de ser comumente administrado com o advento dos inibidores de TNF no tratamento da AR, visto que quando comparados, os inibidores de TNF possuem uma maior eficácia terapêutica, um regime posológico mais conveniente e uma farmacocinética mais favorável no tratamento da AR (Verbsky et al., 2004).

Sobre os inibidores de TNF, o primeiro a ser introduzido para tratamento da AR foi o infliximabe, seguido posteriormente pelo etanercepte e adalimumabe. O infliximabe e o adalimumabe são anticorpos monoclonais diretos 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”. Ensaios clínicos com estes três agentes biológicos mostram alta eficácia em pacientes com AR que não responderam à terapia com as DMARDs clássicas (Moreland et al., 1999), além do que, a administração dos inibidores de TNF também é aprovada em vários países para tratamento de espondilite anquilosante, artrite psoríase e doença de Crohn (Keller et al., 2003; Mease et al., 2005; Richter et al., 2006).

A eficácia terapêutica aos inibidores do TNF é deficiente em aproximadamente 40% dos indivíduos submetidos a este tratamento, e por isso, outros agentes biológicos ganharam espaço para o tratamento da AR (Bansard et al., 2009). Dois deles surgiram há cerca de 7 anos, o rituximabe e o abatacepte (Cohen et al., 2005; Genovese et al., 2005). O rituximabe é um anticorpo monoclonal contra um antígeno, 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 citotoxicidade celular mediada por anticorpos (Edwards et al., 2004). A administração de rituximabe também é aprovada para tratamento de neoplasias relacionadas a células do sistema imune, como nos casos de linfoma não-Hodgkin e linfoma difuso de células B (Fan & Leong, 2007).

O abatacepte é 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., 2003). O abatacepte é indicado em pacientes que tiveram uma resposta inadequada ao MTX e pelo menos um dos inibidores de TNF (Kremer, 2005).

Recentes avanços no entendimento da patogênese da AR resultaram em novas alternativas de tratamento para a doença. O agente biológico mais recentemente introduzido para o controle da inflamação presente na AR é o tocilizumabe, que consiste em um anticorpo monoclonal humanizado contra o receptor de IL-6 (Tak & Kalden, 2011). Os resultados clínicos com a administração intravenosa de tocilizumabe são animadores. Estudos demonstram que em pacientes não responsivos ao MTX e outros agentes biológicos, a administração de tocilizumabe mostrou-se efetiva na prevenção dos danos articulares provocados, apesar desses

pacientes estarem mais susceptíveis a infecções bacterianas e virais (Kremer et al., 2011).

Apesar das várias opções de drogas citadas para o tratamento da AR, devido sua eficácia satisfatória por longos períodos de tratamento, baixo custo e efeitos colaterais moderados, a utilização do Metotrexato (MTX) padrão ouro em baixas doses (10-20 mg/semana) ainda compreende atualmente a terapia de primeira linha para pacientes com AR, principalmente para os recém diagnosticados (Curtis et al., 2011).

O MTX é um clássico antagonista do ácido fólico. Sua ação está envolvida com a inibição da via relacionada à síntese *de novo* de purinas e pirimidinas, formação de poliaminas, transmetilação de DNA, RNA, fosfolípidos e proteínas (Seitz, 1999). Com base nesses mecanismos, a administração de MTX em humanos no início dos anos 50 era somente destinada para o combate de neoplasias devido aos seus efeitos anti-proliferativos (Black & Livingston, 1990). Há cerca de 30 anos, estudos mostraram a eficácia da utilização do MTX em baixas concentrações para o tratamento de desordens inflamatórias, como a AR (Weinblatt et al., 1985). Os mecanismos antiinflamatórios do MTX pelos quais controlam a inflamação na AR ainda não são totalmente estabelecidos, porém achados mostram a atuação do MTX 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 na manutenção de elevados níveis de adenosina no compartimento extracelular (Cutolo et al., 2001).

Mecanismos envolvendo a interação Fas/FasL são relacionados com o efeito do MTX na indução de apoptose de células inflamatórias (Friesen et al., 1996). Estudos *in vitro* com leucócitos humanos demonstram a capacidade do MTX em promover o aumento da expressão do receptor Fas (CD95) em monócitos incubados com MTX (Seitz et al., 1998). Recentemente, trabalhos descrevem que o MTX

aumenta a sensibilidade das células a apoptose por uma via dependente da sinalização por JNK, na qual está ativada em pacientes com AR submetidos ao MTX, visto que níveis de *jun* estão aumentados em leucócitos humanos incubados com MTX (Spurlock et al., 2011). Curiosamente, a sinalização por JNK é induzida por ROS, cujos níveis também se alteram quando ocorre a incubação com MTX (Spurlock et al., 2011).

A relação do efeito do MTX com a inibição da produção e na atuação de citocinas pró-inflamatórias no sítio inflamatório, como IL-1 β e IL-17, também é sugerida como um dos mecanismos antiinflamatórios de atenuação da AR (Connolly et al., 1988). O MTX interfere diretamente com a ligação da IL-1 β ao seu receptor e, portanto, inibe a resposta celular da citocina (Brody et al., 1993). Adicionalmente, o tratamento com MTX gera um tipo menos inflamatório de monócitos circulantes em pacientes com AR, pois são capazes de produzir altos níveis do antagonista do receptor de IL-1 (IL-1ra) e paralelamente, possuem secreção de IL-1 β e IL-8 reduzida (Seitz et al., 1996). Estudos recentes *in vitro* mostram que o MTX também atua na supressão dos efeitos inflamatórios mediados por células Th17, padrão de células crítico na patogênese da AR, visto que a produção da citocina IL-17 por leucócitos humanos estimulados com anti-CD3 e anti-CD28 e incubados com MTX está reduzida tanto de pacientes com AR quanto em doadores saudáveis (Li et al., 2011).

Trabalhos também propõem que a eficácia terapêutica observada com a administração de baixas doses de MTX, é decorrente de sua capacidade em manter e aumentar os níveis de adenosina extracelular (Cronstein et al, 1993; Morabito et al, 1998). Para que ocorra este fenômeno, o fármaco promove acúmulo de AICAR (ribonucleótido aminoimidazocarboxamida), composto envolvido na biossíntese *de novo* de purinas, devido à inibição da enzima AICAR transformilase. A desfosforilação do AICAR gera AICAR-secundário, metabólito responsável pela inibição direta da adenosina deaminase (ADA), enzima que converte adenosina em inosina, permitindo

então, o aumento dos níveis de adenosina no citoplasma. Uma vez aumentada, a adenosina é transportada para o compartimento extracelular por transportadores de nucleosídeos e desempenha suas funções por interagir com receptores purinérgicos de tipo 2 (A1, A2a, A2b e A3) expressos na membrana de leucócitos. Ainda, a adenosina também pode sofrer ação da adenosina kinase, refosforilando-a e convertendo-a em ATP que também pode ser transportado para o compartimento extracelular. No espaço extracelular, o ATP sofre ação de duas ectonucleotidases, a ATP difosfohidrolase (CD39) que hidrolisa o ATP em ADP e AMP e posteriormente o AMP é degradado pela 5'nucleotidase (CD73) gerando adenosina (**Figura 1**).

Figura 1 – Mecanismo de ação do MTX na manutenção dos níveis elevados de adenosina. AICAR, 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleosídeo; IMP, monofosfato de inosina; AMPDA, AMP deaminase; ADA, adenosina deaminase; AICAside, aminoimidazol carboxamidoribonucleosídeo; AK, adenosina kinase; CD39, ATP difosfohidrolase ; CD73, ecto-5' nucleotidase. Adaptado de Crostein, 2005.

Recentes 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 adenosina pericelular (Kobie, 2006). A expressão coordenada dessas ectoenzimas em Tregs e do receptor de adenosina A2a nos linfócitos T efetores geram sinais imunossupressores, indicando a função inibidora das Tregs. Confirmando o papel das ectonucleotidases, Tregs provenientes de camundongos CD39^{-/-} apresentam uma perda da sua propriedade supressiva *in vitro* e falham para bloquear a rejeição do aloenxerto *in vivo* (Deaglio et al., 2007).

A degradação do ATP pelas ectonucleotidases presentes na superfície de células Tregs também afeta as funções de células dendríticas (DCs). Trabalhos demonstram que a exposição de DCs ao ATP induz a maturação, seguida do aumento da expressão de MHC-II, moléculas coestimuladoras, moléculas de adesão e da secreção de IL-12 (Schnur et al., 2000). O ATP liberado pela flora comensal induz as células dendríticas presentes na lâmina própria a liberar citocinas como IL-6 e IL-23 e TGF- β e, dessa forma, polarizar linfócitos T “naives” para o perfil Th17, que tem como consequência, a indução da colite em camundongos (Atarashi et al., 2008). A pré-exposição de Tregs ao ATP reduz a maturação de DCs e essa interação permite com que as Tregs migrem para tecidos inflamados para exercer suas funções. Ainda, os efeitos imunomodulatórios da remoção do ATP em DCs são amplificados pela geração de adenosina. A adenosina induz nestas células uma alteração da produção de citocinas de um perfil pró-inflamatório para antiinflamatório, com níveis reduzidos da produção de IL-12, IL-6 e IFN- α e o aumento da produção de IL-10. Consistente com o fato que as DCs são células altamente especializadas na apresentação de antígenos e estão na interface da resposta imune inata e adaptativa, é plausível sugerir que os efeitos imunomoduladores das células CD4⁺CD39⁺ interfira diretamente na remoção do ATP extracelular, e de uma maneira indireta, pela geração de adenosina, na função

de DCs em polarizar linfócitos TCD4⁺ naive para Th17, e dessa forma prevenir os danos tissulares induzidos na AR.

Uma vez liberada, a adenosina exerce suas atividades atuando principalmente nos leucócitos do infiltrado inflamatório e/ou em tecidos injuriados. A adenosina pode proteger o endotélio dos polimorfonucleares por inibir a expressão de $\beta 2$ 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 (Thiel & Chouker, 1995). Trabalhos demonstram que os linfócitos T expressam o receptor A2a (A2aR), o qual 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; Lappas et al., 2005). A interação entre adenosina com o receptor A2a suprime e atenua doenças inflamatórias intestinais, como colite, ileíte e doença de Chron. A administração do agonista suprime a resposta inflamatória por inibir a proliferação de células CD45RB^{high} e a liberação de citocinas no tecido inflamado, atenuando o quadro clínico e a gravidade observados nestas doenças (Naganuma et al., 2006; Deaglio et al., 2007).

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 outras medidas terapêuticas sejam aplicadas para o controle da AR, como a administração de agentes biológicos, que consiste um tratamento de custos mais elevados (Fan & Leong, 2007).

Os mecanismos de refratariedade ao MTX ainda não estão bem estabelecidos, porém estudos recentes mostram evidências que podem estar participando destes mecanismos. A eficácia terapêutica do MTX pode estar relacionada com a atividade das ectonucleotidases na geração de adenosina extracelular. De fato, em um estudo de Montesinos et al. (2007) o papel das ectonucleotidases é demonstrado como

essencial para ação do MTX, visto que em camundongos deficientes destas ectoenzimas, o MTX não exerce seus efeitos antiinflamatórios em modelo de inflamação induzido por carragenina. Além disso, a influência das células Tregs neste fenômeno é um assunto a ser investigado, visto que esta população celular exibe uma alta expressão destas enzimas na sua superfície.

Polimorfismos no gene do receptor de adenosina A2a foram associados com a não responsividade ao MTX ou com a manifestação de efeitos colaterais mais graves causados pela droga (Hider et al, 2008; Grabar et al, 2010). Estes polimorfismos diminuem a expressão do receptor na superfície de células mononucleares, podendo acarretar em um comprometimento dos efeitos antiinflamatórios provocados pela atuação da adenosina nas células alvo. Além disso, alguns autores defendem a existência de que ocorram fenômenos, ainda não estudados, envolvidos com a cascata sinalização dos receptores de adenosina presentes nas células inflamatórias, que culminam em uma não responsividade ao estímulo com adenosina. A não responsividade dos receptores em células dendríticas (DCs), por exemplo, pode desencadear mecanismos de escape destas células ativadas cronicamente na cavidade articular à imunovigilância induzida pelas Tregs, e conseqüentemente, ocasionar a geração de células T ativadas refratárias à supressão mediada pela adenosina (Bansard et al., 2009).

Outros polimorfismos são associados com a eficácia terapêutica do MTX, que incluem polimorfismos em genes de enzimas envolvidas na via metabólica do MTX na inibição da síntese *de novo* de purinas, como no gene da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (Wesoly et al., 2006; Wessels et al., 2006). Porém esses dados são contraditórios na literatura, visto que autores de um grupo japonês e dois estudos indianos não relatam associação de polimorfismo desta enzima com a eficácia da droga (Kumagai et al., 2003; Aggarwal et al., 2006; Ghodke et al., 2008).

Estudos epidemiológicos com base em dados demográficos e hábitos sociais mostram associações com a eficácia terapêutica do MTX. Dados mostram que pacientes acometidos por AR e que fumam são menos propensos a responder às terapias com MTX e inibidores de TNF (Saevarsdottir et al., 2011). Em adição, pacientes pertencentes ao sexo feminino e que desenvolvem a doença antes dos 40 anos também são relatados por apresentarem uma pior resposta ao MTX (Saevarsdottir et al., 2011).

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 de rotina como preditivos de resposta ao MTX. Com base nestes acontecimentos, são necessárias novas investigações com o propósito de elucidar os mecanismos de refratariedade ao MTX na AR, visto que estes dados podem proporcionar benefícios relevantes para a prática clínica. Assim, dentro deste contexto, o entendimento dos fenômenos participantes na refratariedade ao MTX associado com a identificação de biomarcadores preditivos de resposta clínica proporcionará aos pacientes acometidos pela doença uma exposição desnecessária à droga, e uma consequente redução da aplicação de tratamentos ineficazes contra a doença.

Assim, com base nessas informações, no presente estudo demonstramos um mecanismo de refratariedade ao tratamento com MTX na AR baseado no número de células Tregs circulantes e na contribuição deste subtipo leucocitário para a geração de adenosina extracelular pelas ectonucleotidases CD39 e CD73 presentes na superfície. Adicionalmente, mostramos que o número de células Tregs do sangue periférico expressando a ectonucleotidase CD39 bem como os níveis de expressão deste marcador por célula estão alterados entre os grupos de pacientes responsivos ou não ao MTX. O conjunto dos dados apresentados neste trabalho possibilita

identificar a causa pela qual a eficácia do MTX é comprometida em pacientes com AR, e ainda, gera novas perspectivas no desenvolvimento de intervenções terapêuticas relacionadas à manipulação de células Tregs e da ectoenzima CD39 como alvos potenciais para o controle do processo inflamatório.

2- OBJETIVOS

Baseado nos estudos acima relatados, o presente estudo teve por objetivo investigar os mecanismos de refratariedade de pacientes artríticos ao MTX, com enfoque na atividade bioquímica e função supressora de células Tregs.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar a atividade da doença em pacientes R-MTX e UR-MTX baseada na quantificação de citocinas no plasma e pelo padrão de ativação de células TCD4⁺ oriundas do sangue periférico.
2. Fenotipar os leucócitos do sangue periférico de pacientes R-MTX e UR-MTX principalmente as células CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺(Tregs) quanto à expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73;
3. Determinar a atividade das ectonucleotidases e a geração de adenosina por células TCD4⁺ circulantes de pacientes com AR.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes e indivíduos controles

No estudo, o sangue periférico (15 mL) foi coletado por punção venosa de pacientes (n= 89) diagnosticados com AR, classificados de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia (Arnett FC et al. 1988). 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 a terapêutica ao metotrexato. Pacientes refratários ao MTX (UR-MTX) foram aqueles pacientes que estavam utilizando MTX na dose mínima de 15 mg/semana, por pelo menos três meses, e que ainda apresentavam doença ativa. Doença ativa passa a ser definida pelo índice de atividade da doença – DAS28 (Disease Activity Score- 28 joints). Valores do DAS28 superiores a 4,0 são definidores de doença ativa. Os pacientes também não deveriam utilizar doses de prednisona superiores a 10 mg/dia. Os pacientes respondedores ao MTX (R-MTX) foram aqueles com DAS28 inferior a 3,0, em uso de MTX há mais de três meses e prednisona com dose inferior a 10 mg/dia. Em ambos os grupos, os pacientes poderiam estar utilizando como combinação de terapêutica para AR, somente difosfato de Cloroquina, 250 mg/dia. Nenhuma outra medicação modificadora do curso da doença (DMCD), como leflunomida, sulfassalazina, ciclosporina e agentes biológicos (Anti-TNF, moléculas coestimuladoras e anti-CD20) foi permitida o seu uso no momento da coleta das amostras. Todos os pacientes foram avaliados previamente a coleta por um médico reumatologista, que se incumbiu de classificar os pacientes como refratários ou não ao MTX e avaliou os critérios de inclusão e exclusão do estudo. No **anexo 1** está o protocolo clínico para coleta de dados.

Como controle, amostras do sangue periférico de indivíduos sadios (IS, n = 16) pareados por sexo e idade foram coletadas. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP. 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. Foram excluídos os pacientes, por meio de sua própria vontade ou de seu representante legal que não manifestaram interesse em participar do estudo. As características clínicas dos grupos de pacientes com AR são mostradas abaixo (**Tabela 3**) bem como a classificação da atividade da doença baseada no escore clínico DAS28 (**Figura 2**).

Tabela 3.**Características clínicas dos pacientes com AR**

Características clínicas	Pacientes R-MTX (n=35)	Pacientes UR-MTX(n=54)
Média de idade (anos)	52,6	54,7
Mulheres (%)	88,8	84,9
RF-positivo (%)	67,4	71,5
α CCP-positivo (%)	60,2	63,5
DAS28 (média $\pm$ EPM)	2,23 $\pm$ 0,57	5,87 $\pm$ 0,52
Uso de MTX (%)	100	100
Tabagismo (%)	20	36
PCR (média $\pm$ EPM)	1,04 $\pm$ 0,68	1,59 $\pm$ 0,23

RF, fator reumatóide; α CCP, anticorpos anti-peptídeos citrulinados; DAS28, disease activity score;; MTX, Metotrexato; R-MTX, responsivo ao MTX; UR-MTX, não-responsivo ao MTX; PCR, proteína C reativa

Figura 2 – Índice de atividade da doença nos grupos de pacientes com AR. Score clínico DAS28 de pacientes responsivos (R-MTX) ou não ao tratamento com Metotrexato (UR-MTX).

3.2. Obtenção de leucócitos do sangue periférico dos pacientes

As células monucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas de pacientes refratários ou não ao MTX e indivíduos saudáveis. Após a coleta, o sangue foi diluído em igual volume de PBS, 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, centrifugada por 10 min a 400 x g e lavada duas vezes. Após esse procedimento, o sedimento foi ressuspensão em 3 mL de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado e os leucócitos foram quantificados em câmara de Neubauer.

3.3. Fenotipagem celular por citometria de fluxo

Para a caracterização fenotípica das células, bem como caracterização das populações de células T reguladoras, foi avaliada a expressão dos seguintes marcadores: CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, CD39, CD73, CD26, CD15, CD11b, CD11c e FoxP3. Brevemente, as células 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-Cy5, PE-Cy7, APC ou Pacific Blue (BD Biosciences e eBioscience, San Diego, CA, EUA), e foram incubados 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). As análises foram feitas usando os softwares "FACSdiva" (BD Biosciences) e "Flow Jo" (TreeStar, Ashland, OR, EUA).

3.4. Avaliação da produção de citocinas intracelulares

Para a quantificação de citocinas intracelulares, 1×10^6 células de PBMC foram previamente cultivadas por 12 horas na presença de α -CD3 (5 μ g/mL) e α -CD28 (5 μ g/mL). Posteriormente, as células foram incubadas com Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 minutos, lavadas em PBS a 400 x g por 10 min a 4°C, e incubadas com os anticorpos monoclonais específicos (BD Biosciences) para IL-10, IL-17 e IFN- γ diluídos em Permwash 1X por 30 min, para posteriormente serem lavadas novamente em PBS e adquiridas no aparelho FACSCanto II (BD Biosciences).

3.5. Dosagens de citocinas por ELISA

Placas de 96 poços foram recobertas e incubadas com anticorpo purificado anti-IL-17, anti-MIP-1- β , anti-TNF- α , anti-IL-1- 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, com osteoartrite e indivíduos normais, durante 12 horas, à 4°C. As curvas padrão das interleucinas recombinantes foram feitas à partir de diluições seriadas (base 2) da concentração de 10.000 pg/ml. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas e incubadas durante 1h, à temperatura ambiente com o anticorpo α -interleucina biotilado, diluído na concentração final de 1 μ g/ml em PBS contendo 1% de BSA e 0,5% de Tween 20. 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. Após nova lavagem, as placas foram relevadas com substrato OPD (o-fenileno diamino) diluído em tampão diluente próprio. A reação foi bloqueada com ácido sulfúrico e, em seguida, feita a leitura em 490nm.

3.6 Extração de RNA e avaliação da expressão dos receptores A2a e A2b por RT-PCR

A extração do RNA foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e kit para extração de RNA (Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 1mL de Trizol foi adicionado nas amostras, sendo posteriormente agitadas por 30 segundos na presença 200 µl de clorofórmio (Sigma) para cada 1 mL da suspensão. Após, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, onde se acrescentou etanol 70% em proporções iguais à amostra (v:v), agitada delicadamente e transferida para uma coluna de afinidade para RNA. Após várias lavagens, por rápidas centrifugações por 15 segundos a 8000 x g cada, com diferentes tampões específicos, as amostras de RNA foram eluídas da coluna com 60 µl de água deionizada e livre de RNase, sendo armazenadas a -70° C, até a confecção do DNA complementar (cDNA). Uma alíquota de 3µL foi diluída e utilizada para determinação da concentração de RNA total, através de leitura em espectrofotômetro em filtro de 260 nm. A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada através de transcrição reversa (RT-PCR) com oligo d(T)16 (Invitrogen), e utilizada para a quantificação da expressão dos genes de interesse (A2aR e A2bR) e do gene de expressão constitutiva (HPRT-1) por PCR em tempo real utilizando Syber green como repórter da amplificação. Amostras de RNA sem a transcrição reversa foram utilizadas para verificar a ausência de DNAg nas amostras. Foram utilizados iniciadores previamente estabelecidos no laboratório.

A2aR: 5'-CCA TGC TGG GCT GGA ACA-3 e 5-GAA GCG GCA GTA. ACA CGA ACG-3'

A2bR: 5'-CTA TGC TTA CCG GAA CCG AGG-3' e 5'-ACC ATG CCC GGC CGA ATA ATA-3'

HPRT-1: 5'-GCA GTA CAG CCC CAA AAT GGC-3' e 5'-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3'

3.7 Separação das sub-populações de células T

Células do sangue periférico de pacientes refratários ou não ao MTX foram purificadas utilizando-se CD4 MACS MultiSort beads, de acordo com as recomendações do fabricante. Seguida à separação, as células TCD4⁺ foram lavadas em PBS gelado acrescido de 0,5% de BSA mais 3 mM de EDTA, e marcadas com beads anti-CD25 (3 ml por 10⁷ células). Desta forma, obtemos diferentes populações celulares, TCD4⁺CD25⁻ (T efetoras) ou TCD4⁺CD25⁺ (Tregs).

3.8.1. Análise da atividade ATPase das células CD4⁺CD39⁺ por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).

Para a quantificação de adenosina, um total de 5 x 10⁵ células T efetoras e Tregs isoladas de pacientes com AR e indivíduos saudáveis foram incubadas com RPMI-1640 contendo 1mM de ADP (Sigma-Aldrich) em placa de cultura de 48 poços (Costar) a 37° C. Após 1h, 500 µL de cada sobrenadante da cultura foi coletado e adicionado em tubos contendo 1 mL de acetonitrila, e imediatamente vortexados por 1 min e centrifugados 450 x g durante 5 min a 4° C, para extrair proteínas e estabilizar adenosina. Em seguida, o sobrenadante coletado foi seco sob fluxo de ar e o pellet foi ressuspenso em 200 µL de fase móvel (0,1% de acetonitrila, 5,4% de metanol e 94,5% de tampão fosfato 0,25 M, pH 6,3). Finalmente, as amostras foram vortexadas por 20s e 100 µL de cada amostra foi utilizada para análise cromatográfica. Os procedimentos cromatográficos foram realizados por HPLC (Shimadzu SPD 10-A, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna HP Altima (C18). Padrões de adenosina foram usados para confirmar o tempo de retenção e execução necessários. Adenosina foi quantificada comparando o tempo de retenção com as

concentrações pré-estabelecidas dos padrões. Nas condições utilizadas, o limite de detecção foi de 1 ng/mL e o limite de quantificação foi de 200 ng/mL.

3.8.2. Análise da atividade ATPase das células CD4⁺CD39⁺ pelo de ensaio de verde malaquita.

Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Chan e colaboradores, 1986. Brevemente, em placa de 48 poços (Nunc), 5×10^5 células isoladas (células T efetoras ou Tregs) de pacientes com AR e indivíduos saudáveis (IS) foram incubadas com RPMI 1640 contendo 1mM ADP (Sigma-Aldrich) a 37 ° C. Após 1h, 200 µL de solução de verde foi adicionado aos poços contendo as amostras. Após 1h de incubação à temperatura ambiente, a densidade óptica foi medida em 650 nm e a quantidade de fosfato inorgânico liberado foi calculada a partir de uma curva padrão preparada simultaneamente de fosfato padrão (1-10 pm - K_2PO_4).

Solução de verde malaquita: uma parte da solução de molibdato de amônio (4,2g) dissolvido em 100 mL de HCl 4M + três partes de verde malaquita (0,045%) dissolvida em H₂O.

3.9. Análise estatística

As análises entre as amostras foram realizadas com a utilização da análise de variância (ANOVA) seguida pelo de teste “t” não paramétrico. Para todas as análises, valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística e os gráficos foram feitos usando o programa GraphPad prism (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4- RESULTADOS

1- Caracterização dos grupos de pacientes com AR quanto à presença de citocinas no sangue periférico e o padrão de ativação de células TCD4⁺

Após a classificação dos pacientes baseados no DAS28, conforme descrito em Material e Métodos (item 3.1.), primeiramente, mensuramos as citocinas pró e antiinflamatórias presentes no sangue periférico de pacientes R-MTX ou UR-MTX. Para este fim, o plasma proveniente dos pacientes foi coletado e a produção de citocinas foi avaliada por ELISA, conforme descrito em Material e Métodos. Como controles foram utilizadas amostras de indivíduos saudáveis (IS) pareados por sexo e idade.

Com os resultados obtidos, verificamos um aumento significativo na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β (**Figura 3A e 3B**, respectivamente) em pacientes UR-MTX quando comparados com R-MTX. De maneira interessante, não houve diferença nos níveis dessas citocinas nas amostras de pacientes R-MTX comparados aos grupos controle (IS). Outras citocinas, como IL-17, MIP-1 β e TGF- β , foram avaliadas, porém não houve diferença significativa na produção destas citocinas entre os grupos avaliados. (**Figura 3C, 3D e 3E**, respectivamente).

Figura 3 – Quantificação de citocinas no plasma de pacientes com AR. O plasma de pacientes R-MTX (●)(n=12),UR-MTX (◆) (n=20) e indivíduos sadios (IS) (círculo aberto) (n=4) foram coletados para mensuração dos níveis de TNF-α (A), IL-1β (B), IL-17 (C), MIP-1β (D) e TGF-β (E) por ELISA. Os valores acima foram expressos como média ± EPM e representativo de um experimento. * $P < 0.05$ comparado ao grupo R-MTX.

Posteriormente, fizemos uma avaliação do padrão de resposta baseado na produção de citocinas intracelulares desencadeado pela ativação de células TCD4⁺. Para atender a esse propósito, as células não aderentes de pacientes responsivos ou não ao MTX foram submetidas à estimulação policlonal com anti-CD3 (5ug/mL) e anti-CD28 (5ug/mL) por 12h. Em seguida, as células foram recuperadas, processadas e analisadas por citometria de fluxo, conforme detalhado em Material e Métodos. Para caracterizar o fenótipo de ativação, as células CD3⁺CD4⁺ foram selecionadas e analisadas então, quanto à frequência de positividade para as citocinas IL-17, IFN-γ e IL-10.

Nossos dados demonstraram que pacientes R-MTX apresentaram um aumento da frequência de células TCD4⁺ produtoras da citocina IL-10 (Figura 4A) em relação aos pacientes UR-MTX. Enquanto que de maneira interessante, observou-se em pacientes UR-MTX um aumento na porcentagem de células TCD4⁺ produtoras das citocinas pró inflamatórias IL-17 e IFN-γ (Figura 4B e 4C, respectivamente), células envolvidas na patogênese da doença (Li et al, 2010; Nistala et al, 2010), quando comparadas aos grupos R-MTX e indivíduos saudáveis (IS). Ressaltamos que não houve diferença significativa na produção de todas as citocinas analisadas entre os grupos R-MTX e IS. Com base nesses dados, podemos inferir que o aumento da atividade da doença de pacientes UR-MTX verificado pelo escore clínico DAS28 está relacionado a um aumento de citocinas pró-inflamatórias sistêmicas no plasma e também por uma resposta inflamatória mais acentuada de padrão Th1 e Th17.

Figura 4- Ativação de linfócitos CD4⁺ de pacientes artríticos. Células de PBMC de indivíduos saudáveis (IS), pacientes responsivos (R-MTX) e de não responsivos (UR-MTX) foram estimuladas com α -CD3 (5ug/ml) e α -CD28 (5ug/ml) por 12h. As moléculas de superfície e citocinas intracelulares foram marcadas com anticorpos específicos para CD4, CD3, IL-10, IL-17, IFN- γ conjugados com FITC- ou PE- ou PERCP. Os gráficos de barras representam a média $\pm$ EPM da porcentagem de células CD4⁺IL-10⁺ **(A)**, CD4⁺IL-17⁺ **(B)** e CD4⁺IFN- γ ⁺ **(C)**, sendo este representativo de dois experimentos independentes (n = 5) [#]P < 0.05 comparado ao grupo IS. *P < 0.05 comparado ao grupo R-MTX.

2- Fenotipagem dos leucócitos em pacientes artríticos R-MTX e UR-MTX

A fim de avaliar o fenótipo dos leucócitos dos pacientes responsivo ou não ao MTX, células mononucleares isoladas do sangue periférico foram marcadas com anticorpos de superfície específicos e analisadas por citometria de fluxo. Para selecionar as populações de interesse, foram utilizados os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), sendo selecionadas as populações de linfócitos T e B (“gate” de linfócito - G1) e monócitos e células dendríticas (“gate” – G2).

De acordo com a figura 5, as freqüências de linfócitos TCD3⁺ (**Figura 5A**), TCD8⁺ (CD3⁺CD8⁺) (**Figura 5C**), células B (CD19⁺) (**Figura 5E**) e células dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺) (**Figura 5F**) foram similares entre os grupos UR-MTX e R-MTX. Em relação à população de células dendríticas, foi verificado um aumento na porcentagem dessas células em pacientes responsivos (R-MTX) ou não responsivos (UR-MTX), quando comparadas ao controle (IS). Nos linfócitos TCD4⁺, embora não foram observadas diferenças significativas na freqüência desse subtipo celular em todas as amostras analisadas (**Figura 5B**), pacientes R-MTX apresentaram um aumento significativo na positividade de linfócitos TCD4⁺ co-expressando a cadeia α do receptor de IL-2 (CD4⁺CD25⁺), fenótipo sugestivo de células T reguladoras (Tregs) (**Figura 5D**). Esse aumento foi de 56.64% $\pm$ 1.87% (P<0.0127), quando comparado ao UR-MTX e ao grupo IS (P<0.0263).

Figura 5- Caracterização fenotípica das células mononucleares do sangue periférico de pacientes artríticos. Células de PBMC de indivíduos saudáveis (IS) ($\circ$, $n = 8$), responsivos (R-MTX) ($\bullet$, $n = 15$) e de não responsivos (UR-MTX) ($\blacklozenge$, $n = 20$) foram caracterizadas por citometria de fluxo. Os dados representam a porcentagem de leucócitos CD3⁺ (A), CD3⁺CD4⁺ (B), CD3⁺CD8⁺ (C), CD4⁺CD25⁺ (D), CD19⁺ (E) e células dendríticas (CD11b⁺CD11c⁺) (F). Os valores acima foram expressos como média $\pm$ EPM e representativo de um experimento. * $P < 0.05$ comparado ao grupo R-MTX. ** $P < 0.05$ comparado ao grupo IS.

Visto que a expressão de $CD4^+CD25^+$ não se restringe à população de células Tregs (Vieira et al., 2004) e não exclui a possibilidade de pertencerem à população de células T ativadas (van Roon et al., 2006), avaliamos a expressão de FoxP3, fator de transcrição característico desse subtipo celular.

De maneira interessante, similar ao que foi observado com as células $CD4^+CD25^+$, pacientes R-MTX apresentaram um aumento significativo na porcentagem e no número absoluto de células $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (**Figuras 6A e 6B**, respectivamente) presentes no sangue, quando comparadas com pacientes UR-MTX e IS, o que sugere uma relação direta entre a refratariedade dos pacientes ao MTX com o número de Tregs circulantes nos indivíduos acometidos pela doença.

Figura 6 – Aumento de células Tregs em pacientes R-MTX. Células indivíduos saudáveis (IS), de pacientes responsivos (R-MTX) ou não responsivos (UR-MTX) foram marcadas com anticorpos específicos para CD4, CD25 ou FOXP3 e analisadas por citometria de fluxo quanto à porcentagem e número absoluto de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$. Os dados representam a porcentagem (**A**) e número absoluto (**B**) de leucócitos $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ de indivíduos saudáveis (IS), responsivos (R-MTX) ou não (UR-MTX) ao MTX. * $P < 0.05$ comparado ao grupo R-MTX. *** $P < 0.05$ comparado ao grupo IS.

3- Expressão de CD39 e CD73 em linfócitos TCD4⁺ de pacientes artríticos

Recentes estudos demonstram que as Tregs expressam altos níveis de CD39 e CD73 em sua superfície como mecanismo de supressão. Estes marcadores estão funcionalmente ativos e possuem ação como indutores da adenosina pericelular (Deaglio et al., 2007). Assim, tendo em vista que um dos mecanismos de ação do MTX é manter os níveis de adenosina extracelular elevados e a importância da atividade das ectonucleotidases em gerar adenosina (Kobie et al., 2006; Friedman et al., 2009), avaliamos a expressão de CD39 e CD73 em leucócitos de pacientes com AR.

Observamos que em células TCD4⁺ expressando CD39 havia um aumento significativo na porcentagem desta população celular em pacientes R-MTX quando comparados aos grupos IS e UR-MTX (**Figura 7A e 7B**), enquanto que a expressão de CD73 neste tipo celular foi similar entre todos os grupos (**Figuras 7C e 7D**). Outros subtipos leucocitários foram analisados quanto à expressão das ectonucleotidases na sua superfície e não apresentaram diferenças na porcentagem em células CD3⁺CD8⁺, CD19⁺ e CD11b⁺CD11c⁺ expressando tanto CD39 quanto CD73 (**Figura 8**). Portanto, a responsividade de pacientes ao MTX está relacionada com o aumento da população de células CD3⁺CD4⁺CD39⁺, e consequentemente, há uma porcentagem maior de células que poderiam estar contribuindo para uma maior produção de adenosina extracelular nos pacientes R-MTX.

Figura 7- Caracterização da expressão de CD39 e CD73 em células em TCD4⁺. (A) *Dot plot* representativo de células CD4⁺CD39⁺ de pacientes R-MTX (esquerda) e UR-MTX (direita). (B) Dados demonstram a porcentagem células CD4⁺CD39⁺ de indivíduos saudáveis (IS) (○, n = 10), pacientes responsivos (R-MTX) (●, n = 13) ou não responsivos (UR-MTX) (◆, n = 20) ao MTX caracterizadas por citometria de fluxo. (C) *Dot plot* representativo de células CD4⁺CD73⁺ de pacientes R-MTX (esquerda) e UR-MTX (direita). (D) Dados demonstram a porcentagem células CD4⁺CD73⁺ de indivíduos saudáveis (IS) (○, n = 10), pacientes responsivos (R-MTX) (●, n = 13) ou não responsivos (UR-MTX) (◆, n = 20) ao MTX caracterizadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam a média ± SEM. **P* < 0.05 comparado ao grupo R-MTX. ***P* < 0.05 comparado ao grupo IS.

Figura 8- Expressão das ectonucleotidasas, CD39 e CD73, na superfície de outros subtipos leucocitários. Células de PBMC de indivíduos saudáveis (IS)(○, n = 8), responsivos (R-MTX) (●, n = 15) e de não responsivos (UR-MTX)(◆, n = 20) foram caracterizadas quanto a porcentagem de expressão de CD39 e CD73. Os dados representam a porcentagem de expressão de CD39 em células CD8⁺(**A**), CD19⁺(**B**), CD11b⁺CD11c⁺(**C**), e de CD73 em células CD8⁺(**D**), CD19⁺(**E**), CD11b⁺CD11c⁺(**F**). Os valores acima foram expressos como média ± EPM e representativo de um experimento.

Em seguida, nossa investigação identificou qual subpopulação de células TCD4⁺ estaria contribuindo para o aumento da porcentagem de expressão de CD39 observado em pacientes R-MTX. Interessante, similar ao observado com linfócitos TCD4⁺, a expressão de CD39 foi significativamente maior na subpopulação de células TCD4⁺CD25⁺ e TCD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ de pacientes R-MTX quando estes foram comparados com os pacientes UR-MTX e grupo controle **(Figura 9A e 9B, respectivamente)**, sugerindo que pacientes R-MTX apresentam uma maior porcentagem de Tregs circulantes expressando esse marcador. Confirmando nossos achados, não houve diferença na porcentagem de expressão do CD39 dentro da população de linfócitos T efetores (CD4⁺ CD25⁻), entre todos os grupos analisados **(Figura 9C)**.

Figura 9- Caracterização da expressão de CD39 nas subpopulações de células TCD4⁺. Dados demonstram a porcentagem células CD4⁺CD25⁺(**A**), CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺(**B**) e CD4⁺CD25⁻ (**C**) expressando CD39 de indivíduos sadios (IS)(○, n = 10), pacientes responsivos (R-MTX)(●, n = 13) ou não responsivos (UR-MTX)(◆, n = 20) ao MTX. Os gráficos representam a média ± SEM. ***P* < 0.05 comparado ao grupo IS. **P* < 0.05 comparado ao grupo R-MTX.

Em adição à análise fenotípica de CD73, não observamos novamente nenhuma diferença na porcentagem de expressão deste marcador nas subpopulações de linfócitos TCD4⁺, tanto em linfócitos T reguladores (CD4⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)(**Figura 10A e 10B, respectivamente**) como em linfócitos T efetores (CD4⁺CD25⁻) (**Figura 10C**).

Figura 10- Caracterização da expressão de CD73 nas subpopulações de células TCD4⁺. Dados demonstram a porcentagem células CD4⁺CD25⁺(**A**), CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺(**B**) e CD4⁺CD25⁻ (**C**) expressando CD73 de indivíduos saudáveis (IS)(○, n = 10), pacientes responsivos (R-MTX)(●, n = 13) ou não responsivos (UR-MTX)(◆, n = 20) ao MTX. Os gráficos representam a média ± SEM. **P* < 0.05 comparado ao grupo IS. **P* < 0.05 comparado ao grupo R-MTX.

Adicionalmente, avaliamos a expressão das ectonucleotidases (CD39 e CD73) através de dados obtidos pela média de intensidade de fluorescência por célula (MFI) destas moléculas presentes na superfície de células TCD4⁺. Observamos uma redução significativa da expressão da molécula CD39 na superfície de células CD4⁺CD25⁺ oriundas de pacientes UR-MTX (**Figura 11, esquerda**). Este fenômeno restringe-se a Tregs, visto que não foi encontrada nenhuma diferença quanto na expressão de CD39 nas células CD4⁺CD25⁻ em todos os grupos analisados (**Figura 11, direita**).

Figura 11- Média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD39 em pacientes com AR. Dados mostram o MFI de CD39 em células CD4⁺CD25⁺(**esquerda**) e CD4⁺CD25⁻(**direita**) de indivíduos saudáveis (IS)(n=10), pacientes R-MTX (n=13) e UR-MTX (n=20). Os gráficos representam a média ± SEM. *P < 0.05 comparado ao grupo IS.

Em relação á análise do MFI da molécula CD73, não se observou diferenças significativas de valores tanto na subpopulação de células CD4⁺CD25⁺ (**Figura 12, esquerda**) quanto em células CD4⁺CD25⁻ (**Figura 12, direita**) dos grupos analisados, mostrando que somente a expressão da ectonucleotidase CD39 encontra-se reduzida em pacientes UR-MTX.

Figura 12- Média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD73 em pacientes com AR. Dados mostram o MFI de CD73 em células CD4⁺CD25⁺ (**esquerda**) e CD4⁺CD25⁻ (**direita**) de indivíduos saudáveis (IS)(n=10), pacientes R-MTX (n=13) e UR-MTX (n=20). Os gráficos representam a média ± SEM.

4 - Avaliação da função enzimática de CD39 em Tregs na geração de adenosina.

Para este fim, os diferentes subtipos de linfócitos T provenientes de pacientes com AR e IS foram incubados com ADP (1mM) por 1 hora e a adenosina gerada foi quantificada indiretamente no sobrenadante de cultura por meio do ensaio colorimétrico verde malaquita, no qual quantifica o fosfato inorgânico gerado pela quebra do ADP pelas ectonucleotidases. Os dados obtidos mostraram uma redução significativa da quantidade de fosfato inorgânico presente no sobrenadante de células TCD4⁺CD25⁺ oriundas de pacientes UR-MTX, quando comparados com pacientes R-MTX e IS (**Figura 13, esquerda**), corroborando com os resultados obtidos relacionados à redução da expressão de CD39 em células TCD4⁺CD25⁺ de pacientes UR-MTX (**Figura 11**) . Por outro lado, em células T efetoras (CD4⁺CD25⁻), a presença de fosfato inorgânico no sobrenadante foi basal e sem diferenças entre os grupos, confirmando a baixa expressão de CD39 nesse tipo celular (**Figura 13, direita**).

Figura 13- Atividade das ectonucleotidases de células Tregss e Tefetoras provenientes de pacientes com AR na produção de fosfato inorgânico. Sobrenadantes de cultura de células Tregs (CD4⁺CD25⁺) e Tefetoras (CD4⁺CD25⁻) incubadas com ADP(1mM) por 1h foram coletados para a dosagem de fosfato pelo método de verde malaquita. Dados demonstram a concentração(pM) de fosfato inorgânico no sobrenadante de células CD4⁺CD25⁺(**esquerda**) e CD4⁺CD25⁻(**direita**) de indivíduos saudáveis (IS)(n=5),pacientes R-MTX(n=6) e UR-MTX(n=6).Os gráficos representam a média ± SEM. * < 0.05 comparado ao grupo IS.

Finalmente, mensuramos diretamente a adenosina gerada no sobrenadante das células de pacientes e indivíduos saudáveis incubadas com ADP (1mM) pela técnica de cromatografia líquida de alta *performance* (HPLC). Similar aos resultados obtidos pela dosagem do fosfato inorgânico, a geração de adenosina na cultura de células TCD4⁺CD25⁺ oriundas de pacientes UR-MTX estava comprometida (**Figura 14A e 14B, direita**), quando comparadas as células de pacientes R-MTX e indivíduos saudáveis (IS). Com relação às células T efectoras (CD4⁺CD25⁻), não houve diferença nas dosagens de adenosina entre os grupos analisados.

Assim a partir desses dados, podemos afirmar que a deficiência de expressão de CD39 na superfície de células Tregs de pacientes UR-MTX é um fenômeno importante de refratariedade, visto que a capacidade em gerar adenosina extracelular por esses pacientes está comprometida.

Figura 14- Atividade das ectonucleotidasas de células Tregs e T efetoras provenientes de pacientes com AR na produção de adenosina extracelular. Sobrenadantes de cultura de células Tregss (CD4⁺CD25⁺) e T efetoras (CD4⁺CD25⁻) incubadas com ADP(1mM) por 1h foram coletados para a dosagem de adenosina por HPLC.(A) Cromatogramas representativos de amostras de indivíduos saudáveis sem ADP (**primeiro**), células CD4⁺CD25⁺ de indivíduos saudáveis (**segundo**), de pacientes R-MTX (**terceiro**) e UR-MTX (**quarto**). (B) Dados demonstram a concentração (ng/mL) de adenosina no sobrenadante de células CD4⁺CD25⁺(**esquerda**) e CD4⁺CD25⁻ (**direita**) de indivíduos sadios (IS)(n = 5),pacientes R-MTX(n = 6) e UR-MTX(n = 6).Os gráficos representam a média ± SEM. *P < 0.05 comparado ao grupo IS.

5 - Avaliação dos receptores de Adenosina em leucócitos derivados do sangue de pacientes responsivos ou não ao MTX

Outro possível mecanismo de refratariedade de pacientes com AR ao tratamento com MTX poderia estar envolvido com a falha e/ou redução da expressão dos receptores de adenosina na superfície dos leucócitos de pacientes UR-MTX, principalmente os receptores A2a e A2b, os quais são descritos por desencadear a resposta antiinflamatória promovida pela adenosina nos leucócitos (Palmer & Trevethicky, 2008). Assim, através de análises por PCR em tempo real, mensuramos a expressão destes receptores em células de PBMC de pacientes com AR e indivíduos saudáveis.

Não encontramos diferenças na expressão dos receptores A2a e A2b (**Figuras 15A e 15B, respectivamente**) entre as células de PBMC isolados dos grupos analisados, demonstrando que a refratariedade de pacientes com AR submetidos ao tratamento com MTX é relacionada apenas com a geração e aporte de adenosina e não em seu local de atuação nas células inflamatórias,

Figura 15- Expressão dos receptores A2a e A2b em células de PBMC isolados de pacientes AR. Dados mostram a expressão dos receptores A2a(**A**) e A2b(**B**) em células de PBMC isolados de indivíduos saudáveis (IS)(n = 10), de pacientes R-MTX(n = 15) e UR-MTX(n = 21). Expressão relativa ao controle endógeno HPRT. Os gráficos representam a média $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ comparado ao grupo IS.

5- DISCUSSÃO

Os avanços na compreensão dos mecanismos envolvidos na patogênese da AR e da contribuição das vias de ativação da inflamação e destruição tecidual permitiram identificar novos alvos para o tratamento da doença. A utilização dos agentes biológicos direcionados contra moléculas envolvidas no desencadeamento da AR é vista como uma estratégia terapêutica eficaz na diminuição dos danos articulares e extra-articulares. Porém, a administração de baixas doses de MTX padrão ouro, fármaco integrante do grupo das DMARDs, consiste ainda na primeira linha de fármacos para o tratamento de pacientes com AR, principalmente para os recém-diagnosticados. O MTX apresenta uma eficácia significativa por longos períodos no controle dos danos teciduais associada com menores custos e praticidade na aplicação clínica quando comparado com a utilização dos agentes biológicos.

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). Dados na literatura sugerem que a eficácia terapêutica observada com a utilização do MTX foi decorrente de sua capacidade em manter os níveis extracelulares de adenosina elevados (Cronstein et al., 2005; Montesinos et al., 2007; Morabito et al., 1998). No presente estudo, nós demonstramos um mecanismo de refratariedade de pacientes com AR ao tratamento com MTX baseado no número de células Tregs circulantes e na contribuição deste subtipo leucocitário para a geração de adenosina extracelular pelas ectonucleotidases presentes em sua superfície. Mais especificamente, mostramos que o número de células Tregs do sangue periférico expressando a ectonucleotidase CD39 bem como os níveis de expressão deste marcador por célula são diferentes entre os grupos de pacientes responsivos ou não ao tratamento com MTX.

Nos últimos anos, os estudos das funções das células Tregs na autoimunidade tem se tornado alvo interessante para o desenvolvimento de novas terapias para doenças autoimunes (Anderson & Isaacs, 2008). Levando em conta a

capacidade supressora das Tregs em conter o desequilíbrio entre os sinais pró e antiinflamatórios da AR, trabalhos descrevem déficits no número desse subtipo celular presente tanto na circulação quanto na sinóvia de pacientes com AR (van Amelsfort et al., 2004; Mottonen 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 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). Além disso, estudos em modelos experimentais de AR mostram a importância das células Tregs no desenvolvimento da doença. Em modelo de artrite induzida por colágeno (CIA), a depleção de linfócitos TCD4⁺CD25⁺ piora os parâmetros sintomatológicos da doença, e em compensação, a transferência de células TCD4⁺CD25⁺ singênicas em camundongos depletados de células Tregs revertem o aumento da gravidade (Morgan et al., 2003; Kelchtermans et al., 2005).

Assim, novas estratégias para conter a inflamação da AR estão sendo testadas através da manipulação das células Tregs, seja para desenvolver drogas que possibilitem promover o crescimento e a sobrevivência de células Tregs *in vivo* ou isolando-as e expandindo-as *in vitro* para uma posterior transferência em indivíduos acometidos pela doença (Brusko et al., 2008). Em alguns casos, estudos demonstram que drogas disponíveis para tratamento da AR apresentam a capacidade de induzir a sobrevivência de subpopulações de células Tregs para o controle de inflamação. É o caso do infliximabe (anti-TNF), que restaura a função e interfere na sobrevivência de Tregs, aumentando a expressão de FoxP3 e diminuindo a expressão do receptor do tipo II de TNF- α . Ainda, a terapia com infliximabe, induz a diferenciação de uma nova população de Tregs, a qual exerce sua função supressora por mecanismos dependentes de TGF- β e IL-10 (Nadkarni et al., 2007). Diferente das Tregs naturais, as Tregs (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) induzidas pelo infliximabe perdem a expressão de CD62L. Interessante, apesar do fato destas células apresentarem uma potente atividade supressora *in vitro*, essas células

permanecem defectivas em pacientes refratários ao infliximab. No presente estudo, observamos um fenômeno similar com a administração do MTX, visto que pacientes responsivos ao MTX apresentaram um aumento no número de células Tregs (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) circulantes quando comparados com pacientes não responsivos e doadores saudáveis. Nossos achados permitem afirmar que a ocorrência de uma resposta farmacológica eficaz ao MTX está relacionada a uma indução do aumento de células Tregs circulantes. De fato, esses resultados confirmam dados em modelo experimental de CIA, os quais também descrevem um aumento de células Tregs no sangue periférico de camundongos tratados com MTX (Xinqiang et al., 2010).

A relação da eficácia terapêutica do MTX para tratamento da AR com a geração e aporte de adenosina extracelular foi pioneiramente demonstrada em nosso estudo. Através de uma fenotipagem geral de leucócitos oriundos de sangue periférico, verificamos que o aumento de células Tregs de pacientes respondedores estava associado simultaneamente com um aumento desta subpopulação celular expressando a ectonucleotidase CD39, enzima importante para degradação do ATP até AMP, e posterior geração de adenosina extracelular. O papel da adenosina na contribuição dos efeitos antiinflamatórios desencadeados pelo MTX é descrito em diversos estudos, dentre os quais mostram a participação dos receptores de adenosina A2a e A2b no desenvolvimento da resposta antiinflamatória do MTX *in vitro* e *in vivo* (Cronstein et al., 1991; Cronstein et al., 1993; Cronstein, 2010). Em adição a estes trabalhos, o efeito da cafeína, um antagonista do receptor A2a, desencadeia uma redução na eficácia do MTX em modelos experimentais de artrite, e é sugerido que sua elevada ingestão por pacientes também é associada com a refratariedade ao MTX (Nesher et al., 2003). Além disso, dados mostram uma maior expressão de receptores A2a e A2b em pacientes possuindo uma menor atividade da doença baseada no escore DAS28 (Varani et al., 2011), visto que a administração de agonistas de receptores A2a é demonstrada por diminuir a gravidade da doença em

modelo de CIA, através da redução dos níveis sistêmicos de IL-6, TNF- α , HMGB-1 e aumentando a IL-10 (Bitto et al., 2011).

Em relação à atividade do CD39 na geração de adenosina extracelular, recentes achados demonstram sua contribuição na amplificação dos efeitos antiinflamatórios causados pela adenosina (Reutershan et al., 2009; Moncrieffe et. al., 2010). Alterações na expressão do CD39 em PBMC isolado de humanos estão relacionadas a um pior prognóstico de doenças inflamatórias crônicas, como diabetes tipo 2 e colite ulcerativa (Enjoji et al., 2008; Friedman et al., 2009), e mais especificamente, relatos sugerem que estas alterações em células Tregs culminam em uma perda significativa de sua capacidade supressora, provocando o desencadeamento de processos autoimunes, como doença de Graves (Sauer et al., 2011). Os achados acima condizem com o que observamos neste estudo, pois além dos pacientes responsivos apresentarem uma frequência aumentada de células Tregs, também mostramos que células Tregs de pacientes refratários ao MTX apresentavam uma expressão reduzida de CD39 por célula, enquanto que a expressão de CD73 permaneceu similar entre as células Tregs dos grupos de pacientes analisados. Devido à menor expressão de CD39, houve uma falha na produção de adenosina extracelular pelas Tregs destes pacientes quando incubadas com ADP *in vitro*. Adicionalmente, estudos através de análises de polimorfismos genéticos no gene do CD39 poderão ser capazes de associar a expressão reduzida de CD39 em células Tregs de pacientes refratários.

Em adição, fatores envolvidos com alterações na cascata de sinalização celular de células que expressam a ectonucleotidase CD39 também podem contribuir com a redução da ectoenzima na superfície celular. Em um estudo de Liao et al. (2010), identificou-se o papel da sinalização via AMPc na regulação da expressão de CD39. Os dados mostram que a ativação de AMPc induz o aumento do RNAm de CD39 em macrófagos, cujo mecanismo descrito atua através da via PKA/CREB, PKA/PI3K/ATF2 e PKA/ERK/ATF2. Assim, pacientes não responsivos ao MTX podem apresentar falhas na

expressão ou tradução destas proteínas envolvidas na sinalização de AMPc, causando defeitos também na expressão de CD39 na superfície das Tregs.

O mecanismo pelo qual o MTX provoca aumento de células Tregs expressando CD39 ainda não está estabelecido, porém dados de estudos recentes nos permitem pressupor eventos que podem estar envolvidos neste fenômeno. Mais especificamente, Kochetkova et al. (2010) descreveram em modelo experimental de CIA o efeito causado pela estimulação com IL-35, citocina imunossupressora recém-descrita, induz células Tregs expressando a ectoenzima CD39, as quais atenuam a doença através deste mecanismo, que é dependente de IL-10. Com base nesses resultados, poderíamos hipotetizar que o MTX pode estar aumentando células Tregs expressando CD39 pelo efeito da IL-35. Porém, mais estudos se tornam necessários para o esclarecimento se esta indução da produção de IL-35 pelo MTX realmente ocorre, como a droga pode estar atuando na indução da liberação da citocina e qual seria a fonte celular responsável por esta liberação, visto que dados existentes na literatura mostram que a IL-35 não é produzida por células Tregs humanas (Bardel et al., 2008). Outros acontecimentos concomitantes também poderiam estar contribuindo para o aumento de células Tregs pelo MTX, como mecanismos de escape à apoptose de células Tregs oriundas de pacientes responsivos, os quais poderiam interferir com a ação de antagonista de folato exercida pelo MTX.

Estudos mostram a importância de células Tregs expressando CD39 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 contra respostas celulares de padrão Th17, sendo que a contribuição do desequilíbrio entre as respostas de Th17/TregCD39⁺ é sugerida no

desenvolvimento e exacerbação de processos autoimunes, inclusive na AR (Fletcher et al., 2009; Peelen et al., 2011).

De acordo com nossos resultados, nós demonstramos pela primeira vez que a geração de adenosina extracelular por pacientes refratários ao MTX está comprometida, mais especificamente a adenosina gerada por células Tregs. Um dos maiores obstáculos para a quantificação de adenosina é o fato de que sua conversão em inosina pela atividade da adenosina deaminase (ADA) no organismo é muito rápida (Franco et al., 2007). De fato, estudos têm encontrado dificuldades na determinação dos níveis de adenosina em sistemas biológicos, principalmente no plasma de seres humanos ou em modelos experimentais de doenças inflamatórias (Moser et. al., 1989). Nossos experimentos encontraram alternativas para a avaliação dos níveis de adenosina, nos quais através de análises no sobrenadante de cultura de células incubadas com ADP, conseguimos de maneira satisfatória estabelecer sua quantificação e verificar diferenças contundentes entre os grupos de pacientes.

Em síntese, nossos resultados demonstram que a deficiência de células Tregs, bem como a expressão de CD39 na geração de adenosina extracelular está relacionada com a refratariedade ao MTX. Com base nestes dados, seria plausível sugerir que administração de agonistas de receptores de adenosina ou de drogas com habilidade de induzir células Tregs e/ou expressão de CD39 gerarão novas perspectivas em intervenções terapêuticas na atenuação do processo inflamatório persistente na AR. Além disso, estes achados podem proporcionar uma melhora significativa na escolha dos fármacos rotineiramente utilizados para o tratamento da doença, como o MTX, visto que a avaliação da expressão CD39 na superfície de células Tregs circulantes pode representar um futuro biomarcador de responsividade ao MTX para o tratamento da AR e também de outras doenças inflamatórias crônicas.

6- CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apresentados demonstra um mecanismo de refratariedade de pacientes com AR submetidos ao tratamento com MTX. Em nossos achados mostramos que a eficácia terapêutica do MTX é relacionada a um aumento de células Tregs circulantes expressando a ectoenzima CD39. Em adição, pacientes não respondedores apresentam uma expressão reduzida de CD39 em células Tregs, culminando em um déficit dos efeitos antiinflamatórios mediados pelo MTX com base na manutenção dos níveis elevados de adenosina extracelular. Este estudo é de fundamental importância, pois fornece dados inéditos que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas na busca de tratamentos relacionados com a indução e funcionalidade de células Tregs, além de promover a otimização da escolha clínica das drogas disponíveis para o tratamento da AR.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aggarwal, P., S. Naik, et al. (2006). "Correlation between methotrexate efficacy & toxicity with C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate gene in rheumatoid arthritis patients on folate supplementation." Indian J Med Res **124**(5): 521-526.
- Alessandri, C., R. Priori, et al. (2008). "The role of anti-cyclic cytrullinate antibodies testing in rheumatoid arthritis." Clin Rev Allergy Immunol **34**(1): 45-49.
- Alonzi, T., E. Fattori, et al. (1998). "Impaired Stat3 activation following localized inflammatory stimulus in IL-6-deficient mice." Cytokine **10**(1): 13-18.
- Anderson, A. E. and J. D. Isaacs (2008). "Tregs and rheumatoid arthritis." Acta Reumatol Port **33**(1): 17-33.
- Arend, W. P. and J. M. Dayer (1995). "Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **38**(2): 151-160.
- Arner, E. C., R. R. Harris, et al. (1995). "Interleukin-1 receptor antagonist inhibits proteoglycan breakdown in antigen induced but not polyclonal induced arthritis in the rabbit." J Rheumatol **22**(7): 1338-1346.
- Arnett, F. C., S. M. Edworthy, et al. (1988). "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **31**(3): 315-324.
- Atarashi, K., J. Nishimura, et al. (2008). "ATP drives lamina propria T(H)17 cell differentiation." Nature **455**(7214): 808-812.
- Axmann, R., C. Bohm, et al. (2009). "Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo." Arthritis Rheum **60**(9): 2747-2756.
- Bansard, C., T. Lequerre, et al. (2009). "Can rheumatoid arthritis responsiveness to methotrexate and biologics be predicted?" Rheumatology (Oxford) **48**(9): 1021-1028.
- Bardel, E., F. Larousserie, et al. (2008). "Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35." J Immunol **181**(10): 6898-6905.
- Belkaid, Y. and B. T. Rouse (2005). "Natural regulatory T cells in infectious disease." Nat Immunol **6**(4): 353-360.
- Bettelli, E., T. Korn, et al. (2008). "Induction and effector functions of T(H)17 cells." Nature **453**(7198): 1051-1057.
- Birebent, B., R. Lorho, et al. (2004). "Suppressive properties of human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are dependent on CTLA-4 expression." Eur J Immunol **34**(12): 3485-3496.
- Bitto, A., F. Polito, et al. (2011). "Polydeoxyribonucleotide reduces cytokine production and the severity of collagen-induced arthritis by stimulation of adenosine A(A) receptor." Arthritis Rheum **63**(11): 3364-3371.
- Black, D. J. and R. B. Livingston (1990). "Antineoplastic drugs in 1990. A review (Part I)." Drugs **39**(4): 489-501.
- Bobbio-Pallavicini, F., R. Caporali, et al. (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**(3): 302-307.
- Boissier, M. C., E. Assier, et al. (2008). "Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm." Joint Bone Spine **75**(4): 373-375.
- Bongartz, T., T. Cantaert, et al. (2007). "Citruination in extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **46**(1): 70-75.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, et al. (2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." Blood **110**(4): 1225-1232.
- Brasington, R. D., Jr., L. E. Kahl, et al. (2003). "14. Immunologic rheumatic disorders." J Allergy Clin Immunol **111**(2 Suppl): S593-601.
- Braun-Moscovici, Y., D. Markovits, et al. (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**(3): 497-500.

- Bresnihan, B., R. Newmark, et al. (2004). "Effects of anakinra monotherapy on joint damage in patients with rheumatoid arthritis. Extension of a 24-week randomized, placebo-controlled trial." *J Rheumatol* **31**(6): 1103-1111.
- Brody, M., I. Bohm, et al. (1993). "Mechanism of action of methotrexate: experimental evidence that methotrexate blocks the binding of interleukin 1 beta to the interleukin 1 receptor on target cells." *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **31**(10): 667-674.
- Brusko, T. and J. Bluestone (2008). "Clinical application of regulatory T cells for treatment of type 1 diabetes and transplantation." *Eur J Immunol* **38**(4): 931-934.
- Chabaud, M., F. Fossiez, et al. (1998). "Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines." *J Immunol* **161**(1): 409-414.
- Chan, L. P. and R. Swaminathan (1986). "Adenosine triphosphate interferes with phosphate determination." *Clin Chem* **32**(10): 1981.
- Chen, W., W. Jin, et al. (2003). "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med* **198**(12): 1875-1886.
- Choy, E. H. and G. S. Panayi (2001). "Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis." *N Engl J Med* **344**(12): 907-916.
- Coffer, P. J. and B. M. Burgering (2004). "Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system." *Nat Rev Immunol* **4**(11): 889-899.
- Connolly, K. M., V. J. Stecher, et al. (1988). "Examination of interleukin-1 activity, the acute phase response, and leukocyte subpopulations in rats with adjuvant-induced arthritis." *J Lab Clin Med* **111**(3): 341-347.
- Cronstein, B. (2010). "How does methotrexate suppress inflammation?" *Clin Exp Rheumatol* **28**(5 Suppl 61): S21-23.
- Cronstein, B. N. (2005). "Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis." *Pharmacol Rev* **57**(2): 163-172.
- Cronstein, B. N., L. Daguma, et al. (1990). "The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively." *J Clin Invest* **85**(4): 1150-1157.
- Cronstein, B. N., M. A. Eberle, et al. (1991). "Methotrexate inhibits neutrophil function by stimulating adenosine release from connective tissue cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6): 2441-2445.
- Cronstein, B. N., S. B. Kramer, et al. (1985). "Adenosine modulates the generation of superoxide anion by stimulated human neutrophils via interaction with a specific cell surface receptor." *Ann N Y Acad Sci* **451**: 291-301.
- Cronstein, B. N., D. Naime, et al. (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**(6): 2675-2682.
- Cua, D. J., J. Sherlock, et al. (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." *Nature* **421**(6924): 744-748.
- Curtis, J. R., S. Yang, et al. (2012). "Predicting low disease activity and remission using early treatment response to antitumour necrosis factor therapy in patients with rheumatoid arthritis: exploratory analyses from the TEMPO trial." *Ann Rheum Dis* **71**(2): 206-212.
- Cutolo, M., A. Sulli, et al. (2001). "Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis." *Ann Rheum Dis* **60**(8): 729-735.
- Deaglio, S., K. M. Dwyer, 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.
- Dessein, P. H., B. I. Joffe, et al. (2005). "Traditional and nontraditional cardiovascular risk factors are associated with atherosclerosis in rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **32**(3): 435-442.

- Dinarello, C. A. (2000). "The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1." *N Engl J Med* **343**(10): 732-734.
- Dissick, A., R. S. Redman, et al. (2010). "Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study." *J Periodontol* **81**(2): 223-230.
- Doran, M. F., C. S. Crowson, et al. (2004). "The effect of oral contraceptives and estrogen replacement therapy on the risk of rheumatoid arthritis: a population based study." *J Rheumatol* **31**(2): 207-213.
- Enjyoji, K., K. Kotani, et al. (2008). "Deletion of cd39/entpd1 results in hepatic insulin resistance." *Diabetes* **57**(9): 2311-2320.
- Fan, P. T. and K. H. Leong (2007). "The use of biological agents in the treatment of rheumatoid arthritis." *Ann Acad Med Singapore* **36**(2): 128-134.
- Firestein, G. S. (2003). "Evolving concepts of rheumatoid arthritis." *Nature* **423**(6937): 356-361.
- Fleischmann, R. M., J. Schechtman, et al. (2003). "Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: A large, international, multicenter, placebo-controlled trial." *Arthritis Rheum* **48**(4): 927-934.
- Fletcher, J. M., R. Lonergan, et al. (2009). "CD39+Foxp3+ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis." *J Immunol* **183**(11): 7602-7610.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-336.
- Franco, R., R. Pacheco, et al. (2007). "Enzymatic and extraenzymatic role of adenosine deaminase 1 in T-cell-dendritic cell contacts and in alterations of the immune function." *Crit Rev Immunol* **27**(6): 495-509.
- Friedman, D. J., B. M. Kunzli, et al. (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**(39): 16788-16793.
- Friesen, C., I. Herr, et al. (1996). "Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells." *Nat Med* **2**(5): 574-577.
- Fugger, L. and A. Svejgaard (2000). "Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men." *Arthritis Res* **2**(3): 208-211.
- Geng, Y., J. Valbracht, et al. (1996). "Selective activation of the mitogen-activated protein kinase subgroups c-Jun NH2 terminal kinase and p38 by IL-1 and TNF in human articular chondrocytes." *J Clin Invest* **98**(10): 2425-2430.
- Genovese, M. C., J. C. Becker, et al. (2005). "Abatacept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition." *N Engl J Med* **353**(11): 1114-1123.
- Ghodke, Y., A. Chopra, et al. (2008). "Are Thymidylate synthase and Methylene tetrahydrofolate reductase genes linked with methotrexate response (efficacy, toxicity) in Indian (Asian) rheumatoid arthritis patients?" *Clin Rheumatol* **27**(6): 787-789.
- Goldring, S. R. (2002). "Bone and joint destruction in rheumatoid arthritis: what is really happening?" *J Rheumatol Suppl* **65**: 44-48.
- Goldring, S. R. (2003). "Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis." *Rheumatology (Oxford)* **42 Suppl 2**: ii11-16.
- Grabar, P. B., S. Rojko, et al. (2010). "Genetic determinants of methotrexate treatment in rheumatoid arthritis patients: a study of polymorphisms in the adenosine pathway." *Ann Rheum Dis* **69**(5): 931-932.
- Habash-Bseiso, D. E., S. H. Yale, et al. (2005). "Serologic testing in connective tissue diseases." *Clin Med Res* **3**(3): 190-193.
- Harris, E. D., Jr. (1990). "Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy." *N Engl J Med* **322**(18): 1277-1289.
- Harty, L. C. and D. J. Veale (2010). "Irish smokers with rheumatoid arthritis suffer more than their nonsmoking counterparts." *J Rheumatol* **37**(5): 1062; author reply 1063.

- Heliovaara, M., K. Aho, et al. (1993). "Smoking and risk of rheumatoid arthritis." J Rheumatol **20**(11): 1830-1835.
- Hider, S. L., W. Thomson, et al. (2008). "Polymorphisms within the adenosine receptor 2a gene are associated with adverse events in RA patients treated with MTX." Rheumatology (Oxford) **47**(8): 1156-1159.
- Hoovestol, R. A. and T. R. Mikuls (2011). "Environmental exposures and rheumatoid arthritis risk." Curr Rheumatol Rep **13**(5): 431-439.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-1061.
- Hwang, S. Y. and H. Y. Kim (2005). "Expression of IL-17 homologs and their receptors in the synovial cells of rheumatoid arthritis patients." Mol Cells **19**(2): 180-184.
- Infante-Duarte, C., H. F. Horton, et al. (2000). "Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells." J Immunol **165**(11): 6107-6115.
- Jonsson, I. M., M. Verdrengh, et al. (2007). "Ethanol prevents development of destructive arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(1): 258-263.
- Joosten, L. A., M. M. Helsen, et al. (2008). "Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: a comparative study using anti-TNFalpha, anti-IL-1alpha/beta and IL-1Ra." Arthritis Rheum **58**(2 Suppl): S110-122.
- Jovanovic, D. V., J. A. Di Battista, et al. (2001). "Modulation of TIMP-1 synthesis by antiinflammatory cytokines and prostaglandin E2 in interleukin 17 stimulated human monocytes/macrophages." J Rheumatol **28**(4): 712-718.
- Jovanovic, D. V., J. Martel-Pelletier, et al. (2000). "Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(5): 1134-1144.
- Katz, P. P. and A. Neugebauer (2001). "Does satisfaction with abilities mediate the relationship between the impact of rheumatoid arthritis on valued activities and depressive symptoms?" Arthritis Rheum **45**(3): 263-269.
- Kelchtermans, H., B. De Klerck, et al. (2005). "Defective CD4+CD25+ regulatory T cell functioning in collagen-induced arthritis: an important factor in pathogenesis, counter-regulated by endogenous IFN-gamma." Arthritis Res Ther **7**(2): R402-415.
- Kelchtermans, H., L. Geboes, et al. (2009). "Activated CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit osteoclastogenesis and collagen-induced arthritis." Ann Rheum Dis **68**(5): 744-750.
- Keller, C., A. Webb, et al. (2003). "Cytokines in the seronegative spondyloarthropathies and their modification by TNF blockade: a brief report and literature review." Ann Rheum Dis **62**(12): 1128-1132.
- Kim, J. M., J. G. Jeong, et al. (2003). "Protection against collagen-induced arthritis by intramuscular gene therapy with an expression plasmid for the interleukin-1 receptor antagonist." Gene Ther **10**(18): 1543-1550.
- Kinloch, A., K. Lundberg, et al. (2008). "Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis." Arthritis Rheum **58**(8): 2287-2295.
- Kleinschek, M. A., A. M. Owyang, et al. (2007). "IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation." J Exp Med **204**(1): 161-170.
- Kobayashi, S., S. Momohara, et al. (2008). "Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors." FEBS J **275**(18): 4456-4462.
- Kobie, J. J., P. R. Shah, et al. (2006). "T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine." J Immunol **177**(10): 6780-6786.
- Kochetkova, I., S. Golden, et al. (2010). "IL-35 stimulation of CD39+ regulatory T cells confers protection against collagen II-induced arthritis via the production of IL-10." J Immunol **184**(12): 7144-7153.
- Koshiba, M., H. Kojima, et al. (1997). "Memory of extracellular adenosine A2A purinergic receptor-mediated signaling in murine T cells." J Biol Chem **272**(41): 25881-25889.

- Kotake, S., N. Udagawa, et al. (1999). "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis." *J Clin Invest* **103**(9): 1345-1352.
- Kremer, J. M. (2005). "Selective costimulation modulators: a novel approach for the treatment of rheumatoid arthritis." *J Clin Rheumatol* **11**(3 Suppl): S55-62.
- Kremer, J. M., R. Blanco, et al. (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): 609-621.
- Kremer, J. M., R. Westhovens, et al. (2003). "Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig." *N Engl J Med* **349**(20): 1907-1915.
- Kumagai, K., K. Hiyama, et al. (2003). "Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis." *Int J Mol Med* **11**(5): 593-600.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* **201**(2): 233-240.
- Lappas, C. M., G. W. Sullivan, et al. (2005). "Adenosine A2A agonists in development for the treatment of inflammation." *Expert Opin Investig Drugs* **14**(7): 797-806.
- Levings, M. K., R. Sangregorio, et al. (2002). "Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells." *J Exp Med* **196**(10): 1335-1346.
- Li, Y., L. Jiang, et al. (2011). "Methotrexate attenuates the Th17/IL-17 levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and RA patients." *Rheumatol Int*.
- Liao, H., M. C. Hyman, et al. (2010). "cAMP/CREB-mediated transcriptional regulation of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39) expression." *J Biol Chem* **285**(19): 14791-14805.
- Lindley, S., C. M. Dayan, et al. (2005). "Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes." *Diabetes* **54**(1): 92-99.
- Lodder, M. C., G. Haugeberg, et al. (2003). "Radiographic damage associated with low bone mineral density and vertebral deformities in rheumatoid arthritis: the Oslo-Truro-Amsterdam (OSTRA) collaborative study." *Arthritis Rheum* **49**(2): 209-215.
- Lubberts, E. (2008). "IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis?" *Cytokine* **41**(2): 84-91.
- Lubberts, E., L. A. Joosten, et al. (2000). "Reduction of interleukin-17-induced inhibition of chondrocyte proteoglycan synthesis in intact murine articular cartilage by interleukin-4." *Arthritis Rheum* **43**(6): 1300-1306.
- Makrygiannakis, D., M. Hermansson, et al. (2008). "Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells." *Ann Rheum Dis* **67**(10): 1488-1492.
- Manzotti, C. N., M. K. Liu, et al. (2006). "Integration of CD28 and CTLA-4 function results in differential responses of T cells to CD80 and CD86." *Eur J Immunol* **36**(6): 1413-1422.
- McInnes, I. B. and G. Schett (2007). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Nat Rev Immunol* **7**(6): 429-442.
- Mease, P. J. and C. E. Antoni (2005). "Psoriatic arthritis treatment: biological response modifiers." *Ann Rheum Dis* **64** Suppl 2: ii78-82.
- Mills, K. H. (2004). "Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection?" *Nat Rev Immunol* **4**(11): 841-855.
- Moncrieffe, H., K. Nistala, et al. (2010). "High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population." *J Immunol* **185**(1): 134-143.

- Montesinos, M. C., M. Takedachi, 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.
- Morabito, L., M. C. Montesinos, et al. (1998). "Methotrexate and sulfasalazine promote adenosine release by a mechanism that requires ecto-5'-nucleotidase-mediated conversion of adenine nucleotides." J Clin Invest **101**(2): 295-300.
- Moreland, L. W., M. H. Schiff, et al. (1999). "Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial." Ann Intern Med **130**(6): 478-486.
- Moser, G. H., J. Schrader, et al. (1989). "Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood." Am J Physiol **256**(4 Pt 1): C799-806.
- Mottonen, M., J. Heikkinen, et al. (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**(2): 360-367.
- Mueller, L., L. V. Seggern, et al. (2010). "TNF-alpha similarly induces IL-6 and MCP-1 in fibroblasts from colorectal liver metastases and normal liver fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun.
- Munn, D. H., A. L. Mellor, et al. (2005). "Dendritic cells have the option to express IDO-mediated suppression or not." Blood **105**(6): 2618.
- Nadkarni, S., C. Mauri, et al. (2007). "Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta." J Exp Med **204**(1): 33-39.
- Naganuma, M., E. B. Wiznerowicz, et al. (2006). "Cutting edge: Critical role for A2A adenosine receptors in the T cell-mediated regulation of colitis." J Immunol **177**(5): 2765-2769.
- Nesher, G., M. Mates, et al. (2003). "Effect of caffeine consumption on efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **48**(2): 571-572.
- Nishimura, E., T. Sakihama, et al. (2004). "Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells." Int Immunol **16**(8): 1189-1201.
- Nishimura, K., D. Sugiyama, et al. (2007). "Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis." Ann Intern Med **146**(11): 797-808.
- Nistala, K., S. Adams, et al. (2010). "Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(33): 14751-14756.
- Nozaki, Y., Y. Nagare, et al. (2010). "Therapeutic strategy and significance of serum rheumatoid factor in patients with rheumatoid arthritis during infliximab treatment." Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi **33**(3): 135-141.
- Okuda, Y., S. Sakoda, et al. (1998). "IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein." Int Immunol **10**(5): 703-708.
- Ostroukhova, M. and A. Ray (2005). "CD25+ T cells and regulation of allergen-induced responses." Curr Allergy Asthma Rep **5**(1): 35-41.
- Peelen, E., J. Damoiseaux, et al. (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.
- Pikwer, M., U. Bergstrom, et al. (2009). "Breast feeding, but not use of oral contraceptives, is associated with a reduced risk of rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **68**(4): 526-530.
- Powrie, F. (2004). "Immune regulation in the intestine: a balancing act between effector and regulatory T cell responses." Ann N Y Acad Sci **1029**: 132-141.
- Pullman-Mooar, S., M. Laposata, et al. (1990). "Alteration of the cellular fatty acid profile and the production of eicosanoids in human monocytes by gamma-linolenic acid." Arthritis Rheum **33**(10): 1526-1533.

- Rantapaa-Dahlqvist, S., B. A. de Jong, et al. (2003). "Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **48**(10): 2741-2749.
- Reparon-Schuijt, C. C., W. J. van Esch, et al. (2001). "Secretion of anti-citrulline-containing peptide antibody by B lymphocytes in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **44**(1): 41-47.
- Reutershan, J., I. Vollmer, 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.
- 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**(3): 270-275.
- Riise, T., B. K. Jacobsen, et al. (2001). "Total mortality is increased in rheumatoid arthritis. A 17-year prospective study." Clin Rheumatol **20**(2): 123-127.
- Rohn, W., L. P. Tang, et al. (1999). "IL-1 beta inhibits IFN-gamma-induced class II MHC expression by suppressing transcription of the class II transactivator gene." J Immunol **162**(2): 886-896.
- Ronchetti, S., G. Nocentini, et al. (2002). "Role of GITR in activation response of T lymphocytes." Blood **100**(1): 350-352.
- Rose, N. R., A. Herskowitz, et al. (1993). "Autoimmunity in myocarditis: models and mechanisms." Clin Immunol Immunopathol **68**(2): 95-99.
- Saboori, A. M., N. R. Rose, et al. (1995). "Amino acid sequence of a tryptic peptide of human thyroglobulin reactive with sera of patients with thyroid diseases." Autoimmunity **22**(2): 87-94.
- Saevarsdottir, S., S. Wedren, et al. (2011). "Patients with early rheumatoid arthritis who smoke are less likely to respond to treatment with methotrexate and tumor necrosis factor inhibitors: observations from the Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis and the Swedish Rheumatology Register cohorts." Arthritis Rheum **63**(1): 26-36.
- Sasaki, M., D. Ostanin, et al. (2003). "TNF-alpha -induced endothelial cell adhesion molecule expression is cytochrome P-450 monooxygenase dependent." Am J Physiol Cell Physiol **284**(2): C422-428.
- Sauer, A. V., I. Brigida, et al. (2012). "Alterations in the adenosine metabolism and CD39/CD73 adenosinergic machinery cause loss of Treg cell function and autoimmunity in ADA-deficient SCID." Blood **119**(6): 1428-1439.
- Schnurr, M., F. Then, et al. (2000). "Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells." J Immunol **165**(8): 4704-4709.
- Seitz, M. (1999). "Molecular and cellular effects of methotrexate." Curr Opin Rheumatol **11**(3): 226-232.
- Seitz, M., P. Loetscher, et al. (1996). "Interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist, soluble tumor necrosis factor receptors, IL-1 beta, and IL-8--markers of remission in rheumatoid arthritis during treatment with methotrexate." J Rheumatol **23**(9): 1512-1516.
- Seitz, M., M. Zwicker, et al. (1998). "Effects of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes." Arthritis Rheum **41**(11): 2032-2038.
- Silman, A. J. and J. E. Pearson (2002). "Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S265-272.
- Smolen, J. S., F. C. Breedveld, et al. (1995). "Validity and reliability of the twenty-eight-joint count for the assessment of rheumatoid arthritis activity." Arthritis Rheum **38**(1): 38-43.
- Spurlock, C. F., 3rd, Z. T. Aune, et al. (2011). "Increased sensitivity to apoptosis induced by methotrexate is mediated by JNK." Arthritis Rheum **63**(9): 2606-2616.

- Steiner, G. (2007). "Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: pathogenetic players and diagnostic tools." Clin Rev Allergy Immunol **32**(1): 23-36.
- Stolt, P., C. Bengtsson, et al. (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**(9): 835-841.
- Suri-Payer, E., A. Z. Amar, et al. (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**(3): 1212-1218.
- Symmons, D. P., E. M. Barrett, et al. (1994). "The incidence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: results from the Norfolk Arthritis Register." Br J Rheumatol **33**(8): 735-739.
- Tak, P. P. and J. R. Kalden (2011). "Advances in rheumatology: new targeted therapeutics." Arthritis Res Ther **13 Suppl 1**: S5.
- Takahashi, T., T. Tagami, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J Exp Med **192**(2): 303-310.
- Tanchot, C., F. Vasseur, et al. (2004). "Immune regulation by self-reactive T cells is antigen specific." J Immunol **172**(7): 4285-4291.
- Tang, Q., E. K. Boden, et al. (2004). "Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function." Eur J Immunol **34**(11): 2996-3005.
- Thiel, M., J. D. Chambers, et al. (1996). "Effect of adenosine on the expression of beta(2) integrins and L-selectin of human polymorphonuclear leukocytes in vitro." J Leukoc Biol **59**(5): 671-682.
- Thiel, M. and A. Chouker (1995). "Acting via A2 receptors, adenosine inhibits the production of tumor necrosis factor-alpha of endotoxin-stimulated human polymorphonuclear leukocytes." J Lab Clin Med **126**(3): 275-282.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (2000). "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." J Immunol **164**(1): 183-190.
- Trentham, D. E., R. A. Dynesius-Trentham, et al. (1993). "Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis." Science **261**(5129): 1727-1730.
- van Amelsfort, J. M., K. M. Jacobs, et al. (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**(9): 2775-2785.
- van den Berg, W. B., L. A. Joosten, et al. (1999). "TNF alpha and IL-1 beta are separate targets in chronic arthritis." Clin Exp Rheumatol **17**(6 Suppl 18): S105-114.
- van Roon, J. A., J. W. Bijlsma, et al. (2006). "Diversity of regulatory T cells to control arthritis." Best Pract Res Clin Rheumatol **20**(5): 897-913.
- Varani, K., M. Padovan, et al. (2011). "A2A and A3 adenosine receptor expression in rheumatoid arthritis: upregulation, inverse correlation with disease activity score and suppression of inflammatory cytokine and metalloproteinase release." Arthritis Res Ther **13**(6): R197.
- Verbsky, J. W. and A. J. White (2004). "Effective use of the recombinant interleukin 1 receptor antagonist anakinra in therapy resistant systemic onset juvenile rheumatoid arthritis." J Rheumatol **31**(10): 2071-2075.
- Vieira, P. L., J. R. Christensen, et al. (2004). "IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells." J Immunol **172**(10): 5986-5993.
- Viglietta, V., C. Baecher-Allan, et al. (2004). "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." J Exp Med **199**(7): 971-979.
- Vossenaar, E. R., A. J. Zendman, et al. (2004). "Citruination, a possible functional link between susceptibility genes and rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **6**(1): 1-5.

- Wallberg-Jonsson, S., M. L. Ohman, et al. (1997). "Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden." J Rheumatol **24**(3): 445-451.
- Wang, Q., Y. Ma, et al. (2011). "The roles of B cells and their interactions with fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Int Arch Allergy Immunol **155**(3): 205-211.
- Weinblatt, M. E., J. S. Coblyn, et al. (1985). "Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis." N Engl J Med **312**(13): 818-822.
- Wesoly, J., J. A. Wessels, et al. (2006). "Genetic markers of treatment response in rheumatoid arthritis." Curr Rheumatol Rep **8**(5): 369-377.
- Wessels, J. A., W. M. Kooloos, et al. (2006). "Relationship between genetic variants in the adenosine pathway and outcome of methotrexate treatment in patients with recent-onset rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **54**(9): 2830-2839.
- Weyand, C. M., Y. M. Kang, et al. (2003). "The power of the third dimension: tissue architecture and autoimmunity in rheumatoid arthritis." Curr Opin Rheumatol **15**(3): 259-266.
- Xinqiang, S., L. Fei, et al. (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**(7): 463-471.
- Zwerina, J., K. Redlich, et al. (2007). "TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(28): 11742-11747.

8- ANEXOS

Anexo 1

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 ☐ Hepatotxicidade ☐ Nefrototoxicidade ☐ Intolerância GI
- ☐ Infeciosos (☐ 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: _____