

**Caracterização fenotípica e funcional de subpopulações de  
linfócitos T CD8<sup>+</sup> em Sangue Periférico e Líquido Sinovial de  
doentes de Artrite Reumatóide e quantificação de Citocinas e  
Quimiocinas no Soro desses doentes**

**Sandra Cristina Silva Cardoso**

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia*

Orientada por

**Maria Margarida Souto Carneiro**

**Anabela Rodrigues Lourenço Martins**

**Maria José Alves**

**Bragança**

**2011**

*Aos meus pais e à minha irmã,  
a quem devo tudo aquilo que sou*

## **AGRADECIMENTOS**

Começo por deixar o meu agradecimento às minhas orientadoras, Doutora Margarida Souto Carneiro, Doutora Anabela R. Lourenço Martins e Doutora Maria José Alves pela orientação, apoio, ensinamentos e disponibilidade prestada durante a concretização do estudo e escrita da dissertação final.

Ao Instituto Politécnico de Bragança, por todos os meios disponibilizados ao longo de toda a minha formação académica.

Ao Centro de Neurociências e Biologia Celular de Coimbra pelo acolhimento e permissão de utilização de todos os recursos necessários à realização do trabalho laboratorial.

Ao Instituto Português do Sangue quero expressar a minha sincera gratidão por ter permitido a realização deste estudo através da constituição do grupo de indivíduos controlo.

Agradeço muito à Unidade de Reumatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra por ter viabilizado a realização deste trabalho de investigação, em particular nas pessoas do seu Director do Serviço de Reumatologia, Professor Doutor José A. Pereira da Silva e da Doutora Cátia Duarte.

Um especial agradecimento ao Professor Doutor José A. Pereira da Silva, que para além da amizade, preocupação e disponibilidade constantes, foi o principal responsável pela oportunidade que tive de conhecer pessoas fantásticas com quem trabalhei, assim como de aplicar os conhecimentos adquiridos na investigação clínica. À Dra. Cátia agradeço toda a disponibilidade e apoio clínico dedicado durante o estudo, assim como na análise bioestatística e na compreensão dos resultados obtidos durante as várias fases.

Às pessoas fantásticas de que falo, à Helena Carvalheiro, ao Tiago Sousa, ao David Antunes, à Milene Gonçalves, à Valeria Bisio e ao Giuseppe Loiacò, elementos do Grupo de Imunologia do CNC de Coimbra onde realizei este trabalho, e à Susana Carmona, Taissa Pereira e Aurea Tiago, obrigada por todos os momentos inesquecíveis que me proporcionaram. Especialmente à Helena Carvalheiro, que me permitiu acompanhar o seu projecto de doutoramento, compartilhando toda a sua experiência, o que foi fundamental para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos que conheci em Bragança, especialmente às minhas confidentes Margarida Goret e M. Adelaide Oliveira, ao Evanildo Monteiro, à Catarina Monteiro, à M. Inês Dias, à Arminda Carvalho, ao Artur e à Andreia Amaro, por todo o apoio nos momentos menos fáceis e pelas saudades que deixam dos bons momentos!

Quero deixar o meu imenso “OBRIGADO” aos meus amigos de sempre, Vanessa Fernandes, Ana Marques, Mauro Soares, Carolina Correia, Sara Abreu, Dárcio Sousa, Lourdes Vieira, Sofia Santos, António Azevedo, Liliana Nogueira, Letícia Nunes, Tânia Marques e Hugo Figueiredo por toda a diferença que fizeram na minha vida, “ADORO-VOS MUITO”.

Aos meus pais por todas as oportunidades que me deram, por terem sempre confiado em mim, pela educação, apoio, compreensão, preocupação e segurança, um muito obrigado. Agradeço especialmente à minha mãe pelo infindável amor e carinho que sempre me deu. A duas grandes amigas, Fernanda e Luzinha, pela educação, ensinamentos e amor imensurável que me dão, serão sempre as minhas segundas mães. À minha Madrinha por todo o apoio, carinho e amizade que sempre me deu.

À minha irmã Lúcia, obrigada por seres única, fantástica e simplesmente a “Melhor irmã do Mundo”.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a concretização deste trabalho, um sincero obrigado.

## ABREVIATURAS

Ac - Anticorpo

ACPA – Anticorpos Anti-proteína Citrulinados

ACR – Colégio Americano de Reumatologia

APC – Aloficocianina

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos

AR – Artrite Reumatóide

CCR7 – Receptor de Quimiocina C-C do tipo 7 (do inglês, *Chemokine (C-C motif) Receptor type 7*)

CBAs - *Cytometric Beads Array*

CD – Grupo de diferenciação (do inglês, *Cluster of Differentiation*)

Células *NK* – Células *Natural Killer*

CIA – Artrite Induzida por Colagénio (do inglês, *Collagen-Induced Arthritis*)

CF – Citometria de Fluxo

CTLA-4 – Antígeno 4 dos Linfócitos T citotóxicos (do inglês, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*)

CTLs – Linfócitos T Citotóxicos

CXCL12 – Quimiocina CXCL12 (do inglês, *chemokine (C-X-C motif) ligand 12*)

CXCR4 – Receptor de Quimiocina CXC do tipo 4 (do inglês, *CXC chemokine receptor type 4*)

DAS28 – Escala de Actividade da Doença 28 (do inglês, *Disease Activity Score 28*)

DMARDs - Medicamentos Anti-Reumáticos Modificadores da Doença (do inglês, *Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*)

EULAR – Liga Europeia Contra o Reumatismo

FITC – Isotiocianato de Fluorescência

FR – Factor Reumatóide

FSC – Ângulo de dispersão frontal (do inglês, *Forward Angle Light Scatter*)

GZMB – Granzima B (do inglês, *Granzyme B*)

HUC – Hospital Universitário de Coimbra

IFN- $\gamma$  – Interferão Gama

Ig – Imunoglobulina

IL-1 $\alpha$  – Interleucina 1 alfa

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 beta

IL-10 – Interleucina 10

IL-17 – Interleucina 17

IL-23 – Interleucina 23  
IL-5 – Interleucina 5  
IL-6 – Interleucina 6  
IL-7 – Interleucina 7  
IL-8 – Interleucina 8  
IL-1Ra – Receptor Antagonista da IL-1  
IL-XR – Receptor da Interleucina X  
IPS – Instituto Português do Sangue  
LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico  
LS – Líquido Sinovial  
mAb – Anticorpos Monoclonais  
MCP-1 – Proteína Quimiotáctica de Monócitos 1 (do inglês, *Monocyte chemotactic protein-1*)  
MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*)  
MIP-1 - Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 (do inglês, *Macrophage Inflammatory Proteins*)  
MIG - Quimiocina induzida pelo IFN- $\gamma$  (do inglês, *Monokine Induced by Interferon-Gamma*)  
MMP – Metaloproteinases  
mRNA – Ácido Ribonucleico mensageiro  
MTX - Metotrexato  
OA - Osteoartrite  
OLP – Órgãos Linfóides Primários  
OLS – Órgãos Linfóides Secundários  
PBS – Tampão fosfato-salino  
PCR – Proteína C Reactiva  
PE – Ficoeritrina  
PE/CY5 – Ficoeritrina-Cianina 5  
PRF1 – Perforina (do inglês, *Perforin*)  
RIA – Resposta Imunológica Adaptativa ou Adquirida  
RII – Resposta Imunológica Inata ou Natural  
RNA – Ácido Ribonucleico  
SAA - Soro Amilóide A  
SDF-1 - Factor 1 Derivado do Estroma (do inglês, *Stromal cell-derived factor-1*)

SI – Sistema Imunitário

SP – Sangue Periférico

SSC – Ângulo de dispersão lateral (do inglês, *Side Scatter*)

TCR – Receptor de Células T (do inglês, *T cell receptor*)

T<sub>E</sub> – Células T efectoras

T<sub>ES</sub> – Células T efectoras de curta duração

TGF- $\beta$  – Factor de crescimento tumoral beta (do inglês, *Transforming Growth Factor beta*)

Th – Células T auxiliares (do inglês, *T helper*)

Th1 – Células T auxiliares do tipo 1 (do inglês, *T helper 1*)

Th17 – Células T auxiliares do tipo 17, (do inglês, *T helper 17*)

Th2 – Células T auxiliares do tipo 2 (do inglês, *T helper 2*)

T<sub>M</sub> – Células T de memória

T<sub>MC</sub> – Células T de Memória Central

T<sub>ME</sub> – Células T de Memória Efectora

TNF- $\alpha$  – Factor de Necrose Tumoral alfa (do inglês, *Tumor Necrosis Factor alpha*)

TNF-R – Receptor do TNF

Treg – Células T reguladoras (do inglês, *Regulatory T cells*)

VHS – Velocidade de Hemossedimentação

# ÍNDICE

<b>CAPITULO 1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 Artrite Reumatóide</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.1 Articulação na AR</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.2 Diagnóstico e Terapêuticas no tratamento da AR</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 Sistema Imunitário</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.1 Resposta Imunológica Inata e Adaptativa</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.2 Linfócitos T</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 Linfócitos T CD8<sup>+</sup></b> .....	<b>7</b>
<b>1.4 Linfócitos T CD8<sup>+</sup> e Artrite Reumatóide</b> .....	<b>10</b>
<b>1.5 Citocinas e Quimiocinas na Reacção Inflamatória e na Artrite Reumatóide</b>	<b>11</b>
<b>1.5.1 TNF-<math>\alpha</math>, IL-6, IL-1</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5.2 IL-10, IL-17, IFN-<math>\gamma</math></b> .....	<b>14</b>
<b>1.5.3 Quimiocinas</b> .....	<b>17</b>
<b>1.6 Objectivos</b> .....	<b>21</b>
<b>CAPITULO 2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1 Materiais</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.1 Tampões e Reagentes</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.2 Anticorpos para CF</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1.3 KITs de Quantificação de Citocinas e Quimiocinas</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2 Métodos</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.1 Doentes em estudo</b> .....	<b>24</b>
<b>2.2.2 Grupo controlo</b> .....	<b>25</b>
<b>2.2.3 Processamento do SP (doentes de AR e controlos) e do LS para a</b> <b>caracterização fenotípica das células T CD8<sup>+</sup></b> .....	<b>26</b>
<b>2.2.4 Quantificação da concentração de Citocinas e Quimiocinas no soro de</b> <b>doentes de AR por um imunoensaio baseado na utilização de microesferas, CBAs</b> <b>(Cytometric Bead Array).</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2.5 Análise por CF</b> .....	<b>29</b>
<b>2.2.6 Análise estatística</b> .....	<b>30</b>
<b>CAPITULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 Resultados da caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos</b> <b>CD8<sup>+</sup> em SP e LS de doentes de AR e estudo das alterações das mesmas</b> <b>subpopulações devido à terapêutica com MTX</b> .....	<b>33</b>

<b>3.1.1</b>	<b>Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> - Estudo comparativo entre AR e Controlos saudáveis a partir de SP .....</b>	<b>33</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> - Estudo comparativo entre AR com doença em remissão e AR com doença activa a partir de SP .....</b>	<b>35</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> - Estudo comparativo entre SP e LS de doentes de AR.....</b>	<b>36</b>
	<b>Frequência de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de citocinas.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Discussão dos resultados obtidos respectivos à caracterização fenotípica das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> feita a partir dos vários estudos realizados em SP e LS de doentes de AR e controlos saudáveis.....</b>	<b>37</b>
	a. Subpopulação de células Activadas .....	38
	b. Subpopulações de células T CD8 <sup>+</sup> efectoras activadas.....	41
	c. Subpopulação de células T CD8 <sup>+</sup> de memória.....	41
	d. Receptores de Homing .....	44
	e. Expressão intracelular de citocinas pelas células T CD8 <sup>+</sup> .....	47
<b>3.1.5</b>	<b>Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em SP- Estudo comparativo entre dois grupos de doentes de AR sem e com a terapêutica de MTX .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Correlação dos níveis de citocinas intracelulares expressas pelas células T CD8<sup>+</sup> no SP e correlações dos níveis das mesmas citocinas no LS de doentes de AR .</b>	<b>54</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Correlação das várias populações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em estudo, entre SP e LS de doentes de AR.....</b>	<b>56</b>
<b>3.2</b>	<b>Quantificação de citocinas e quimiocinas em soro de doentes de AR (com diferentes actividade da doença) e análise do efeito da terapêutica com MTX na sua expressão .....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Quantificação da concentração de citocinas no soro de doentes de AR e comparação com indivíduos controlo .....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Quantificação da concentração de citocinas no soro de doentes de AR com diferente actividade da doença, e comparação entre ambos .....</b>	<b>58</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Quantificação da concentração de citocinas no soro de doentes de AR aos quais não foi administrado MTX e de doentes de AR que seguiram o tratamento com MTX, e comparação entre ambos .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Quantificação da concentração de quimiocinas no soro de doentes de AR e comparação com indivíduos Controlo .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Quantificação da concentração de quimiocinas no soro de doentes de AR com diferente actividade da doença, e comparação estatística entre ambos .....</b>	<b>61</b>

<b>3.2.6</b>	<b>Quantificação da concentração de quimiocinas no soro de doentes de AR aos quais não foi administrado MTX e de doentes de AR que seguiram o tratamento com MTX, e comparação entre ambos .....</b>	<b>61</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Discussão dos resultados de quantificação de citocinas e quimiocinas no soro de doentes de AR .....</b>	<b>61</b>
	<b>Para além de ter uma função quimioatraente as proteínas MIP-1<math>\alpha</math> e MIP-1<math>\beta</math> são reguladoras dos linfócitos T em doenças autoimunitárias (Karpus <i>et al.</i> 1997). .....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Correlação entre as concentrações das várias citocinas e quimiocinas no soro de doentes de AR .....</b>	<b>64</b>
	<b>CAPITULO 4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>69</b>
	<b>CAPITULO 5. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>73</b>
	<b>CAPITULO 6. ANEXOS .....</b>	<b>89</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Distinção entre Articulação saudável e Articulação com inflamação. ....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 2. Estrutura química do Metotrexato.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 3. Alterações fenóticas e funcionais das células T CD8<sup>+</sup> induzidas pela estimulação antigénica crónica.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 4. Demonstração esquemática do processo realizado pelos CTLs quando suprimem as células alvo.....</b>	<b>9</b>
<b>Figura 5. Exposição esquemática do fundamento do método de CBAs utilizado .....</b>	<b>28</b>
<b>Figura 6. Gate de linfócitos. ....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 7. Comparação entre as frequências das várias subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> com base na expressão de marcadores moleculares em SP de doentes de AR e controles saudáveis. ....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 9. Comparação da subpopulação de CTLs em SP entre doentes de AR sem tratamento com MTX e doentes de AR que são tratados com MTX.....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 10. Correlação entre as frequências obtidas para a subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória efectora presentes no SP e LS de doentes de AR. ....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 11. Quantificação da concentração de IL-10 no soro de doentes de AR e comparação com indivíduos controlo. ....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 12. Quantificação da concentração de quimiocinas no soro de doentes de AR e comparação com indivíduos controlo. ....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1. Anticorpos específicos para CMF .....</b>	<b>23</b>
<b>Tabela 2. Frequência de várias subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> com base na expressão de marcadores moleculares em SP de doentes de AR (Percentagem em linfócitos totais – Média (Desvio Padrão)).....</b>	<b>33</b>
<b>Tabela 3. Frequência de várias subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> com base na expressão de marcadores moleculares em SP de doentes de AR com diferentes actividades da doença (Percentagem em linfócitos totais – Mediana (Q1-Q3)).....</b>	<b>36</b>
<b>Tabela 4. Frequência de várias subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> com base na expressão de marcadores moleculares em SP de doentes de AR com diferentes actividades da doença (Percentagem em linfócitos totais – Mediana (Q1-Q3)).....</b>	<b>37</b>
<b>Tabela 5. Quantificação de citocinas Humanas no soro de doentes de AR e comparação com controlos saudáveis (Mediana (Q1-Q3)).....</b>	<b>58</b>
<b>Tabela 6. Quantificação de quimiocinas Humanas no soro de doentes de AR e comparação com controlos saudáveis (Mediana (Q1-Q3)).....</b>	<b>59</b>

## RESUMO

A Artrite Reumatóide (AR) é caracterizada por inflamação sistémica, sinovite e presença de auto-anticorpos (tal como o factor reumatóide -FR e proteínas citrulinadas). Esta patologia provoca lesões articulares, deficiências, diminuição da qualidade de vida, e doenças vasculares. Os Medicamentos Anti-reumáticos Modificadores da Doença, DMARD (*Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*), tal como o Metotrexato (MTX) são agentes terapêuticos que podem reduzir os sintomas desta doença.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, são células efectoras chave da resposta imune adquirida, contudo a sua actividade deve ser regulada de forma a permitir a eliminação eficiente dos patogénios e prevenir fenómenos de autoimunidade.

De forma a compreender o papel os linfócitos T CD8<sup>+</sup> na AR foram estudadas as alterações da frequência das suas subpopulações no Sangue Periférico (SP) e no Líquido Sinovial (LS) de doentes com essa patologia (com diferentes actividades da doença e presença ou ausência de terapia com MTX), assim como as citocinas intracelulares libertadas por essa subpopulação de células através da técnica de Citometria de Fluxo (CF). Foram igualmente estudadas as alterações dos níveis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias através de um imunoensaio baseado numa aplicação da CF baseada em microesferas, CBAs (*Cytometric Bead Array*).

No nosso trabalho de investigação encontrámos alterações significativas das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (fenótipo de células activadas) nos doentes de AR. Concluímos que estas caracterizam a presença e o estado de actividade da doença, sendo um indicador directo da actividade da doença nos locais de inflamação. Desta forma consideramos que a análise da frequência desta subpopulação no SP dos doentes de AR permite confirmar um prognóstico da doença. Tendo em conta que a presença da subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> de Memória Efectora (com fenótipo CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) está correlacionada entre SP e LS de doentes de AR, podemos concluir que a partir de um *screening* feito no SP desses doentes obtenhamos informação sobre o comportamento dessa subpopulação celular no LS.

A quantificação de citocinas e quimiocinas a partir do soro de doentes de AR veio, mais uma vez, demonstrar a importância destas nos mecanismos inflamatórios. Por um lado, proteínas com acção pró-inflamatória como a IL-10 e de recrutamento de células leucocitárias polimorfonucleares de fase aguda, como a MIP-1 $\alpha$  estão diminuídas na AR. Por outro lado, quimiocinas como a MCP-1, MIP-1 $\beta$ , MIG e IL-8, que embora sejam

sintetizadas por diferentes subpopulações têm o papel de recrutar células para o processo inflamatório e algumas também se encontram envolvidas na reparação de tecidos danificados, estão aumentadas nos doentes com a mesma patologia. Desta forma, concluímos que estas proteínas são importantes factores na manifestação e cronicidade desta patologia.

A terapêutica por administração de MTX aos doentes de AR demonstrou causar alterações nas subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> de Memória Central (aumento significativo), de Memória Efectora (diminuição significativa) e nas subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> que libertam IL-17 (diminuição significativa). Estes resultados levam-nos a sugerir que um dos mecanismos de acção do MTX é feito sobre essas subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>.

Concluimos que várias subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> estudadas têm um impacto significativo no estabelecimento e permanência desta patologia crónica, o que estimulou interesse para desenvolver futuramente um possível diagnóstico para a AR a partir do conhecimento que produzimos relativamente ao papel dos linfócitos T citotóxicos (CTLs) nessa patologia, assim como uma nova terapêutica biológica direccionada para a acção desses linfócitos.

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by systemic inflammation, synovitis and the presence of autoantibodies (such as citrullinated proteins and rheumatoid factor). This disease causes joint damage, disability, decreased quality of life, and vascular diseases. The Disease Modifying Anti-rheumatic Drug (DMARDs), such as Methotrexate (MTX), are therapeutic agents that can reduce the symptoms of this disease.

The CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are key effectors cells of the acquired immune response, but their activity must be regulated in order to enable the efficient elimination of pathogens and prevent autoimmune phenomena.

In order to understand the role of the CD8<sup>+</sup> T cells in RA, we studied the changes in the frequencies of its subpopulations in the peripheral blood (PB) and synovial fluid (SF) of patients with RA (with different disease activity and with or without therapy with MTX), as well as intracellular cytokines released by this population of T cells using the technique of Flow Cytometry (FC). We also studied the changes in serum proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by an immunoassay based on an application of the –FC based beads - Cytometric Bead Array (CBAs).

In our research work we found significant changes in the CD8CD69<sup>+</sup>T cells subpopulation (phenotype of activated cells) in patients with RA. We thus conclude that these cells characterize the establishment and activity of RA, and can be assumed as a direct indicator of local inflammation. We thus consider that the analysis of the frequency of this subpopulation in the PB of patients affected with RA could be used as a new way of prognosis.

Given that the frequency of the subpopulation of effector memory CD8<sup>+</sup>T cells (phenotype: CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) has shown a correlation in PB and SF of patients affected with RA, we can conclude that from a screening done in the PB of these patients, we obtain information about the behavior of these cells in the SF.

Quantification of cytokines and chemokines from the serum of RA patients came once again demonstrate the importance of these inflammatory mechanisms. On the one hand proteins with proinflammatory action, such as IL-10, and recruitment of polymorphonuclear leukocyte cells of the acute phase, such as MIP-1 $\alpha$ , are decreased in RA. On the other hand, chemokines such as MCP-1, MIP-1 $\beta$ , IL-8 and MIG, which although synthesized by different subpopulations have a role in recruiting cells to the inflammatory process and some are also involved in the repair of damaged tissues, are increased in patients with the same pathology. Thus, we conclude that these proteins are important factors in onset and chronicity of the condition.

The therapy performed by administering MTX to patients with RA caused changes primarily on the subpopulation of Central Memory (significant increase) and Effector Memory (significant decrease) CD8<sup>+</sup> T cells, but also on subset the CD8<sup>+</sup>T cells that release IL-17 (significant decrease). These results lead us to suggest that one mechanism of action of MTX is by targeting these subsets of CD8<sup>+</sup> T cells.

We conclude that the several subpopulations of CD8<sup>+</sup> T cells that we studied have a significant impact on the establishment and maintenance of this chronic pathology. Therefore in the future we are interested in developing a possible diagnosis for RA based on the information we provided regarding the role of CD8<sup>+</sup> Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs) in this pathology, as well as a new biological therapies targeting these lymphocytes.

## **CAPITULO 1. INTRODUÇÃO**

### 1.1 Artrite Reumatóide

A Artrite Reumatóide (AR) é uma doença auto-imune, sistémica, crónica de etiologia ainda não esclarecida, que se caracteriza por um processo inflamatório crónico com acometimento preferencial de articulações, embora outros órgãos ou sistemas possam ser envolvidos. Dados epidemiológicos referem que afecta 0,5 a 1% da população mundial, sendo a sua prevalência superior no sexo feminino e a sua incidência mais elevada na 5ª década de vida (McInnes *et al.* 2007).

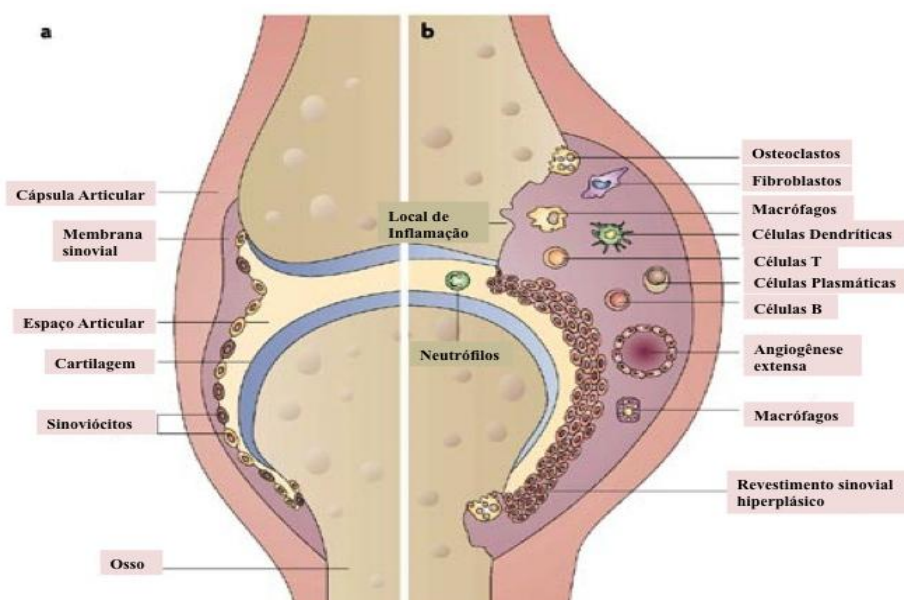
O envolvimento das articulações sinoviais num processo inflamatório crónico, conduz a uma destruição progressiva da articulação, com erosões e luxações e consequentemente a uma acentuada incapacidade dos doentes (que causa invalidez em cerca de 75% dos doentes). Apesar de mais frequentemente envolver as articulações, outros órgãos e sistemas podem ser acometidos, como o pulmão, o sistema nervoso, o sistema cardiovascular e metabólico (Erhardt *et al.* 1989; Brennan *et al.* 2008; Aletaha *et al.* 2010). Desta forma é reconhecida, e compreensível, a elevada morbilidade associada a AR, caracterizando-se por elevado impacto na vida dos doentes com redução da qualidade de vida, marcada incapacidade funcional e laboral precoce, com consequências nefastas nas componentes pessoais, sociais e económicas da vida dos doentes (Pereira da Silva *et al.* 2010).

Apesar da sua etiologia não estar definida, os modelos actuais apontam para uma doença de causa multifactorial, onde os factores genéticos poderão justificar até 50% do risco de desenvolver a patologia e o restante a factores ambientais e hormonais (Scott *et al.* 2010).

Alguns estudos verificaram que esta patogenia resulta de uma perda de regulação do Sistema Imunitário (SI) a nível das células da Resposta Imune Inata (RII) assim como da Resposta Imune Adquirida (RIA) (Aletaha *et al.* 2010). Esta desregulação, determinada por diversos mecanismos, conduz à produção de auto-anticorpos tais como o Factor Reumatóide (FR) e Anticorpos Anti-Proteínas Citrulinadas (ACPA).

### 1.1.1 Articulação na AR

A articulação é constituída por dois ossos cobertos com cartilagem e alinhados por uma cápsula. Na superfície interna desta encontram-se fibroblastos sinoviocíticos que dão origem ao líquido sinovial (LS) (Figura 1) (Scott *et al.* 2010). As membranas sinoviais dos doentes de AR contêm células B e T activadas que por vezes se encontram organizadas em centros germinativos ectópicos com células plasmáticas, mastócitos e macrófagos activados. Dá-se igualmente importância às células dos tecidos envolventes do local de inflamação, tais como os fibroblastos sinoviais activados, condrócitos e osteoclastos na destruição da cartilagem e do osso, mas por outro lado acredita-se que promovam a retroalimentação na perpetuação da inflamação (Brennan *et al.* 2008; Aletaha *et al.* 2010).



**Figura 1. Distinção entre Articulação saudável e Articulação com inflamação.** **a.** Podemos verificar o aspecto de uma articulação saudável, e especificamente o estado saudável da membrana sinovial. **b.** Através desta segunda representação podemos confirmar as diferenças que ocorrem quando uma articulação é atingida por inflamação, tornando-se hiperplásica e infiltrada por células que induzem a inflamação crónica (Strand *et al.* 2007).

### 1.1.2 Diagnóstico e Terapêuticas no tratamento da AR

Avanços significativos têm sido feitos ao longo das últimas décadas na abordagem da artrite reumatóide, quer na área de diagnóstico quer em terapêutica. Actividades conjuntas da Liga Europeia Contra o Reumatismo (EULAR) e do Colégio Americano de Reumatologia (ACR) têm sido levadas a cabo, no sentido de diagnosticar



adequado da actividade e progressão radiológica da doença. Actualmente estão indicados em caso de falência a DMARD's clássicos não biológicos (Scott *et al.* 2010).

De salientar ainda, o papel dos Glucocorticóides como por exemplo a Prednisona, que são utilizados como agentes anti-inflamatórios poderosos, sendo actualmente reconhecido algum papel modificador da doença. A sua administração deverá ser feita na menor dose possível e pelo menor período de tempo. Doses de corticóides menores que 10 mg/dia em associação a DMARD's estão recomendadas na abordagem inicial do doente com AR (de Paz *et al.* 2010; Smolen *et al.* 2010).

## **1.2 Sistema Imunitário**

### **1.2.1 Resposta Imunológica Inata e Adaptativa**

Os órgãos do SI, são divididos em Órgãos Linfóides Primários (OLP), tal como a medula óssea (local de maturação das células B) e o timo (onde maturam os linfócitos T), e em Órgãos Linfóides Secundários (OLS) formados pelos Gânglios Linfáticos, Baço e Tecidos Linfóides associados às mucosas, locais onde se dá o encontro entre as células apresentadoras de antígenos (APCs) e os linfócitos B e T específicos. É nestes órgãos que ocorre a proliferação e a diferenciação de linfócitos específicos em células efectoras e de memória imunológica (Abbas *et al.* 2000; Medzhitov 2007).

Existem dois tipos de respostas de defesa inter-relacionadas que em conjunto definem o processo de imunidade: RII que constitui uma forma de resposta indiferenciada e imediata relativamente ao agente invasor e RIA, caracterizada pela acção selectiva de linfócitos e produção de anticorpos (Ac) (Murphy *et al.* 2007).

Quando um agente agressor consegue invadir o organismo dos vertebrados é reflectido num processo inflamatório de forma a localizar, neutralizar e eliminar esse agressor, no entanto a permanência dos patogenos nos tecidos leva ao estabelecimento de uma RIA que provoca a produção de Ac específicos (Resposta Humoral) e a geração de células efectoras capazes de realizarem uma acção citotóxica relativamente às células portadoras de antígenos estranhos (Resposta Celular) (Abbas *et al.* 2000).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrar e a permanecer durante vários dias; seguidos a estes afluem os linfócitos T citotóxicos e mais tardiamente os linfócitos

B (Murphy *et al.* 2007). Quando os antígenos não são neutralizados ou destruídos na sua totalidade estabelece-se uma inflamação crónica, na qual deixa de haver afluência de neutrófilos e aumenta a acumulação de linfócitos T auxiliares e fagócitos mononucleares no foco da inflamação (Abbas *et al.* 2000).

Quanto aos linfócitos B e T *naïve*, estes migram para a periferia e para os OLS, locais onde os linfócitos T depois de activados pelas APCs migram para os focos inflamatórios (Butcher *et al.* 1996). Após a activação dos linfócitos T, estes sofrem expansão clonal e diferenciação em linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares (grupo de diferenciação 4) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (grupo de diferenciação 8) (Murphy *et al.* 2007).

Várias células intervenientes no processo inflamatório produzem citocinas com o objectivo de sinalização e interacção celular. Este processo de mediação da inflamação é normalmente iniciado pelas células do próprio tecido onde decorre o processo inflamatório, contudo as células mononucleares e os linfócitos que são atraídos para o local são activadas e por sua vez passam a libertar as suas próprias citocinas. Esta libertação de citocinas é fundamental para o recrutamento de células directamente envolvidas na reacção imunológica em questão (Huston 1997).

### 1.2.2 Linfócitos T

Os primeiros timócitos a surgir não expressam nem CD4 nem CD8, sendo por isso classificados como linfócitos duplo-negativos (CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). Depois do seu desenvolvimento, esses linfócitos passam a ser duplo-positivos (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) e quando maduros adquirem a caracterização final de positivos apenas para uma das proteínas de membrana (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) e saem do timo em direcção ao SP e aos OLS. No SP e nos OLS, a população CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> representa de 60% a 70% das células T, enquanto 30% a 40% dessas células são populações CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (von Boehmer *et al.* 1989; Chaplin 2010).

Depois da activação, os linfócitos ganham a capacidade de eliminar o antígeno (linfócitos CD8<sup>+</sup>) ou de induzir a resposta humoral (linfócitos CD4<sup>+</sup>) passando a ser chamadas Células T Efectoras especializadas em diversas funções (Lanzavecchia *et al.* 2000).

As células T também expressam proteínas de membrana, ou moléculas acessórias, que participam nas respostas aos antígenos. Estas moléculas têm a função de emitir sinais para os linfócitos T, que actuam de acordo com os sinais originários do Receptor de células T (TCR) para activar as células completamente; actuam também como moléculas de adesão para estabilizar a ligação das células T às APCs, e desta forma permitir que o TCR esteja em contacto durante o tempo suficiente para emitir os sinais necessários. Estas proteínas também regulam a migração das células T para os sítios onde devem estar presentes e responder aos antígenos (Abbas *et al.* 2000).

Paralelamente ao processo de activação das células T, divisão e diferenciação em populações efectoras, uma população celular é igualmente programada para desempenhar funções de memória ( $T_M$ ), que persiste no organismo, mesmo após a resolução da infecção. Desta forma, após um segundo encontro com o seu antígeno específico, essa população celular rapidamente se divide, e imediatamente passa a exercer funções efectoras (Kaech *et al.* 2002).

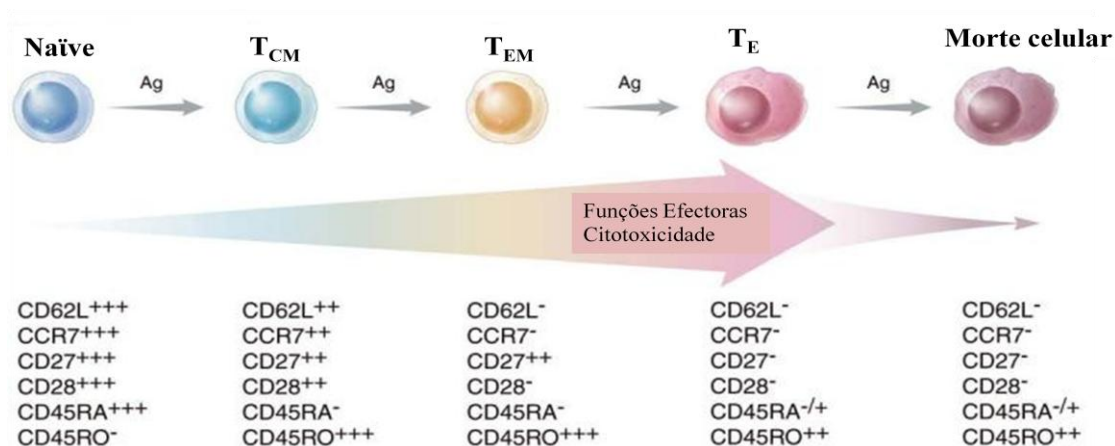
Com base na expressão de moléculas de superfície, distribuição anatómica e função celular, as populações de células T  $CD4^+$  e T  $CD8^+$  de memória são divididas em Células T de Memória Efectora ( $T_{ME}$ ) e Células T de Memória Central ( $T_{MC}$ ) (Sallusto *et al.* 1999).

### **1.3 Linfócitos T $CD8^+$**

Entre as várias funções das células T  $CD8$ , a principal é a eliminação de vírus ou células infectadas por bactérias citosólicas. Além disso, estas células parecem desempenhar papéis importantes em desordens autoimunes, em casos de transplantes, alergias, cancro e doenças infecciosas, protegendo contra ou aumentando a gravidade da doença (Jiang *et al.* 1992; Wang *et al.* 1996; Lee *et al.* 2008; Konya *et al.* 2009).

A geração de linfócitos T  $CD8^+$  citotóxicos (CTLs) depende da presença de linfócitos T  $CD4^+$  presentes nas proximidades e também da interacção destas células com as APCs. Desta forma, a interacção entre o receptor CD40 expresso pelas APCs, e o seu ligando, expresso pelos linfócitos T  $CD4^+$  activados, induzem aumento da expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe I (MHC-I), assim como outras moléculas acessórias, induzindo um aumento da

capacidade das APCs activarem os linfócitos T CD8<sup>+</sup> *naïve* e originar CTLs (Cella *et al.* 1996; Dolan *et al.* 2006; Wakim *et al.* 2011).

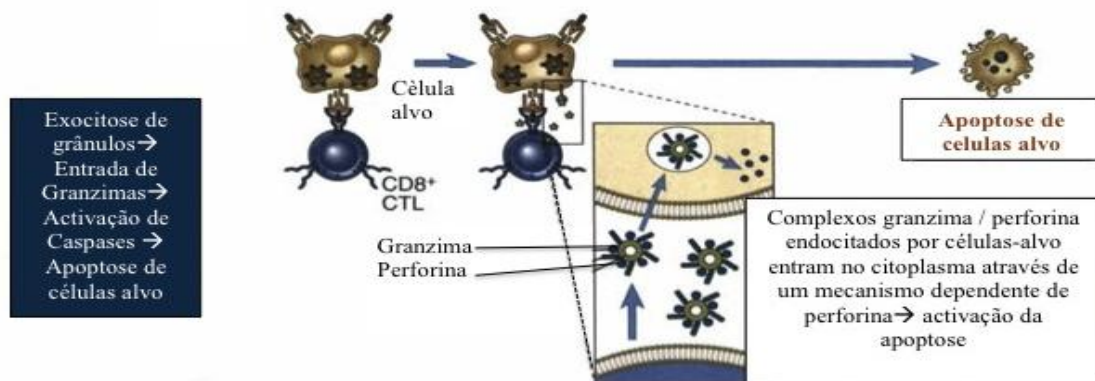


**Figura 3. Alterações fenóticas e funcionais das células T CD8<sup>+</sup> induzidas pela estimulação antigénica crónica.** A repetida estimulação antigénica, tal como ocorre em doenças crónicas como a AR, leva a uma diferenciação terminal das células T CD8<sup>+</sup> *naïve* a um estado efector (T<sub>E</sub>) e por último a um estado de exaustão que leva à apoptose dessas células. A mudança fenotípica que caracteriza este processo é ilustrado pela baixa expressão (+), expressão intermédia (++) e elevada expressão (+++) de vários marcadores de superfície. As células T CD8<sup>+</sup> vão perdendo progressivamente o potencial proliferativo assim como a capacidade de resposta às citocinas homeostáticas (como a IL-7 e a IL-15) e a produção de IL-2, acabando por levar à apoptose celular (Klebanoff *et al.* 2006).

No final de activação dessas células os CTLs são capazes de produzir grânulos citotóxicos, que contêm Perforinas (PRF1) e Granzimas (GZMB), essenciais para a eliminação de células infectadas (Smyth *et al.* 1995).

A GZMB é uma molécula crucial para uma rápida indução da morte celular programada (apoptose) das células alvo. De forma a penetrar nessas células infectadas a GZMB necessita que se dê a interacção com o receptor de membrana Manose-6-fosfato, assim como com a PRF1 (Pinkoski *et al.* 1998; Motyka *et al.* 2000). Uma vez penetrada nas células alvo, a GZMB é capaz de induzir a apoptose por meio da interacção com a Caspase 3 e 7 (proteases citosólicas), assim como com as proteínas BID (proteínas envolvidas na fase inicial de morte celular por apoptose) (Yang *et al.* 1998). Por outro lado, a GZMB pode também deteriorar a organização das proteínas do cito-esqueleto e induzir morte celular por lise celular (Adrain *et al.* 2006).

A PRF1 permite a introdução de GZMB nas células assim como de outras toxinas. Foram descritas duas hipóteses referentes à função das PRF1 relativamente às células alvo. A primeira propõe que esta proteína citolítica tem a capacidade de fazer poros na membrana plasmática da célula alvo, e dessa forma a GZMB entra para dentro dessas células (Figura 4). A segunda hipótese baseia-se na capacidade da PRF1 causar ruptura dos endossomas das células antigénicas que contêm granzima (Pinkoski *et al.* 1998).



**Figura 4. Demonstração esquemática do processo realizado pelos CTLs quando suprimem as células alvo.** Complexos de PRF1 e GZMB são segregados por CTLs e entram nas células alvo; os complexos de GZMB são transferidos no citoplasma das células alvo através de um mecanismo dependente de PRF1, induzindo apoptose (Abbas *et al.* 2000).

É importante destacar que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> não se limitam a eliminar células alvo. Ou seja, as citocinas produzidas por esta subpopulação de linfócitos T contribuem também para a defesa do organismo (por exemplo, em tumores cancerosos). Um exemplo deste fenómeno, é a capacidade do Interferão gama (IFN- $\gamma$ ) libertado inibir a replicação viral, assim como de induzir a síntese de moléculas MHC-I e outras proteínas envolvidas na exposição, à superfície celular, de antígenos virais pelas células infectadas. Este aumento consequentemente faz crescer a probabilidade de as células infectadas serem reconhecidas por CTLs. O IFN- $\gamma$  tem também acção activante sobre os macrófagos, aumentando a sua capacidade citotóxica, e tornando-os APCs mais eficientes (Northrop *et al.* 2004).

O número de células pertencente à população de CTLs está correlacionado com o nível elevado de carga viral, sugerindo que estas células têm importante papel na persistência do vírus, possivelmente pela inibição das reacções imunes antivirais. Este subgrupo de células T tem outra função interessante relacionada com a tolerância celular entre a mãe e o feto durante a gravidez. Outros estudos têm dado importância a

esta população na vertente da protecção de determinados órgãos a ataques imunológicos (Konya *et al.* 2009).

#### **1.4 Linfócitos T CD8<sup>+</sup> e Artrite Reumatóide**

Na AR a membrana sinovial é caracterizada por infiltrados de células T, incluindo ambas as subpopulações CD4 e CD8 que ocupam domínios distintos dentro do tecido (Panayi *et al.* 2001; Bradfield *et al.* 2003). Estas células despertaram especial atenção devido ao proposto por vários autores acerca do seu papel central no desenvolvimento e manutenção da RIA na membrana sinovial (Firestein *et al.* 2002).

Embora as células T CD8 compreendam cerca de 40% das células T na membrana sinovial, apenas recentemente têm ganho maior atenção por parte dos investigadores na área da reumatologia. As células T CD8 são amplamente distribuídas ao longo da membrana e líquido sinovial, exibindo um fenótipo activado e uma actividade migratória reforçada, expressam citocinas pró-inflamatórias e contribuem para a formação de centros germinais ectópicos nos tecidos sinoviais. A função de recrutamento das células T CD8 para o compartimento sinovial tem sido atribuída a gradientes de quimiocinas adequados, à expressão de receptores de quimiocinas por linfócitos e à activação de células endoteliais, expressando moléculas de adesão (Panayi *et al.* 2001; Ruth *et al.* 2001; Kang *et al.* 2002).

Alguns doentes de AR apresentam expansão de clones de células T CD8<sup>+</sup> com fenótipo de memória, que estão correlacionados com os níveis do FR. Pensa-se que este facto se deva ao importante papel das células T CD8<sup>+</sup> na manutenção das estruturas dos centros germinais ectópicos na membrana sinovial de doentes de AR (Wagner *et al.* 1998; Kang *et al.* 2002).

Em diferentes modelos de animais de artrite induzida por colagénio, CIA (*Collagen-Induced Arthritis*) a ausência de células T CD8<sup>+</sup> resultou numa maior incidência e gravidade da doença. No entanto, foi observada uma maior susceptibilidade para a doença quando os animais foram expostos a segunda vez à presença dessa subpopulação de células T (Larsson *et al.* 1989; Kiely *et al.* 1996; Tada *et al.* 1996). Para além dessas evidências, em ratinhos CD8<sup>+/-</sup> e CD8<sup>-/-</sup> foi observada uma tendência

na direcção de um atraso do início da CIA, sem um impacto significativo na susceptibilidade para a doença (Ehinger *et al.* 2001).

Outros autores verificaram que quando transferidos clones de células T CD8<sup>+</sup> gerados a partir de articulações de ratos SKG para ratos atímicos (*nude*), leva ao aparecimento de edema a nível articular e sinovial, com consequente destruição da cartilagem e do osso (Wakasa-Morimoto *et al.* 2008).

Em estudos feitos num modelo de artrite espontânea em ratinhos K/BxN, quando estudados os marcadores de superfície expressos pelas células T CD8<sup>+</sup> no SP e no LS os resultados retrataram que tanto nos ratinhos K/BxN como nos ratinhos saudáveis a frequência da subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> efectoras de curta duração (T<sub>ES</sub>) – CD27<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> eram similares. Além disso, evidenciaram que a frequência da subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> efectoras de memória - CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> foi significativamente maior nos ratinhos K/BxN artríticos comparativamente aos ratos saudáveis. Esta subpopulação apresentou igualmente maiores níveis (sem diferenças significativas) no LS comparativamente ao SP dos ratinhos K/BxN. Para a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> de memória central – CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> foram verificadas iguais frequências tanto nos ratos artríticos como nos ratos saudáveis, sendo que se encontrava significativamente mais enriquecida no SP comparativamente ao LS dos ratinhos K/BxN. Nos mesmos ensaios foi demonstrado que as células T CD8<sup>+</sup> que expressam o marcador de superfície CD69 apresentaram maiores frequências no SP dos ratos artríticos, em contraste com os ratos sãos e por outro lado, maiores frequências também no LS dos ratos K/BxN (Raposo *et al.* 2010).

## 1.5 Citocinas e Quimiocinas na Reacção Inflamatória e na Artrite Reumatóide

De forma a activar todas as vias que contribuem para o fenómeno de inflamação, as citocinas têm a principal função de recrutamento, activação e efectora, sendo por isso a base principal dos mediadores da inflamação e de toda a reacção imune (Brennan *et al.* 2008; de Paz *et al.* 2010). Um dos sub-grupos de citocinas, as quimiocinas, representa igualmente influência na resposta inflamatória, assim como os seus receptores, encontrando-se descrito que quando as quimiocinas pró-inflamatórias

ignoram a informação representativa das quimiocinas anti-inflamatórias, resulta um estado de inflamação acelerado. (Szekanecz *et al.* 2010).

A análise da produção de citocinas em várias doenças auto-imunes tem-se direccionado de forma a responder a questões do seu envolvimento com a regulação do sistema imune e da resposta inflamatória.

### 1.5.1 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1

O Factor de Necrose Tumoral alfa, TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*) é um mediador de funções efectoras, incluindo a activação de células endoteliais e a amplificação de quimiocinas, levando à acumulação de leucócitos no local de inflamação; induz a activação dos osteoclastos e dos condrócitos promovendo a destruição articular; causa a sensibilização do nociceptor, prejudica funções cognitivas e influencia determinantemente a síndrome metabólica (Feldmann *et al.* 2001; Brennan *et al.* 2008). Na cascata inflamatória que se verifica nos doentes de AR, um dos fenómenos chave é a hiper-produção e expressão de TNF- $\alpha$ , citocina que interfere determinantemente com as interações entre os linfócitos B e T, com os fibroblastos sinoviais e com os macrófagos (Feldmann *et al.* 1996). Investigações demonstraram que na patologia da AR esta citocina desempenha o papel de degradação de cartilagem e de tecido ósseo *in vitro* (Dayer *et al.* 1985; Bertolini *et al.* 1986).

Outros estudos demonstraram que existe uma hierarquia entre os intervenientes na inflamação, sendo que o bloqueio da actividade de TNF- $\alpha$  leva a simultânea inibição da síntese de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 (Brennan *et al.* 1989; Haworth *et al.* 1991; Butler *et al.* 1995). Após confirmado que o TNF- $\alpha$  e os seus receptores são expressos em tecido reumatóide humano, foi utilizado o modelo de CIA e verificou-se que após o início da doença administrando anticorpos monoclonais (mAb) específicos para o TNF- $\alpha$  de ratinhos, havia melhorias tanto na inflamação como nos danos articulares (Chu *et al.* 1991; Deleuran *et al.* 1992; Williams *et al.* 1992).

Estes estudos e outros demonstraram a potencialidade do uso desta citocina como um alvo terapêutico. Desta forma realizaram-se vários ensaios dirigidos para essa potencialidade, sendo que doentes com AR activa foram tratados com Infliximab (fármaco que consiste num mAb quimérico específico para o TNF- $\alpha$  humano). Como

resultados observaram-se diminuição dos sinais e sintomas da doença, tal como os níveis de PCR no soro e a VHS (Elliott *et al.* 1993). A administração de anti-TNF- $\alpha$  reduziu a expressão de IL-8 e a Proteína Quimiotáctica de Monócitos 1, MCP-1 (*Monocyte chemotactic protein-1*) assim como o ingresso de células inflamatórias para a membrana sinovial dos doentes de AR tratados (Taylor *et al.* 2000).

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são os principais mediadores que estimulam diversos mecanismos da inflamação, sendo que possuem muitas actividades biológicas sobrepostas, tal como a produção de proteínas e outras moléculas da fase aguda (William *et al.* 1997). No entanto na literatura, trabalhos realizados em modelos de ratinhos, sugerem que enquanto o TNF- $\alpha$  exerce na sua maioria efeitos sistémicos, tais como o inchaço da pata, perda de peso e leucocitose, a IL-1 $\beta$  por sua vez actua mais localmente, estando correlacionada com a proliferação do revestimento sinovial e com a entrada de leucócitos para a articulação (Szekanecz *et al.* 2000).

Tal como o TNF- $\alpha$ , vários membros da super família da IL-1 têm sido referenciados como intervenientes na AR. A IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ , assim como o receptor antagonista de IL-1 são expressos em elevadas concentrações na membrana sinovial (Dayer 2003). A presença de IL-1 $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  *in vitro* induz a produção de citocinas e prostanóides por células sinoviais mononucleares, libertação de metaloproteinases (MMP) por fibroblastos, produção de citocinas por condrócitos e erosão óssea pelos osteoblastos (Dayer 2003). Verificou-se em modelos de AR induzida em ratinhos, que o bloqueio da IL-1 e de componentes do receptor para IL-1 (IL-1R) são vantajosos na redução da inflamação e dos danos articulares (van den Berg *et al.* 1994; Joosten *et al.* 1999).

A IL-6 tem muitos efeitos pró-inflamatórios sobrepostos com as citocinas anteriormente referidas, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , contudo indirectamente influencia a produção de MMP e a angiogénese através do aumento do efeito de outras citocinas (William *et al.* 1997; Szekanecz *et al.* 1998).

A IL-6 é conhecida como mediadora de funções pleiotrópicas tais como a maturação e activação de células B e T, macrófagos, osteoclastos, condrócitos e células endoteliais, mas também intervêm na hematopoiese na medula óssea (Kishimoto 2005). Esta citocina está correlacionada com várias patologias, nomeadamente com a

actividade da AR. Isto porque a IL-6 na AR é responsável pela estimulação da secreção de imunoglobulinas (Ig) pelos plasmócitos, activa e promove a proliferação dos linfócitos T, causa um aumento de neutrófilos e plaquetas, induz o aparecimento de proteínas de fase aguda como a PCR, fibrinogénio, heptoglobina e Soro Amilóide A (SAA), regula a proliferação e diferenciação de osteoclastos e induz a reabsorção óssea (Matsuno *et al.* 1998).

Têm sido realizadas várias investigações no sentido de comprovar que esta citocina tem importante papel na patologia da AR, nas quais se verificou já que depleção de IL-6 em ratinhos de modelo DBA/1 protege os mesmos de CIA induzida (Kishimoto 2005). A neutralização de IL-6 utilizando Ac específicos tanto para a citocina como para o seu receptor (IL-6R) auxiliou na melhoria da doença (Alonzi *et al.* 1998). Os ensaios clínicos executados comprovaram o papel desta citocina na AR, pois a terapêutica realizada com Tocilizumab (mAb humanizado específico para o IL-6R) tem demonstrado suprimir a actividade da doença e a progressão de erosão nos doentes resistentes aos DMARDs tradicionais (Smolen *et al.* 2008).

### 1.5.2 IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$

A IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória que exerce efeitos imunomoduladores sobre várias células imunológicas (Hussein *et al.* 2008). Da mesma forma esta proteína pode ser sintetizada por subpopulações de células T e B, e APCs. Por outro lado visto que a função imune de várias células é afectada por esta citocina, as mesmas expressam também o IL-10R (Bromberg 1995).

As funções que esta citocina desempenha são a inibição das propriedades co-estimuladoras dos macrófagos, estimula a proliferação e diferenciação de células B formadoras de Ac e tem o papel de regulação da produção de citocinas derivadas de várias células (Appel *et al.* 2004). O fenómeno mais importante que ocorre em várias patologias e que se deve essencialmente a esta citocina, é o facto que inibir a produção de citocinas e quimiocinas, tal como a IL-17, TNF, IL-1, IFN- $\gamma$ , entre outras (de Waal Malefyt *et al.* 1991; Del Prete *et al.* 1993; Miossec 2004).

Num estudo comparativo dos níveis de IL-10 entre doentes de AR, doentes de Osteoartrite (OA) e indivíduos saudáveis, verificaram-se níveis altos e estatisticamente significativos desta citocina no soro de doentes de AR comparativamente ao segundo

grupo referido. Por outro lado verificaram-se também níveis significativamente elevados de IL-10 no LS de indivíduos afectados com AR comparativamente aos afectados com OA (Hussein *et al.* 2008).

A família da IL-17 (especialmente a IL-17A) desempenha efeitos pleiotrópicos sobre várias células. A IL-17 é libertada principalmente por células T *helper* 17 (Th17), mas também pode ser produzida por algumas subpopulações de células B e T, macrófagos, neutrófilos e pensa-se que os mastócitos também. (Happel *et al.* 2003; Hueber *et al.* 2010). Foram encontrados elevados níveis desta interleucina em doentes com patologias auto-imunes como a AR, Lúpus Eritematoso Sistémico (LES) e Psoríase (Gaffen 2008). Tem um papel importante na patologia da AR, estimulando as células epiteliais, endoteliais e os fibroblastos a produzirem citocinas como a IL-6 e a IL-8 assim como MMP (Fossiez *et al.* 1996).

A IL-17 apresenta uma potente sinergia com outras citocinas, tal como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  (Chabaud *et al.* 1998; Chabaud *et al.* 2001; Ruddy *et al.* 2004). Particularmente, a forte sinergia da IL-17 com o TNF- $\alpha$  também sugere um potencial mecanismo pelo qual o bloqueio de TNF- $\alpha$  pode servir para reduzir a função da IL-17, e desta forma explicar o sucesso das terapêuticas biológicas anti-TNF para o tratamento da AR (Kikly *et al.* 2006).

A partir de modelos de CIA, alguns investigadores verificaram uma significativa diminuição da severidade da doença, depois de bloquearem a IL-17 reduzindo a inflamação e a erosão óssea. (Nakae *et al.* 2003; Lubberts *et al.* 2004). Tal demonstração foi suportada quando apuraram que em modelos de CIA os ratinhos *knockout* para a IL-17 (IL-17<sup>-/-</sup>) e também em ratinhos *knockout* para o receptor da IL-17 (IL17R<sup>-/-</sup>) são mais resistentes a esta doença. (Lubberts *et al.* 2004; Plater-Zyberk *et al.* 2009).

Alguns estudos mostram que existem níveis elevados de IL-17 e IL-17R em fluído e tecido sinovial de doentes de AR, e que esta citocina promove a degradação das articulações em modelos *ex vivo* (Kotake *et al.* 1999; Cai *et al.* 2001; Honorati *et al.* 2001).

Enquanto a importância patogénica da IL-17 derivada de células T na inflamação crónica tem sido demonstrada numa variedade de modelos de ratinhos e em

doentes de AR (activação de fibroblastos e secreção de citocinas características de um LS afectado com AR), o papel do IFN- $\gamma$  nesta patologia continua pouco claro (Miossec 2007).

Na literatura há referência de que as células T isoladas fora da membrana sinovial reumatóide têm a capacidade de produzir IFN- $\gamma$  e que a sobrevivência dos macrófagos do LS dependem da produção dessa citocina. Nos seres humanos, ao contrário do que foi observado nos ratos, o IFN- $\gamma$  e a IL-17 não são mutuamente exclusivas, e a dupla produção de IFN- $\gamma$ /IL-17 por células T não é frequente (Klimiuk *et al.* 1999; Goronzy *et al.* 2009).

O IFN- $\gamma$  originalmente chamado de Factor Activador de Macrófagos, pertence ao tipo II dos IFNs. É produzido por linfócitos *Th1*, linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células *Natural killer (NK)* e *NKT*, células B e APCs (Gessani *et al.* 1998; Yoshimoto *et al.* 1998; Harris *et al.* 2000; Frucht *et al.* 2001). O IFN- $\gamma$  libertado é importante para a auto-activação das células locais e para activação das células vizinhas, ou seja, age de forma parácrina (Gessani *et al.* 1998; Frucht *et al.* 2001).

A secreção desta citocina por APCs profissionais e células *NK* é especialmente importante na defesa inicial do hospedeiro contra infecções, enquanto os linfócitos T se tornam a principal fonte de IFN- $\gamma$  na RIA (Frucht *et al.* 2001; Sen 2001). Desempenha a importante função de estimular o desenvolvimento de mecanismos antivirais, antimicrobianos e antitumorais, bem como de regular o processamento dos antigénios e as vias de apresentação. Esta citocina comanda a atracção de leucócitos e direcciona o crescimento, maturação e diferenciação de vários tipos de células (Perussia *et al.* 1983; Young *et al.* 1995; Boehm *et al.* 1997). Conhece-se também a capacidade do IFN- $\gamma$  de aumentar a actividade das células *NK* e de regular as funções das células B (como por exemplo, a produção de Ig (Finkelman *et al.* 1988; Boehm *et al.* 1997).

Ratinhos deficientes para IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup>) e ratinhos deficientes para o seu receptor (IFNGR1<sup>-/-</sup>) não apresentam defeitos evidentes de desenvolvimento e o seu SI parece desenvolver-se normalmente (Huang *et al.* 1993). No entanto, esses ratinhos mostram deficiências na resistência natural a infecções bacterianas, parasitárias e virais (Suzuki *et al.* 1988; Kamijo *et al.* 1993; Pearl *et al.* 2001).

Nos seres humanos o IFN- $\gamma$  tem sido implicado na patologia de doenças como o LES, Esclerose Múltipla e na Diabetes Mellitus Insulino-Dependente (Panitch *et al.* 1987; Sarvetnick *et al.* 1988; Lee *et al.* 2001). Crianças com deficiências na síntese desta citocina exibem para além de infecções recorrentes, diminuição da mobilidade de neutrófilos e da actividade das células *NK*, o que demonstra mais uma vez a importância do IFN- $\gamma$  na resposta inflamatória e na imuno-regulação (Davies *et al.* 1982).

Estudos direccionados para a AR evidenciaram transcrição de níveis quase nulos de IFN- $\gamma$  a nível do LS e imuno-ensaios demonstraram igualmente existirem baixos níveis de secreção desta proteína nesse local (Firestein *et al.* 1987; Firestein *et al.* 1990; Kahle *et al.* 1992). No entanto, outros autores identificaram a expressão de *mRNA* de IFN- $\gamma$  em LS (Buchan *et al.* 1988; Simon *et al.* 1994). Também um outro estudo em doentes com esta patologia evidenciou que os níveis de IFN- $\gamma$  produzidos por células T CD8<sup>+</sup> (estimuladas) são mais elevados no LS do que no SP de sujeitos afectados com AR (Isomaki *et al.* 1999).

### 1.5.3 Quimiocinas

Na AR, os leucócitos extravasam através do endotélio vascular e formam infiltrados inflamatórios dentro da membrana sinovial, sendo que neste processo estão envolvidas inúmeras quimiocinas inflamatórias (Szekanecz *et al.* 2001; Szekanecz *et al.* 2003). Algumas dessas quimiocinas estão igualmente envolvidas na neovascularização sinovial, fenómeno directamente associado à AR (Szekanecz *et al.* 2003; Rudolph *et al.* 2005). Por outro lado, algumas quimiocinas suprimem a angiogénese e assim a inflamação sinovial (Szekanecz *et al.* 2001; Szekanecz *et al.* 2003). Uma angiogénese acelerada pode resultar na expansão da superfície endotelial, o que promove um aumento do ingresso de células inflamatórias para a membrana sinovial (Koch *et al.* 1986; Imhof *et al.* 2004).

A quimiocina induzida pelo IFN- $\gamma$ , MIG (*Monokine Induced by Interferon-gamma*) pertence à sub-família de quimiocinas CXC (Farber 1990). Esta proteína é expressa em monócitos, macrófagos, hepatócitos, fibroblastos, queratinócitos e pelas células endoteliais (Farber 1990; Farber 1993; Amichay *et al.* 1996).

Em ratinhos com infecção viral ou protozoária, depois da administração de IFN- $\gamma$  de forma sistémica, verificou-se que esta molécula induzia a expressão do gene MIG em vários tecidos, tal como o fígado, baço, pulmão e coração (Amichay *et al.* 1996). Funcionalmente o MIG tem demonstrado ter uma acção quimiotáctica sobre as células T e por outro lado induz igualmente a sua activação, como é demonstrado pelo aumento da concentração de cálcio induzido por esta mesma citocina (Liao *et al.* 1995). Esta quimiocina inibe a angiogénese *in vivo* e tem acção anti-inflamatória na AR (Strieter *et al.* 1995).

A Proteína Inflamatória de Macrófagos 1, MIP-1 (*Macrophage Inflammatory Proteins*) é responsável por respostas inflamatórias locais *in vivo* e induz a produção de superóxido por neutrófilos *in vitro* (Sherry *et al.* 1988; Wolpe *et al.* 1988). Visto que no processo de inflamação existe mobilização e activação de neutrófilos, o MIP-1 é considerado um mediador endógeno da inflamação crónica (Sherry *et al.* 1988).

A MIP-1 $\alpha$  tem um papel relevante na fase aguda da inflamação, pois induz o recrutamento de macrófagos e neutrófilos para os locais de inflamação. Esta quimiocina é libertada por macrófagos, leucócitos polimorfonucleares, células hematopoiéticas como linfócitos B, T, e fibroblastos dos tecidos inflamados (Wolpe *et al.* 1988; Koch *et al.* 1994; Hatano *et al.* 1999). Alguns estudos demonstraram que a produção de MIP-1 $\alpha$  é aumentada pelo TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-5 (Koch *et al.* 1994; Wang *et al.* 2003).

A hiper-expressão deste mediador inflamatório é considerada como um dos fenómenos subjacentes à manifestação de doenças auto-imunes como a AR. De facto, o tratamento com Ac neutralizantes contra MIP-1 $\alpha$  em modelos de CIA de classe I em ratinhos resultou num atraso do início da AR e numa redução da severidade da mesma (Kasama *et al.* 1995). Em doentes de AR os níveis de expressão desta proteína tanto no tecido sinovial como no LS são muito altos quando comparados com os níveis em SP e com controlos saudáveis (Koch *et al.* 1994).

Para além de haver muito para desvendar ainda sobre a MIP-1 $\beta$ , foi demonstrado que os monócitos produzem grandes quantidades desta quimiocina quando estimulados com lipopolisacarídeos ou IL-7. Células T activadas, assim como células B que foram estimuladas como resultado da ligação de um antígeno, também libertam esta quimiocina (Krzysiek *et al.* 1999). Depois de receberem determinados sinais de activação fisiológica, as células NK podem igualmente produzir MIP-1 $\beta$  (Oliva *et al.*

1998). Foi também referido que, neutrófilos produzem esta quimiocina quando adicionadas vesículas da membrana externa da bactéria causadora da doença meningocócica. Também através da estimulação por essas vesículas, o IFN- $\gamma$  induz o aumento da produção de MIP-1 $\beta$ , enquanto a IL-10 tem um efeito contrário, ou seja, intervêm com o objectivo de diminuir a produção de MIP-1 $\beta$  (Lapinet *et al.* 2000).

De entre as várias actividades inflamatórias *in vitro*, a MIP-1 $\beta$  por vezes parece desempenhar um efeito quimioatraente para os linfócitos, mas em certas condições foram verificados efeitos contraditórios (Schall *et al.* 1993; Tanaka *et al.* 1993; Taub *et al.* 1993; Loetscher *et al.* 1994). A MIP-1 $\beta$  também se mostrou eficaz na indução do aumento da adesão das células T às Moléculas de Adesão Vascular 1 (VCAM-1) (Tanaka *et al.* 1993).

Em indivíduos que sofrem de AR verificou-se que existe expressão génica de MIP-1 $\beta$  em SP, líquido e tecido sinovial (Robinson *et al.* 1995).

A MCP-1 é conhecida como uma quimiocina importante na inflamação (Matsushima *et al.* 1989; Yoshimura *et al.* 1989). Esta proteína é expressa por várias células: leucócitos, células musculares lisas, células endoteliais e células de linhas tumorais (Graves *et al.* 1989; Strieter *et al.* 1989; Yoshimura *et al.* 1989).

A MCP-1 tem sido implicada na fisiopatologia de doenças inflamatórias, tais como a Ateromatose, Esclerose Múltipla e a AR, desempenhando o principal papel de atrair monócitos e linfócitos T de memória e células *NK* (Allavena *et al.* 1994; Carr *et al.* 1994; Daly *et al.* 2003). Na AR especialmente, tem o papel de recrutar macrófagos para as articulações (Akahoshi *et al.* 1993).

Foi demonstrado em modelos de ratinhos *knockout* para MCP-1 (MCP-1<sup>-/-</sup>) que apesar de existir uma certa redundância relativamente à função de várias quimiocinas e as mesmas terem a capacidade de atrair monócitos *in vitro*, na ausência de MCP-1 o tráfico de monócitos é prejudicado. Por outro lado, a secreção de citocinas por parte dos esplenócitos é alterada também (Lu *et al.* 1998).

Na patologia da AR, a MCP-1 é produzida localmente pelas células do tecido e fluido sinovial dos doentes, mas também pode ser libertada (em menores quantidades) por condrócitos articulares (Villiger *et al.* 1992; Pulsatelli *et al.* 1999; Hayashida *et al.* 2001). Tal como outras quimiocinas, a MCP-1 está implicada na angiogénese sinovial

(Salcedo *et al.* 2000). Em estudos realizados em humanos, verificaram-se elevados níveis de MCP-1 no LS de sujeitos afectados com AR, comparativamente a indivíduos com outras doenças auto-imunes, assim como com indivíduos sãos. De forma similar, os mesmos autores evidenciaram que os níveis desta quimiocina são significativamente maiores no soro de doentes de AR, quando comparados com níveis de indivíduos saudáveis. Paralelamente estudaram também a correlação dos níveis de algumas citocinas na AR, e verificaram que a produção de IL-8 e MCP-1 tem correlação forte positiva tanto em LS como em soro de AR (Stankovic *et al.* 2009). Fibroblastos do LS de AR produzem MCP-1 em resposta à IL-1, TNF- $\alpha$  ou ao IFN- $\gamma$  (Villiger *et al.* 1992; Hosaka *et al.* 1994).

A partir de todas as evidências resultantes de estudos em modelos animais e em estudos em humanos considera-se que a quimiocina MCP-1 é um dos mediadores da inflamação resultante na patologia da AR (Stankovic *et al.* 2009).

A IL-8, membro da família CXC de Quimiocinas é um produto final da cascata de citocinas e desempenha propriedades pró-inflamatórias. Esta citocina é mediadora da activação e migração de neutrófilos do SP para os tecidos (nomeadamente para os tecidos inflamados especialmente na fase aguda da AR), estimula a expressão da integrina  $\beta 2$  e a libertação de L-selectina pelos leucócitos, promove a adesão aos componentes da matriz extracelular, a reorganização do citoesqueleto e a produção de MMP (Szekanecz *et al.* 1998; Szekanecz *et al.* 1998; Hull *et al.* 2001). Em inflamações crónicas como a artrite, a IL-8 é igualmente produzida por linfócitos, monócitos e células endoteliais sinoviais (Deleuran *et al.* 1994). O principal estímulo dado para a produção de IL-8 é feito pelo TNF e pela IL-1 (Troughton *et al.* 1996).

Ensaio nos quais foi feita a injeção intra-articular de IL-8 nas articulações do joelho de coelho resultou na indução de inflamação sinovial (Endo *et al.* 1991).

Esta quimiocina é abundantemente expressa em soro, tecido e LS de doentes de AR (Deleuran *et al.* 1994; Hosaka *et al.* 1994; Koch *et al.* 1995) Os macrófagos no LS são os principais produtores de IL-8, no entanto as células do revestimento sinovial, os fibroblastos e as células endoteliais também excretam esta quimiocina (Hosaka *et al.* 1994; Szekanecz *et al.* 2007).

## 1.6 Objectivos

O objectivo principal deste trabalho foi caracterizar os linfócitos T CD8<sup>+</sup> de doentes com AR para compreender qual o seu potencial envolvimento nesta patologia pois, resultados anteriores de membros da equipa onde se desenvolveu o trabalho, mostraram que, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> têm um papel predominante na patogénese da AR (ensaio realizado em modelos de ratinhos K/BxN com AR espontânea).

Utilizando amostras de sangue periférico e líquido sinovial de doentes com AR estabelecida e controlos saudáveis definiram-se como objectivos secundários as determinações de:

- A. Alterações nas subpopulações funcionais de linfócitos T CD8<sup>+</sup>;
- B. Alterações na produção intracelular de citocinas pró e anti-inflamatórias;
- C. Alterações nos níveis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias e quimiocinas;

De forma a complementar o estudo, o grupo de doentes com AR foi dividido em dois sub-grupos com base no grau de actividade da doença (doença em remissão ou activa), os quais foram objectivo do estudo das mesmas determinações. Tendo em conta a terapia seguida pelos doentes, fez-se igualmente o estudo da influência da administração ou não do fármaco MTX sobre as alterações acima referidas.

## **CAPITULO 2. MATERIAL E MÉTODOS**

## CAPITULO 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

#### 2.1.1 Tampões e Reagentes

- Tampão fosfato-salino 1X (PBS 1X) (*AppliChem*® – Darmstadt Germany)
- Solução Tampão de Lise de Eritrócitos: 8,3g NH<sub>4</sub>Cl (*AppliChem*® – Darmstadt) + 1g KHCO<sub>3</sub> (*AppliChem*® – Darmstadt Germany) + 1,8ml EDTA (*AppliChem*® – Darmstadt Germany) em água MilliQ
- Formalina 4%: Formol (*AppliChem*® – Darmstadt Germany) em água milliQ
- Solução Permeabilizante: 1% Saporina (*AppliChem*® – Darmstadt Germany) + 0,1 Albumina Bovina Sérica (BSA) (*AppliChem*® – Darmstadt Germany) em PBS 1X.

#### 2.1.2 Anticorpos para CF

<b>Tabela 1. Anticorpos específicos para CMF</b>				
	<b>Especificidade</b>	<b>Fluoróforos</b>	<b>Companhia</b>	<b>Clone</b>
<b>Anticorpos de marcação extracelular</b>	CCR7	PE	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	3D12
	CD3	PeCpCy5.5	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	HIT3a
	CD4	PE	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	OKT4
	CD8	APC/FITC	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	SK1/HIT8a
	CD25	FITC	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	BC96
	CD27	FITC	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	O323
	CD45RO	FITC	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	UCHL1
	CD62L	PE/Cy5	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	DREG-56
	CD69	FITC/PE	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	FN50
	CXCR4	APC	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	12G5
<b>Anticorpos de marcação intracelular para citocinas</b>	IL-6	PE	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	MQ2-13A5
	IL-10	PE	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	JES3-9D7
	IL-17A	PE	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	BL168
	IFN- $\gamma$	FITC	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	4S.B3
	GZMB	FITC	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	GB11
	PRF1	FITC	<i>ImmunoTools</i> ® (Friesoythe, Germany)	DeltaG9
TNF- $\alpha$	FITC	<i>BioLegend</i> ® (San Diego, CA, USA)	MAb11	

Foram preparadas as seguintes misturas de mAb:

**1** – Memória e Receptores de *Homing*: CD27 FITC (Isotílcianato de Fluorescência), CCR7 PE (Ficoeritrina), CD62L PE/Cy5 (Ficoeritrina-Cianina 5), CD8 APC (Alofocianina)

**2** - Memória: CD45RO FITC, CD27 PE, CD62L PE/Cy5, CD8 APC

**3** - Activação: CD25 FITC, CD69 PE, CD62L PE/Cy5, CD8 APC

- 4 – Receptores de *Homing*: CD8 FITC, CD69 PE, CD62L PECy5, CXCR4 APC
- 5 – Citocinas Pró-inflamatórias: IFN- $\gamma$  FITC, IL-17A PE, CD62L PECy5, CD8 APC
- 6 – Citocinas Pró-inflamatórias: TNF- $\alpha$  FITC, IL-6 PE, CD62L PECy5, CD8 APC
- 7 – Citocinas anti-inflamatória: CD69 FITC, IL-10 PE, CD62L PECp5, CD8 APC
- 8 – Enzimas citolíticas: GZMB FITC, CD69 PE, CD62L PECy5, CD8 APC
- 9 – Enzimas citolíticas: PRF1 FITC, CD69 PE, CD62L PECy5, CD8 APC

Estas mesmas misturas foram preparadas a partir de 1,5 $\mu$ l de cada mAb para um volume total de 100  $\mu$ l, em PBS 1X.

### 2.1.3 KITs de Quantificação de Citocinas e Quimiocinas

- *KIT FlowCytomix Human Th1/Th2 11 Plex*, BMS810FF (*eBioscience*, Inc., USA)
- *KIT FlowCytomix Human Chemokine 6 Plex*, BMS813FF (*eBioscience*, Inc., USA)

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Doentes em estudo

Para a caracterização fenotípica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> na AR foram incluídos neste estudo 99 doentes com o diagnóstico de Artrite Reumatóide de acordo com os critérios de classificação ACR 1987, seguidos prospectivamente na consulta de Reumatologia dos HUC, sendo o período de recrutamento de Abril de 2010 a Abril de 2011. Foram incluídos no estudo doentes com mais de 18 anos de idade, que não fossem portadores de qualquer neoplasia ou infecção concomitante e que aceitassem participar voluntariamente no estudo.

Os doentes incluídos apresentavam uma idade média de 58,52  $\pm$  11,59 anos (idade entre os 21 e 86 anos), sendo 78,8% do sexo feminino.

O projecto foi alvo de aprovação ética local e os doentes participantes no estudo foram devidamente informados e deram o seu consentimento informado por escrito.

Os indivíduos portadores de AR foram classificados como doentes em remissão (AR<sub>Remissão</sub>) e doentes com doença activa (AR<sub>Activa</sub>) de acordo com os novos critérios de remissão ACR/EULAR 2010, segundo o qual a doença é considerada activa quando: número de Articulações dolorosas maior do que 1, número de Articulações tumefactas maior do que 1 e valor de PCR maior do que 1 mg/dl (Aletaha *et al.* 2010; Felson *et al.* 2011).

Dados clínicos referentes ao doente, como o número de articulações envolvidas, valores laboratoriais e terapêutica actual foram fornecidos pelos profissionais de saúde utilizando para isso um formulário respectivo para esse fim.

De forma a obter SP total desses doentes, este foi colhido durante as consultas e internamentos em alguns dos casos, o qual foi recolhido em tubos de colheita de sangue com anticoagulante EDTA.

Apenas a sete doentes (com idade média de  $65,23 \pm 7,82$ , sendo 75% do sexo feminino) em estudo foi recolhido liquido sinovial, sendo que este foi recolhido num recipiente esterilizado adequado para esse fim.

Para 82 dos doentes do grupo em estudo (com idade média de  $58,52 \pm 11,09$ , sendo 73,6% do sexo feminino) foi recolhido também SP para análise de soro para quantificação de citocinas e quimiocinas em tubos sem anticoagulante que continham um gel separador com activante de coágulo.

### 2.2.2 Grupo controlo

De forma a permitir um estudo comparativo com indivíduos sem a patologia em estudo, ou seja, com controlos saudáveis, procedeu-se à recolha de células leucocitárias a partir de filtros de recolha de sangue fornecidos pelo Instituto Português do Sangue de Coimbra (IPS de Coimbra). Este grupo de controlo foi constituído por 53 indivíduos com idade média de  $41,93 \pm 12,25$  (com idades entre 21 e 64 anos), dos quais 49% representam o sexo feminino.

Também de forma a termos controlos saudáveis para a comparação estatística com soro de doentes de AR, foi recolhido soro a partir de 30 indivíduos dadores de sangue do IPS de Coimbra, com idade média de  $50,83 \pm 8,20$  anos, entre os quais 53,3% eram do sexo feminino.

As alíquotas de soro e LS foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior detecção de citocinas e quimiocinas séricas por CF.

### **2.2.3** Processamento do SP (doentes de AR e controlos) e do LS para a caracterização fenotípica das células T CD8<sup>+</sup>

Para se proceder ao estudo das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup>, efectuou-se a lise dos glóbulos vermelhos através de uma incubação com um tampão de lise de eritrócitos durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, centrifugaram-se as amostras a 1500 rpm durante 5 minutos à temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante, e procedeu-se à lavagem das mesmas em PBS 1X, seguida de uma nova centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos.

Para o estudo das populações celulares de interesse, realizou-se a incubação de 50  $\mu\text{l}$  de células de cada amostra (aproximadamente  $1,6 \times 10^5$  células) com 30  $\mu\text{l}$  de cada mistura de mAb preparada. Esta primeira incubação com um painel de anticorpos de marcação extracelular, foi feita durante 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente. Para proteger a integridade celular, as células após a incubação, com as misturas de anticorpos, foram fixadas com 100  $\mu\text{l}$  de formalina a 4% durante 10 minutos. Após o tempo de fixação procedeu-se à lavagem das amostras com 1 ml de PBS 1X, seguida de uma centrifugação das amostras a 1500 rpm durante 5 min à temperatura ambiente. Terminada a centrifugação descartou-se o sobrenadante, e, nos tubos com marcação extracelular apenas, adicionou-se 200  $\mu\text{l}$  de PBS 1X, estando estes prontos para a análise no citómetro de fluxo. Nos tubos respeitantes à análise intracelular, após ter sido descartado o sobrenadante, adicionou-se 50  $\mu\text{l}$  de solução permeabilizante e 30  $\mu\text{l}$  da mistura dos respectivos painéis de anticorpos de marcação intracelular durante 20 minutos, igualmente no escuro. Fez-se por fim uma lavagem com PBS seguida de uma centrifugação a 1500 rpm, após a qual se removeu o sobrenadante. As células foram por fim ressuspensas em 200  $\mu\text{l}$  de PBS 1X. Para o processamento do LS realizaram-se

igualmente as incubações com as mesmas marcações extracelulares e intracelulares, reproduzindo-se o protocolo referido anteriormente.

Imediatamente depois, a expressão de marcadores de superfície celular e de marcadores intracelulares foi analisada por citometria de fluxo (CF) através do uso do *BD FACSCalibur™* (Becton, Dickinson and Company, © USA).

#### **2.2.4** Quantificação da concentração de Citocinas e Quimiocinas no soro de doentes de AR por um imunoensaio baseado na utilização de microesferas, CBAs (*Cytometric Bead Array*).

As citocinas e as quimiocinas presentes no soro dos doentes de AR e dos controlos foram quantificadas através de CBAs. Este método é baseado numa aplicação da CF que permite aos utilizadores quantificar simultaneamente várias proteínas.

Ou seja, ensaios de CBAs proporcionam um método de captura de um analito solúvel ou conjuntos de analitos com microesferas de fluorescência e tamanhos conhecidos, de forma a detectar analitos utilizando a CF. Cada microesfera encontra-se conjugada com anticorpos específicos para um determinado analito. O reagente de detecção fornecido no KIT é uma mistura de Ac conjugados com Estreptavidina - PE, que gera um sinal fluorescente proporcional à quantidade de analito ligado.

As várias microesferas, cada uma revestida com Ac específicos para um determinado analito a ser medido, são incubadas com as amostras em estudo e com as misturas padrão (*standard*). Durante o tempo de incubação os analitos presentes nas soluções ligam-se aos Ac ligados às esferas fluorescentes. Quando é adicionada a segunda mistura de Ac na qual têm biotina conjugada, os Ac específicos ligam-se aos analitos capturados pelos primeiros Ac. Por fim, numa segunda incubação, é colocada a solução Estreptavidina ligada ao fluoróforo PE, que se liga ao conjugado de biotina e emite sinais fluorescentes (Figura 5). Estes complexos podem ser medidos utilizando a CF, permitindo desta forma entre várias aplicações, quantificar proteínas (Ormerod *et al.* 2008).



**Figura 5.** Exposição esquemática do fundamento do método de CBAs utilizado (Ormerod *et al.* 2008).

Foi utilizado este método de quantificação pois reduz significativamente os requisitos em termos de quantidade de amostra, e também o tempo necessário para obtermos resultados comparativamente com técnicas com ELISA e *Western blot*.

Para a quantificação das citocinas recorreu-se ao uso do KIT *FlowCytomix Human Th1/Th2 11 plex*, BMS810FF (*eBioscience, Inc., USA*). Este kit permitiu a quantificação de: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ . No caso das quimiocinas utilizou-se o KIT *FlowCytomix Human Chemokine 6 Plex*, BMS813FF (*eBioscience, Inc., USA*). O KIT permitiu a quantificação de quimiocinas como a IL-8, MCP-1, MIG, MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$ .

Antes da realização do protocolo fornecido no manual do KIT utilizado, procedeu-se à preparação dos reagentes e das amostras conforme descrito no mesmo, utilizando as soluções fornecidas. Entre esses preparou-se: solução tampão (*assay buffer*); a solução padrão (*standard*) a partir da qual se obtiveram por diluições seriadas as soluções padrão para a construção da recta de calibração, a solução de mistura de *beads*, a solução de Ac biotilado e a solução de Estreptavidina-PE, que se liga à biotina.

Depois de preparadas as soluções utilizadas para a construção da recta de calibração e a solução tampão utilizada como branco, procedeu-se à realização do protocolo de forma igual e paralela às amostras de soro de doentes e controlos.

Pipetaram-se 25 $\mu$ l de soluções padrão, branco e amostras respectivamente para os tubos de citometria. A estes adicionaram-se 25 $\mu$ l da solução de mistura de *beads* e 50  $\mu$ l da solução de anticorpo biotilado e agitou-se no vórtex de forma a proporcionar a

homogeneização do conteúdo a incubar à temperatura ambiente no escuro durante duas horas.

Para a lavagem, adicionou-se 1ml de solução tampão a todos os tubos e centrifugou-se a 1000 rpm durante 5 minutos e repetiu-se a lavagem depois de ser rejeitado o sobrenadante da primeira lavagem. Adicionou-se por fim a solução de Estreptavidina a todos os tubos, agitaram-se no vortéx todos os tubos de citometria, e colocaram-se a incubar no escuro durante uma hora. Para finalizar o protocolo realizaram-se novamente duas lavagens com solução tampão. Por fim ressuspendeu-se o *pellet* em 500µl desta mesma solução tampão.

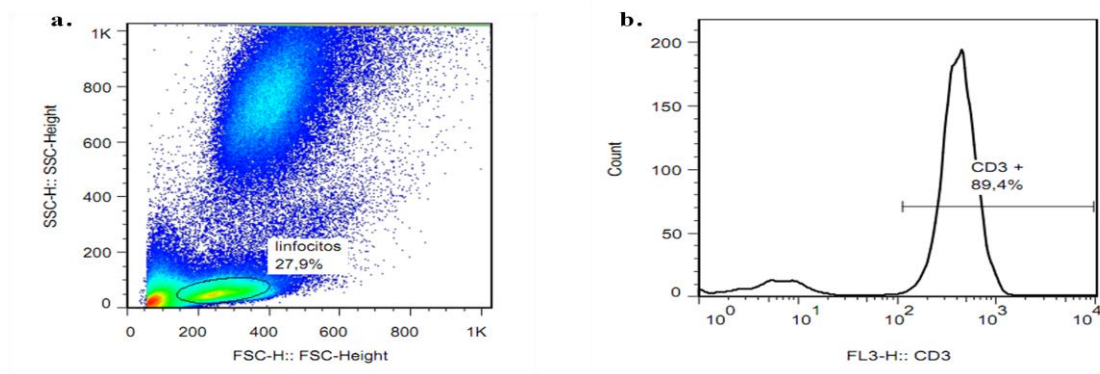
Logo após o término do protocolo, realizou-se a quantificação proteica no citómetro de fluxo *BD FACSCalibur™* (Becton, Dickinson and Company, © USA).

### 2.2.5 Análise por CF

As amostras analisadas por este método são suspensas inicialmente numa solução que vai permitir que essas sejam incluídas numa corrente de fluxo laminar dum líquido condutor, que as faz passar uma a uma através de uma câmara de fluxo. Esta câmara é atravessada por um feixe de raios laser com comprimento de onda pré-estabelecido. Sempre que o raio laser incide numa célula, a radiação sofre desvios que depois de serem convertidos pelo citómetro em sinais electrónicos, são reconhecidos pelos sensores. Um dos sensores é designado por Ângulo de Dispersão Frontal, FSC (*Forward Angle Light Scatter*) porque se encontra colocado no sentido da direcção do feixe luminoso. O outro sensor situa-se a cerca de 90° dessa direcção, designando-se devido a isso Ângulo de Dispersão Lateral, SSC (*Side Scatter*). Desta forma o sensor FSC dá informação acerca do tamanho da célula, baseado na difracção e refracção da luz, enquanto o sensor SSC, que mede a luz dispersada, avalia a granulosidade intracelular.

Como os citómetros de fluxo possuem também sensores especializados em medir a fluorescência, os filtros ópticos desses sensores permitem separar os diversos componentes do espectro de emissão. De todas as informações que provêm dos vários sensores, a parte informática do citómetro, de acordo com as características das células, agrupa-as em histogramas virtuais, facilitando desta forma a análise pelos utilizadores.

Para a imunofenotipagem dos linfócitos neste trabalho por CF, foi feito a selecção inicial (*gate*) no histograma inicial para essa população celular. De forma a circunscrever as células T, foi tido em conta a expressão de CD3. Apenas as células CD3<sup>+</sup> foram recrutados como linfócitos T para a análise da expressão de Ac pelas células T CD8<sup>+</sup> no decorrer da análise (Figura 6).



**Figura 6. Gate de linfócitos.** a. No *Dotplot* podemos observar as várias populações (Linfócitos, Granulócitos e Mónocitos) e restos celulares (zona junto ao eixo SSC); a partir deste foi feito o *gate* para os linfócitos. b. Histograma a partir do qual são recrutadas apenas as células CD3<sup>+</sup>, ou seja, os linfócitos T.

Para a análise dos resultados foi utilizado o *software FlowJo 7.6. 1 (Tree Star Inc., Ashland USA)*.

### 2.2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do recurso ao *software IBM SPSS STATISTICS 17* para Windows (versão 17; *IBM®SPSS®Software, USA*).

As variáveis categóricas foram apresentadas sob a forma de proporções e as variáveis contínuas como Média±Desvio Padrão ou Mediana (Inter-Quartis), conforme adequado.

Para as análises de amostras pequenas ( $n < 30$ ), a distribuição da normalidade dos dados foi analisada através do teste de *ShapiroWilk*. Nos casos em que o número das amostras era maior ( $n > 30$ ) o Teorema do Limite central foi aplicado para justificar o uso dos Testes Paramétricos.

A comparação da expressão de subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> entre os grupos em estudo (doentes de AR e Controlo) foi feita utilizando o Teste *T-student* para 2

amostras independentes. Para a análise comparativa dos níveis dessas subpopulações entre indivíduos com doença em remissão ( $AR_{\text{Remissão}}$ ) e indivíduos com doença activa ( $AR_{\text{Activa}}$ ) utilizou-se o Teste de *Mann-Witney* (Teste não paramétrico para duas amostras independentes). Quando realizada a análise estatística para comparar as frequências das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> entre SP e LS dos doentes de AR utilizámos o Teste de *Wilcoxon* (Teste Não Paramétrico para duas amostras emparelhadas). Para a comparação das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> entre doentes de AR que não seguiram um tratamento com MTX e doentes de AR aos quais foi administrado MTX foi aplicado o Teste de *Mann-Witney*.

Para medir o grau de correlação dos níveis das várias citocinas expressas por células T CD8<sup>+</sup> em SP de doentes de AR foram utilizados Testes Paramétricos, com base no coeficiente de correlação de *Pearson* ( $r$ ). Para indicar igualmente a forma como se correlacionam os níveis dessas subpopulações mas em LS dos doentes de AR, aplicaram-se Testes Não Paramétricos, nos quais se recorreu à determinação do coeficiente de correlação de *Spearman* ( $\rho$ ).

Na confirmação de existência ou não de correlação das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> entre SP e LS de doentes de AR, foram aplicados os Testes Não Paramétricos, e consequentemente foi empregue o coeficiente de correlação de *Spearman*.

Nos estudos de correlação, esta foi considerada moderada quando os coeficientes de correlação de *Pearson* e *Spearman*,  $|r|$  e  $|\rho|$  respectivamente, se encontravam entre 0,4 e 0,7, e correlação forte quando foram superiores a 0,7.

Na segunda fase do trabalho, após a quantificação de citocinas e quimiocinas no soro de doentes de AR, as concentrações dessas proteínas foram comparadas entre o grupo de doentes e um grupo de indivíduos sãos; foram também comparadas entre pessoas com  $AR_{\text{Remissão}}$  e  $AR_{\text{Activa}}$  assim como entre doentes que não adoptaram e adoptaram uma terapêutica com MTX; para estas comparações foram utilizados Testes Não Paramétricos. Foi também estudada a presença ou não de correlação dessas proteínas no soro desses doentes através de Testes Paramétricos, sendo que foi aplicado o coeficiente de correlação de *Pearson*.

Para todas as análises estatísticas, foi considerado um  $p\text{-value} < 0,05$  estatisticamente significativo.

## **CAPITULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## CAPITULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Resultados da caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos CD8<sup>+</sup> em SP e LS de doentes de AR e estudo das alterações das mesmas subpopulações devido à terapêutica com MTX

#### 3.1.1 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> - Estudo comparativo entre AR e Controlos saudáveis a partir de SP

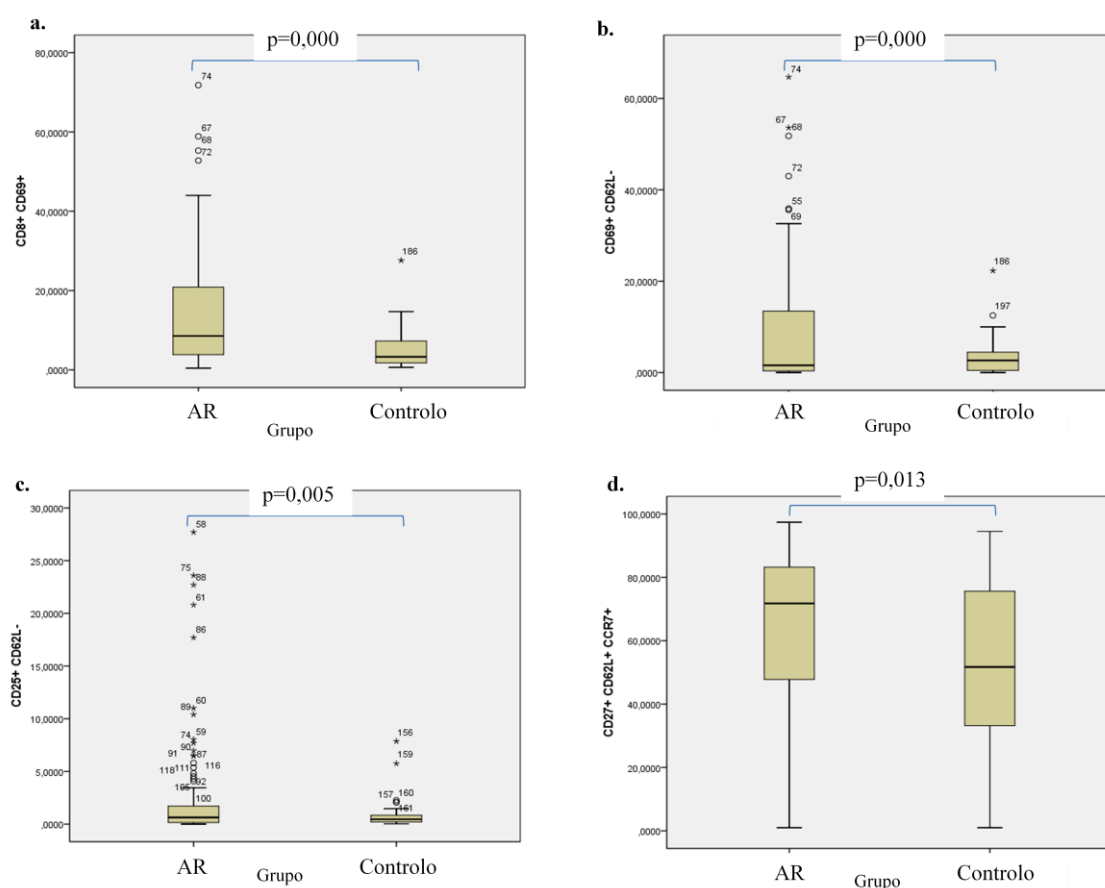
Quando analisadas por CF e comparadas estatisticamente as várias populações de células T CD8<sup>+</sup> de doentes de AR e Controlos saudáveis (Tabela 2) verificou-se que existem diferenças significativas entre esses dois grupos em estudo para seguintes populações: CD69<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, CD45R0<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, GZMB<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, IL-6<sup>+</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>.

**Tabela 2. Frequência de várias subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> com base na expressão de marcadores moleculares em SP de doentes de AR (Percentagem em linfócitos totais – Média (Desvio Padrão))**

Subpopulações de células T CD8 <sup>+</sup>	AR (N=99)	Controlo (N=53)	p-value
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	24,6±15,407	29,1±10,8	NS
<b>Subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> Activadas</b>			
CD25 <sup>+</sup>	1,5±2,3	1,1±0,8	NS
CD69 <sup>+</sup>	14,3±14,7	5,1±4,8	0,000
CD25 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (Subpopulação de memória)	1,5±3,7	0,8±0,9	NS
CD69 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (Subpopulação de memória)	3,7±5,1	3,5±3,9	NS
<b>Subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> Efeitoras Activadas</b>			
CD69 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>	8,9 ±13,7	3,4± 3,8	0,000
CD25 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>	2,6±5,3	0,9±1,5	0,005
<b>Subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> de Memória</b>			
CD45R0 <sup>+</sup>	22,0±19,2	13,1±13,9	0,007
CD27 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> (Memória Efeitora)	22,0±17,2	25,2±17,0	NS
CD27 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (Memória Central)	31,7±20,3	30,8±20,8	NS
<b>Receptores de Homing</b>			
CXCR4 <sup>+</sup>	36,6±26,6	30,4±24,7	NS
CD69 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> CXCR4 <sup>+</sup> (Subpopulação de Células Efeitoras activadas)	28,6±29,5	24,7±22,0	NS
CD27 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> (Memória Central)	63,5±24,8	52,7±25,1	0,013
CD27 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> (Memória Efeitora)	77,5±22,8	71,5±22,1	NS

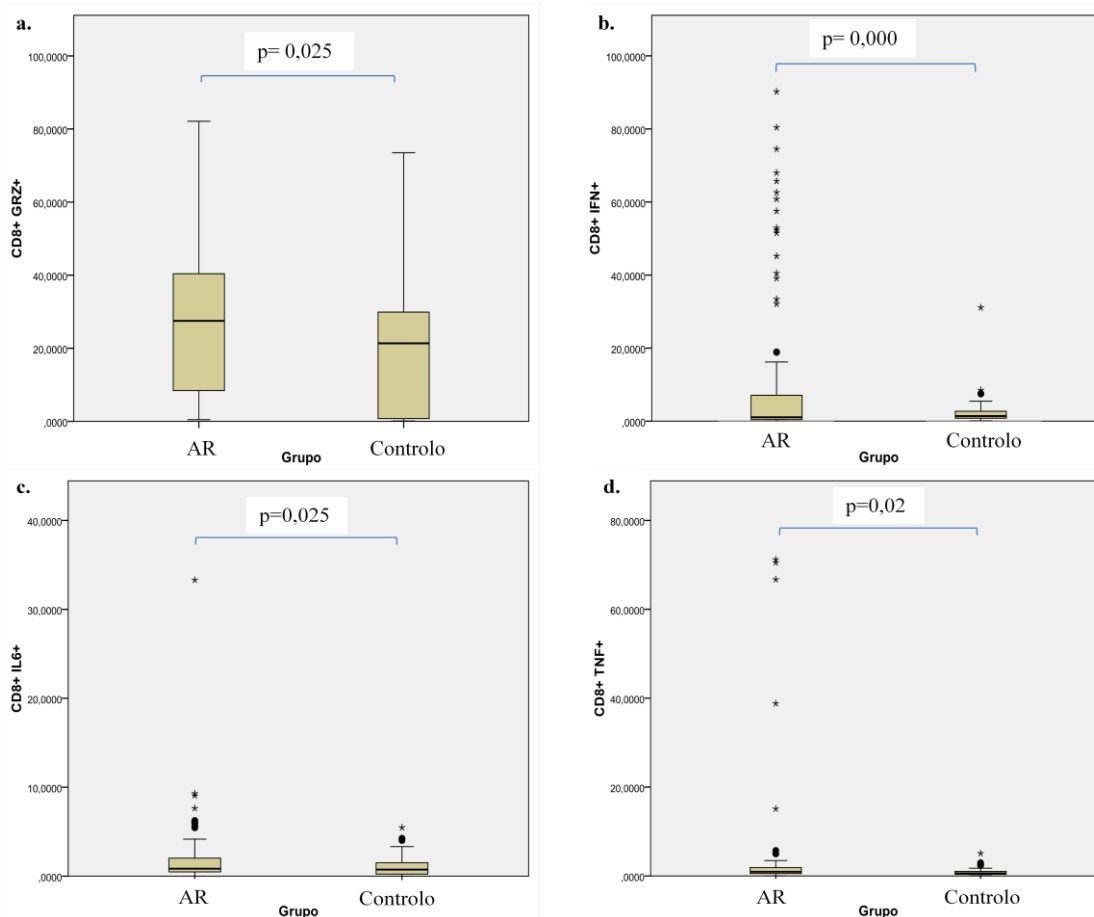
Frequência de células T CD8+ produtoras de citocinas			
GZMB	28,0±20,5	19,3±18,0	0,025
IFN- $\gamma$	11,6±22,0	2,5±4,4	0,000
IL-17	6,9±13,7	7,7±15,2	NS
IL-6	2,1±3,9	1,1±1,2	0,025
TNF- $\alpha$	4,0±12,8	0,9±0,9	0,02
IL-10	1,4±2,3	2,8±6,7	NS
PRF1	1,8±9,1	4,9±12,4	NS

A figura 7 apresenta a distribuição das frequências das subpopulações em que verificámos diferenças significativas entre doentes AR e indivíduos saudáveis.



**Figura 7.** Comparação entre as frequências das várias subpopulações de células T CD8+ com base na expressão de marcadores moleculares em SP de doentes de AR e controlos saudáveis. **a.** Para a subpopulação de células T CD8+ activadas (T CD8+CD69+) obtivemos diferenças significativas entre os dois grupos em estudo. **b. e c.** Para as subpopulações de células T CD8+ efectoras activadas apresentadas nos *Boxplot* verificaram-se diferenças significativas entre as suas frequências no SP de doentes de AR e controlos saudáveis. **d.** Para a subpopulação de células T CD8+ que expressa o receptor de *homing* CCR7 verificámos existirem diferenças significativas entre os dois grupos.

A figura 8 apresenta a distribuição das frequências dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> produtores de citocinas intracelulares em que verificámos diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre doentes de AR e indivíduos saudáveis.



**Figura 8. Comparação entre as frequências das citocinas intracelulares expressas por células T CD8<sup>+</sup> em SP de doentes de AR e controlos saudáveis.** **a.** No primeiro *Boxplot* podemos confirmar que existem diferenças significativas da expressão e intracelular de GZMB entre doentes de AR e os Controlos. **b.** Verificámos também que existem diferenças significativas na expressão de IFN- $\gamma$  pelos dois grupos. **c.** Para a IL-6, tal como podemos confirmar pelo *Boxplot*, obtiveram-se diferenças significativas entre as frequências desta citocina em doentes de AR e em controlos. **d.** Igualmente para o TNF- $\alpha$  obtiveram-se diferenças significativas entre os doentes em estudo e os controlos.

### 3.1.2 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> - Estudo comparativo entre AR com doença em remissão e AR com doença activa a partir de SP

Após classificação dos doentes de AR em activos e em remissão segundo os critérios referidos procedemos à análise por CF das populações leucocitárias obtidas a partir dos respectivos SP, e as populações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram comparados

estatisticamente (Tabela 3). Para as seguintes populações obtiveram-se diferenças significativas entre esses dois grupos de doentes de AR: CD69<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CXCR4<sup>+</sup> e TNF- $\alpha$ .

<b>Tabela 3. Frequência de várias subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> com base na expressão de marcadores moleculares em SP de doentes de AR com diferentes actividades da doença (Percentagem em linfócitos totais – Mediana (Q1-Q3))</b>			
<b>Subpopulações de células T CD8<sup>+</sup></b>	<b>AR Remissão (N=58)</b>	<b>AR Activa (N=33)</b>	<b>p-value</b>
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	22,0 (16,4 – 29,8)	21,4 (18,6 – 32,9)	NS
<b>Subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> Activadas</b>			
CD25 <sup>+</sup>	0,9 (0,5 – 1,5)	0,9 (0,3 – 1,5)	NS
CD69 <sup>+</sup>	10,5 (5,2 – 23,9)	6,1 (2,5 – 14,9)	0,037
CD25 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (Subpopulação de memória)	0,5 (0,3 – 1,6)	0,6 (0,2 – 1,5)	NS
CD69 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (Subpopulação de memória)	1,7 (0,6 – 5,6)	2,0 (0,6 – 5,6)	NS
<b>Subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> Efeitoras Activadas</b>			
CD69 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>	5,4 (0,6 – 21,1)	0,6 (0,2 – 1,4)	0,000
CD25 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>	0,7 (0,3 – 3,4)	0,4 (0,1 – 1,0)	0,049
<b>Subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> de Memória</b>			
CD45R0 <sup>+</sup>	16,2 (4,4 – 34,1)	11,4 (4,1 – 18,1)	NS
CD27 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> (Memória Efeitora)	21,5 (12,1 – 36,0)	11,3 (6,0 – 20,0)	0,000
CD27 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> (Memória Central)	21,0 (10,2 – 43,9)	40,4 (23,0 – 53,1)	0,003
<b>Receptores de Homing</b>			
CXCR4 <sup>+</sup>	38,3 (8,1 – 62,8)	30,7 (11,5 – 47,9)	NS
CD69 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> CXCR4 <sup>+</sup> (Subpopulação de Células Efeitoras activadas)	28,7 (3,6 – 65,6)	9,2 (3,0 – 22,4)	0,035
CD27 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> (Memória Central)	70,4 (47,0 – 83,2)	73,3 (44,4 – 83,0)	NS
CD27 <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup> CCR7 <sup>-</sup> (Memória Efeitora)	78,0 (59,6 – 95,0)	88,7(20,6 – 92,7)	NS
<b>Frequência de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de citocinas</b>			
GZMB	18,2 (7,5 – 37,1)	34,8 (7,9 – 43,3)	NS
IFN- $\gamma$	0,9 (0,4 – 3,9)	2,6 (0,4 – 44,0)	NS
IL-17	1,2 (0,2 – 11,3)	1,1 (0,5 – 7,2)	NS
IL-6	0,8 (0,4 – 1,8)	1,6 (0,5 – 3,6)	NS
TNF- $\alpha$	1,2 (0,6 – 2,0)	0,7 (0,4 – 1,3)	0,034
IL-10	0,4 (0,2 – 1,1)	1,0 (0,1 – 2,3)	NS
PRF1	0,5 (0,2 – 0,8)	0,3 (0,1 – 0,6)	NS

### 3.1.3 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> - Estudo comparativo entre SP e LS de doentes de AR

Para o grupo de doentes que doaram SP e LS para o estudo, foram analisadas e comparadas estatisticamente as suas populações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Tabela 4). Foram obtidas diferenças significativas entre os dois grupos em análise para as seguintes

populações: CD69<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>, CXCR4<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CXCR4<sup>+</sup>.

<b>Tabela 4. Frequência de várias subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> com base na expressão de marcadores moleculares em SP de doentes de AR com diferentes actividades da doença (Percentagem em linfócitos totais – Mediana (Q1-Q3))</b>			
<b>Subpopulações de células T CD8<sup>+</sup></b>	<b>AR<sub>SP</sub> (N=8)</b>	<b>AR<sub>LS</sub> (N=8)</b>	<b>p-value</b>
<b>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup></b>	33,6 (22,1 – 38,1)	44,5 (17,6 – 50,3)	NS
<b>Subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> Activadas</b>			
<b>CD25<sup>+</sup></b>	0,9 (0,5 – 1,5)	2,3 (0,7 – 6,1)	NS
<b>CD69<sup>+</sup></b>	7,0 (5,2 – 9,9)	55,6 (44,1 – 63,4)	0,018
<b>CD25<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup></b> (Subpopulação de memória)	0,5 (0,3 – 1,6)	0,9 (0,1 – 5,7)	NS
<b>CD69<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup></b> (Subpopulação de memória)	5,1 – (0,7 – 5,7)	14,4 (12,6 – 24,6)	0,018
<b>Subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> Efectoras Activadas</b>			
<b>CD69<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup></b>	1,6 (0,4 – 14,1)	36,9 (24,0 – 55,0)	0,012
<b>CD25<sup>+</sup> CD62L<sup>-</sup></b>	0,6 (0,2 – 1,6)	0,5 (0,2 – 1,4)	NS
<b>Subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> de Memória</b>			
<b>CD45R0<sup>+</sup></b>	13,3 (4,4-28,6)	43,8 (23,3 – 83,1)	NS
<b>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup></b> (Memória Efectora)	12,0 (8,7 – 20,8)	37,9 (36,8 – 50,1)	0,043
<b>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup></b> (Memória Central)	28,3 (14,5 – 46,8)	25,8 (15,2 – 39,3)	NS
<b>Receptores de Homing</b>			
<b>CXCR4<sup>+</sup></b>	36,1 (17,1 – 54,6)	86,5 (71,4 – 96,9)	0,028
<b>CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup></b> <b>CXCR4<sup>+</sup></b> (Subpopulação de Células activadas)	18,2 (6,0 - 35,7)	65,1 (47,2 – 90,3)	0,008
<b>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup></b> (Memória central)	71,7 (47,2 – 83,1)	43,5 (22,0 – 82,5)	NS
<b>CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup></b> (Memória Efectora)	87,1 (67,3 – 94,6)	91,5 (55,0 – 96,7)	NS
<b>Frequência de células T CD8<sup>+</sup> produtoras de citocinas</b>			
<b>GZMB</b>	14,8 (1,5 – 35,2)	16,3 (3,2 – 72,3)	NS
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	0,9 (0,4 – 2,2)	1,4 (0,8 – 25,5)	NS
<b>IL-17</b>	4,99 (2,7 – 21,7)	31,4 (7,7 – 66,7)	0,028
<b>IL-6</b>	3,1 (2,2 – 4,2)	9,7 (2,5 – 31,0)	NS
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,2 (0,5 – 2,5)	1,8 (1,1 – 3,7)	NS
<b>IL-10</b>	1,8 (1,2 – 4,1)	10,2 (6,2 – 18,0)	0,043
<b>PRF1</b>	0,5 (0,3 – 35,6)	0,8 (0,2 – 3,3)	NS

### 3.1.4 Discussão dos resultados obtidos respectivos à caracterização fenotípica das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> feita a partir dos vários estudos realizados em SP e LS de doentes de AR e controlos saudáveis

As células T CD8<sup>+</sup>, tal como as células Tregs, desempenham as suas funções supressivas através da libertação celular de citocinas ou então directamente alterando o estado funcional das células T e das APCs (Konya *et al.* 2009).

As citocinas revelam uma grande importância no processo inflamatório em várias doenças crônicas, tal como a AR, o que leva a crer que a sua expressão pelas células T CD8<sup>+</sup> tanto no SP como no LS é mais representativa do estado da doença, do que propriamente a frequência de células T CD8<sup>+</sup>.

Neste trabalho não obtivemos diferenças significativas da população T CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> entre doentes de AR e indivíduos saudáveis, no entanto esta população era menor no primeiro grupo em estudo. Esta diferença também já foi descrita por outros autores, os quais justificam que indivíduos com doenças autoimunes expressam um menor número de células T CD8<sup>+</sup> (efectoras) funcionais (Konya *et al.* 2009). Verificámos também que os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> estão presentes em maior frequência no LS dos doentes de AR comparativamente ao SP dos mesmos, apesar desta diferença não ser significativa. Estes resultados estão de acordo com o esperado, pois visto que esta população tem maioritariamente uma função citotóxica e esta patologia ser caracterizada por processos inflamatórios a nível das articulações, é natural que haja uma maior afluência deste grupo de células para esse local, e por outro lado, na literatura há referência que cerca de 40% das células T totais infiltradas na membrana sinovial são linfócitos T CD8<sup>+</sup>, o que vem ao encontro dos 44,5% desses linfócitos encontrados neste ensaio no LS de doentes de AR (McInnes 2003).

a. Subpopulação de células Activadas

Fisiologicamente, quando as células T CD8<sup>+</sup> são activadas, para além de expressarem CD62L expressam também o receptor CD25 e a proteína de superfície CD69. Neste trabalho, não se obtiveram diferenças significativas relativamente às frequências de linfócitos T CD8<sup>+</sup> que expressam o receptor CD25 entre o SP de doentes de AR e de indivíduos sãos. No entanto, seria de esperar uma forte presença dessa subpopulação no grupo de doentes, visto que a proteína CD25 é um marcador de activação das células T. Sugerimos então que a expressão do receptor CD25 a nível da membrana das células T CD8<sup>+</sup> não distingue indivíduos com AR e controlos sãos. Quando analisámos os resultados obtidos para o estudo desta população em indivíduos com diferente actividade da doença, conferimos que as CTLs activadas que expressam esse receptor não classificam diferentes actividades da doença, o que mais uma vez demonstra que a sua frequência nos diferentes grupos (AR com diferentes actividades e

controles) é semelhante. Verificámos também que para a expressão de CD25 pelas células T CD8<sup>+</sup> entre SP e LS de doentes de AR não existem diferenças significativas, no entanto como esperávamos existe maior percentagem da mesma em LS devido a ser um local de inflamação no qual os linfócitos T activados estão maioritariamente localizados.

Nós concluímos que a avaliação da expressão a nível da membrana do CD25 não é suficiente para a estimar o estado de activação das células T CD8<sup>+</sup> em relação ao estado da doença.

Quanto aos resultados das células T CD8<sup>+</sup> activadas nos OLS com fenótipo CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, demonstraram que essa subpopulação no SP não apresenta diferenças significativas entre doentes e indivíduos sãos. Os resultados descritos para a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> foram igualmente observados para a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> activadas de memória (CD62L<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), tanto na análise comparativa das suas frequências no SP de doentes com diferente actividade da doença, assim como quanto às diferenças obtidas entre SP e LS dos doentes de AR. Desta forma apontamos a razão desse comportamento para as mesmas evidências já referidas. Ou seja, a expressão de CD25 pelas CTLs não caracteriza a presença de doença, e assim também as CTLs activadas de memória não nos permitem igualmente fazer essa distinção, o que leva a dizer que estas subpopulações não serão boas indicadora da presença/estado da doença quando se pretende fazer confirmar um prognóstico para a mesma. Por outro lado, o facto de mais uma vez a subpopulação que expressa CD25 e CD62L apresentar ligeiramente maiores frequências no LS comparativamente ao SP dos doentes de AR, poderá dever-se ao facto desse ser o local principal de inflamação nesses doentes, e onde se encontra o maior foco de CTLs, tal como já discutimos.

Quanto à proteína de superfície CD69, os resultados evidenciam que existe uma maior expressão desta molécula no SP dos doentes de AR ( $p < 0,001$ ), comparativamente aos controlos, o que nos demonstra que esta molécula é o indicador mais evidente para o estado de activação das células T CD8<sup>+</sup>, ao contrário do que podemos verificar com o receptor de membrana CD25. Também com base no mesmo fundamento, encontramos diferenças significativas da expressão de CD69 pelas células T CD8<sup>+</sup> no SP comparativamente ao LS de doentes de AR, havendo maiores percentagens dessa

subpopulação no LS, ou seja, no local de inflamação, onde existe maior afluência de células T activadas. Num estudo feito em modelos de artrite espontânea em ratinhos K/BxN foram obtidos resultados muito semelhantes (Raposo *et al.* 2010).

Quando observados os resultados da comparação das frequências obtidas para esta subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> activadas entre indivíduos com diferente actividade da doença, verificámos que o grupo com doença em remissão apresentava valores significativamente maiores no SP comparativamente ao grupo com doença activa. Alegamos que esta redução nos indivíduos com grande actividade se deva a dois mecanismos imuno-reguladores: na fase activa da doença, as células T CD8<sup>+</sup> activadas podem sofrer de uma regulação inibitória a nível celular devida à secreção de citocinas anti-inflamatórias por células especializadas (Treg) ou, por outro lado, de uma regulação negativa a nível molecular da proteína CD69, sendo esta molécula envolvida na expressão do Factor de Crescimento Tumoral beta (TGF-β), essencial no controlo da resposta imune (Sancho *et al.* 2003). Em consequência, a gravidade da doença é maior devido à falta de células T CD8<sup>+</sup> activadas na resolução da inflamação. Mais uma vez os nossos resultados apontam para uma enorme importância das células T CD8<sup>+</sup> activadas na actividade e manutenção desta patologia, tal como outros autores já demonstraram (Afeltra *et al.* 1993; Afeltra *et al.* 1997).

Tendo em conta o que já foi dito relativamente às proteínas de membrana com papel na activação dos linfócitos T CD8, os nossos resultados sugerem que o marcador celular CD69 apresenta diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de doentes de AR e indivíduos saudáveis, implicando que esse marcador seja sintetizado de forma dissociada do receptor CD25, tal como sugeriu Sheu num estudo do Cancro do Colo do Útero (Sheu *et al.* 1997).

Comparando, entre indivíduos controlo e doentes, a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> activadas de memória, que expressa simultaneamente CD69 e CD62L após activação obtivemos resultados semelhantes aos descritos para a subpopulação CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> no SP entre doentes e controlos. Quanto à comparação dessa subpopulação em SP e LS também obtivemos, tal como esperado por ser o local fulcral do processo inflamatório, significativamente maiores níveis no LS dos doentes de AR.

b. Subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> efectoras activadas

Quando os linfócitos T CD8<sup>+</sup> saem dos OLS as células efectoras activadas continuam a expressar o receptor de membrana CD25 e o marcador CD69 (representantes da activação celular), no entanto dá-se a perda da expressão da proteína de adesão CD62L (subpopulações com fenótipos CD62L<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> e CD62L<sup>-</sup>CD69<sup>+</sup>).

Os nossos resultados demonstraram que as células T CD8<sup>+</sup> efectoras activadas estão aumentadas significativamente no SP dos doentes de AR comparando com indivíduos sãos, e as suas frequências são maiores no LS desses doentes comparativamente ao SP dos mesmos. Tal como para as subpopulações de células T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, verificámos uma redução destas nos indivíduos com doença activa, que pode ser consequência de num estado avançado da doença as células activadas efectoras poderem sofrer de fenómenos de retroalimentação negativa por mecanismos dependentes de IL-10 e TGF- $\beta$  os quais podem interferir com a acção desta população e levar ao desenvolvimento da patologia. Podemos afirmar, que a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> efectoras activadas têm um papel determinante na artrite e é um importante indicador tanto do estado da doença como um marcador indicador do local de inflamação.

c. Subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> de memória

O fenómeno de existência de memória é uma característica do SI directamente relacionado com a RIA.

As células de memória (T<sub>M</sub>) têm importância fundamental num segundo encontro com o antígeno específico, pois entram numa divisão clonal rápida e passam a desempenhar funções efectoras (citotoxicidade). Diversos autores levantaram a hipótese de que as células T CD8<sup>+</sup> efectoras desenvolvem-se primeiro em T<sub>ME</sub> e só depois se diferenciam em T<sub>MC</sub>. Visto que as células T<sub>MC</sub> têm um maior potencial proliferativo do que as T<sub>ME</sub> (os linfócitos T<sub>ME</sub> realizam uma protecção com base na libertação imediata de citocinas após apresentação do antígeno), dão origem a uma população maior de efectoras secundárias, levando vários autores a considerarem que esta subpopulação oferece uma protecção imunitária superior, relativamente às T<sub>ME</sub> (Wherry *et al.* 2003; Northrop *et al.* 2004).

Os nossos resultados demonstram que a frequência de ambas as subpopulações  $T_{ME}$  ( $CD8^+CD27^+CD62L^-$ ) e  $T_{MC}$  ( $CD8^+CD27^+CD62L^+$ ) no SP não apresentam diferenças significativas entre os doentes de AR e os indivíduos sãos. Tal como outros autores referiram nos seus estudos, ao contrário das células T *naive*, as células efectoras e de memória têm uma maior tendência para se dirigirem para os tecidos periféricos (nomeadamente locais de inflamação) no caso da  $T_{ME}$  e, por outro lado, para os OLS quando falamos das células  $T_{MC}$ . No entanto, como no geral estudámos um grupo de doentes com AR estabelecida há mais de um ano, sugerimos que a existência de uma maior frequência do fenótipo  $T_{MC}$  no SP dos doentes de AR comparativamente aos controlos e relativamente às  $T_{ME}$  nesses grupos, se deva ao fenómeno já descrito. Ou seja, há uma evolução relativamente aos marcadores de superfície de memória expressos ao longo da evolução da doença, diminuindo a frequência das  $T_{ME}$  e aumentando as  $T_{MC}$  nos doentes de AR. Tal como outros resultados que obtivemos sugerem, a subpopulação  $T_{MC}$  tem um maior papel de protecção nesta doença, daí a ser mantido um maior número de células com esse fenótipo em circulação, pois tratando-se de uma doença crónica são consecutivamente expostas a estímulos secundários para dar origem a novas células efectoras para o combate da inflamação.

Quando olhamos para os resultados obtidos para a comparação das subpopulações de memória entre diferentes actividades da doença, vemos mais uma vez que os indivíduos com doença em remissão (doentes que evidenciaram níveis baixos dos factores utilizados para medir o grau de gravidade da doença devido a estarem no início da doença e outros por estarem a passar por uma fase de recaída da mesma) apresentaram significativamente maiores frequências de células T  $CD8^+$  com fenótipo  $CD27^+CD62L^-$ . Por outro lado, os indivíduos com doença activa manifestaram frequências significativamente maiores de células de memória central, possivelmente devido à evolução da doença e à existência de uma tendência das células  $T_{MC}$  se diferenciarem em  $T_{ME}$  quando repetidamente estimuladas (Wherry *et al.* 2003).

Verificámos nos nossos resultados que a subpopulação de células T  $CD8^+$  de memória efectora está significativamente enriquecida no LS dos doentes de AR. Atribuímos esta evidência ao facto dessa subpopulação após o reconhecimento do antigénio libertarem citocinas efectoras para eliminação imediata das células alvo. Com isto demonstramos que na AR esta subpopulação tem uma importância na manutenção da memória das células secretoras de citocinas que actuam principalmente como

mediadores da resposta citotóxica, assim como estas são as principais mediadoras da inflamação. Também as células  $T_{MC}$  têm maior frequência no LS comparativamente com o SP dos doentes de AR, mas sem significância. Contudo justifica-se estes resultados com o facto de o LS ser o principal alvo de inflamação no doentes de AR e, visto ser uma patologia crónica, existe a necessidade de manter um número maior de células  $T_{MC}$  para que quando surja um novo estímulo estejam prontas a proliferar e a adquirir funções efectoras de citotoxicidade nesse local.

Vários autores caracterizam os linfócitos T  $CD8^+$  de memória pela expressão de vários marcadores de superfície que individualmente ou em conjunto explicam o seu papel no SI, como já vimos anteriormente (Panayi *et al.* 1992; Roth 1994; Sallusto *et al.* 1999).

Tal como a frequência das células  $T_{MC}$  é maior no SP de doentes de AR, as células T  $CD8^+CD45R0^+$ , ou seja, as células T  $CD8^+$  de memória encontram-se significativamente aumentadas nesses doentes relativamente aos indivíduos saudáveis. Estes resultados levam a supor que uma maior percentagem das células T  $CD8^+$  de memória na AR seja do tipo  $T_{MC}$ , subpopulação também presente em maior frequência no grupo de doentes comparativamente às células  $T_{ME}$ , o que vem mais uma vez ao encontro do que foi dito quanto à importância desse subgrupo nestes doentes.

Relativamente ao interesse desta subpopulação de memória em indivíduos com diferente actividade de AR, pensamos que o facto de grande parte dos indivíduos do grupo  $AR_{Remissão}$  poder estar a desenvolver uma nova fase aguda da doença, faz com que surja um aumento do número de células de memória, que se deslocarão preferencialmente ou para os locais de inflamação ou para os OLS para exercerem os seus papeis quando estimuladas.

Os nossos resultados demonstraram também que existe maior frequência de células T  $CD8^+CD45R0^+$  no LS ( $p>0,05$ ), ao contrário do SP dos doentes de AR. No entanto, propomos que no LS há uma acumulação dessa subpopulação celular, porque sendo a AR uma doença crónica, existem períodos de recaída e exacerbação da doença provavelmente devido à presença de um número maior de células nesse local com capacidade de quando estimuladas começarem a proliferar e a libertar citocinas de imediato para o controlo da reacção inflamatória.

Com o objectivo de estabelecer uma imunidade protectora contra várias doenças como a Varíola, a Raiva e a Difteria, varias linhas de estudo direccionaram-se para a compreensão dos mecanismos de acção das vacinas. Desta forma, existe um certo optimismo quanto aos resultados obtidos quando é suscitada a formação de células T CD8<sup>+</sup> de memória através de vacinação, o que poderá ser a chave para a indução de uma imunidade protectora contra eventos patógenos que causam infecções crónicas nos seres humanos, como a AR (Masopust *et al.* 2007).

d. Receptores de Homing

A memória imunológica é composta por subconjuntos distintos de células T que expressam respectivamente diversos marcadores de superfície. Com base em trabalhos de vários autores e nas propriedades que os marcadores de superfície conferem às células que os expressam caracterizámos duas subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> de memória a partir da expressão ou não do receptor de *homing* CCR7.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> com fenótipo CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>, visto que perderam o receptor de *homing* para os OLS, tendem a sair destes órgãos e a dirigir-se para os tecidos periféricos tal como o fígado, pulmão assim como os locais de inflamação, sendo dotados de várias funções efectoras (T<sub>ME</sub>); por outro lado as células com o fenótipo CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> fazem parte de um conjunto de células com função de *homing* para a zona das células T dos nódulos linfáticos periféricos sem funções inflamatórias e citotóxicas (T<sub>MC</sub>) (Sallusto *et al.* 1999; Sun *et al.* 2003; Wherry *et al.* 2003; Klebanoff *et al.* 2006).

Os nossos resultados demonstram que a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> de memória central que expressa CCR7<sup>+</sup> está presente significativamente em maiores níveis no SP de doentes de AR comparativamente ao SP de indivíduos saudáveis. Estas evidências vêm ao encontro dos resultados obtidos para a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> que expressa o fenótipo CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>, ou seja, para além de não haver diferenças significativas entre o grupo de doentes de AR e o grupo controlo, nitidamente vemos que há maiores frequências dessa subpopulação no SP dos doentes. Esta população desempenha um papel fundamental na manutenção das células de

memória e na expansão clonal quando estimuladas após segundo contacto com as APCs, o que lhes dá uma importância significativa na cronicidade desta doença.

No nosso estudo, vimos que a subpopulação de células com fenótipo  $CD27^+CD62L^-CCR7^-$  para além de apresentar maiores frequências no SP de doentes de AR do que em indivíduos sãos, não existem diferenças significativas. Desta forma podemos dizer que nesta patologia existe uma actuação mais relevante das células de memória que expressam na sua superfície  $CD27^+CD62L^+CCR7^+$  ou seja, a subpopulação de células  $T_{MC}$ , devido ao facto do grupo de doentes estar diagnosticado com a doença há um período superior de um ano. Sugerimos que pelo menos neste grupo de doentes caracterizados, existe uma frequência elevada de células  $T_M$  a serem encaminhadas para os OLS. O facto dos linfócitos  $T_{MC}$  apresentarem essas diferenças significativas deve-se também ao facto desses terem a capacidade de se auto-renovar ao longo do tempo, contrastando com os linfócitos  $T_{ME}$ .

Embora não se tenham obtido diferenças significativas para a subpopulação de células  $T CD8^+$  que expressa o fenótipo  $CD27^+CD62L^-CCR7^-$  no SP de doentes com diferente actividade da patologia, verificámos que em indivíduos com doença activa está a haver um encaminhamento das células para os tecidos periféricos de forma mais acentuada, nomeadamente para o local de inflamação. Isto porque os nossos resultados mostram que existe uma maior frequência dessa subpopulação de células  $T_{ME}$  no SP dos indivíduos com doenças activa comparativamente aos controlos e aos com doença em remissão. Pensamos por isso que os AR Remissão estarão a passar por uma fase de maturação das células as quais perdem a expressão dos marcadores de superfície  $CD62L$  e  $CCR7$  para passarem a ter fenótipo de células  $T_{ME}$ , para que quando estimuladas actuem prontamente através da libertação de citocinas.

No que diz respeito às células  $T CD8^+$  que expressam o fenótipo  $CD27^+CD62L^+CCR7^+$  pensamos que o facto de os nossos resultados mostrarem que existem maiores frequências dessa subpopulação de células  $T_{MC}$  no SP dos doentes comparativamente ao LS (diferenças não significativas) deve-se ao receptor de *homing*  $CCR7$  encaminhar esses linfócitos que o expressam para os OLS, e daí haver uma menor frequência dessas células no LS dos doentes. No entanto, o facto de se terem encontrado frequências intermédias de células  $T_{MC}$  a expressarem  $CCR7$  no LS é um fenómeno esperado visto que, tal como outros autores já referiram, a zona sinovial

contem folículos linfóides ectopicos e expressam as quimiocinas CCL19 e CCL21 que atraem células *naïve* e T<sub>MC</sub> localmente produzidas (Schroder *et al.* 1996; Wagner *et al.* 1998; Campbell *et al.* 2001; Takemura *et al.* 2001).

Tal como esperávamos, obtivemos maiores frequências da subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> de memória efectora CCR7<sup>-</sup> no LS dos doentes de AR em relação ao SP dos mesmos (*p-value*>0,05), pois tal como já foi referido estas células são encaminhadas para tecidos periféricos, sobretudo locais de inflamação (alvo principal das citocinas pró e anti-inflamatórias).

A presença de CXCR4 e do seu ligante (Factor 1 Derivado do Estroma – SDF-1/CXCL12) está directamente correlacionada com a neovascularização na AR, fenómeno esse que estará a decorrer intensamente nas articulações inflamadas dos indivíduos com doença activa (Szekanecz *et al.* 2003; Rudolph *et al.* 2005).

Na análise comparativa das frequências das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> que estão a expressar CXCR4 no SP de doentes de AR, verificámos que no SP destes indivíduos há maior expressão, porém não significativa, dessas células comparativamente a indivíduos sãos. O facto de não haver diferenças significativas entre os grupos em estudo poderá ser devido às células T CD8<sup>+</sup> que expressam CXCR4 estarem a ser recrutadas para o LS dos doentes com AR pela acção quimiotáctica feita pelo seu ligante, logo, a frequência dessa subpopulação no SP dos mesmos não se espera ser muito elevada (tal como foi confirmado quando comparadas as frequências desta população entre SP e LS de doentes). Ao contrário do que vimos em humanos, foi observado por outros autores em modelos de AR em ratinhos K/BxN que estes apresentam um decréscimo na frequência de células T CD8<sup>+</sup> que expressam CXCR4 no SP, comparativamente aos ratos saudáveis (Raposo *et al.* 2010).

Com base nesses resultados já discutidos, podemos justificar que o aumento significativo da frequência de células T CD8<sup>+</sup> efectoras activadas que têm fenótipo CXCR4<sup>+</sup> no SP dos doentes com baixa actividade de AR se deve aos mesmos fenómenos que estão a causar regulação negativa das outras subpopulações nos indivíduos com doença activa. Ou seja, num estado avançado da doença as células T CD8<sup>+</sup> efectoras poderão sofrer uma redução do seu número por acção de mecanismos anti-inflamatórios (IL-10 e TGF-β), limitados durante a fase de remissão da patologia.

Neste trabalho apurámos que as subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> que expressam o fenótipo CXCR4<sup>+</sup> e CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CXCR4<sup>+</sup> estão muito enriquecidas no LS dos doentes de AR comparativamente ao SP dos mesmos (p< 0,05). Desta forma podemos afirmar que a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> efectoras que expressa o receptor de *homing* CXCR4 está a ser direccionada em grande número para o foco de inflamatório para se ligar à quimiocina SDF-1/CXCL12, ligante desse receptor.

Um estudo em indivíduos com artrite evidenciou que o LS e a membrana sinovial apresentavam níveis altos de células T a expressarem o receptor CXCR4, e por outro lado baixos níveis desse receptor no SP (Buckley *et al.* 2000). Também em ratinhos K/BxN artríticos foi observado que apresentavam maiores frequências de células T com fenótipo CD8<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup> nos tecidos articulares quando comparados com o SP dos mesmos (Raposo *et al.* 2010).

Os nossos resultados em complemento com o que já foi descrito sugerem que a retenção de células T CD8<sup>+</sup> mediada pela expressão de CXCR4 contribui directamente para a sua acumulação nos compartimentos sinoviais, portanto as células T CD8<sup>+</sup> infiltradas no compartimento sinovial são enriquecidas na expressão desse receptor comparativamente às células T CD8<sup>+</sup> do SP de indivíduos com AR. Este facto concorda com a elevada eficiência e potência quimioatraente que o SDF-1/CXCL12 exerce sobre as células T *naïve* e de memória.

e. Expressão intracelular de citocinas pelas células T CD8<sup>+</sup>.

As citocinas que foram seleccionadas para este estudo estão directamente correlacionadas com a RII (especialmente na resposta da fase aguda e inflamação local) e a RIA (resposta celular). Algumas destas citocinas desempenham funções efectoras e outras imunoreguladoras, que quando alvo de desregulação, dão origem ao aparecimento de doenças autoimunes como a AR.

Alegamos que através da expressão diferencial destas citocinas, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> podem ter um papel na manifestação da patologia, tendo um impacto determinante sobre os fenómenos típicos da RII (IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e também sobre os fenómenos da resposta celular (IL-10, IL-17, GZMB e PRF1).

Quanto às diferenças entre o grupo de doentes e os controlos são, obtivemos diferenças significativas para as células T CD8<sup>+</sup> que expressam GZMB, IFN- $\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , as quais estavam maioritariamente presentes no SP de doentes de AR comparativamente aos controlos. Para o estudo comparativo da libertação de citocinas por linfócitos T CD8<sup>+</sup> em indivíduos com diferente actividade da doença, vimos que existe uma diminuição significativa da frequência da subpopulação T CD8<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> nos doentes com elevada actividade de AR. Verificámos que existem maiores níveis das citocinas GZMB, IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PRF1, IL-17 e IL-10 no LS de doentes de AR comparativamente ao SP dos mesmos, no entanto apenas se verificam diferenças significativas para as duas últimas.

Com base nos resultados obtidos e em literatura, a expressão de IL-10 por linfócitos T CD8<sup>+</sup> pelos doentes de AR é diminuída. No entanto os nossos resultados demonstraram haverem maiores níveis da mesma subpopulação no LS comparativamente com o SP dos doentes (embora as frequências sejam ambas baixas). Esta citocina anti-inflamatória é produzida por monócitos, células *Th2* e Tregs, no entanto pode também ser expressa por outras subpopulações de células T e algumas células B (O'Garra *et al.* 2004; Said *et al.* 2010). Desta forma, a libertação de IL-10 por parte da subpopulação de células T CD8<sup>+</sup>, tem um efeito imuno-supressor sobre as várias células imunológicas, função principal desta citocina, induzindo o bloqueio do principal factor de transcrição responsável pela resistência à apoptose (TNF) (Wang *et al.* 1995). A IL-10 tem um papel importante na inibição de libertação das proteínas TNF- $\alpha$  e IL-17, o que pode levar a que nos doentes de AR uma diminuição da expressão da IL-10 por células T CD8<sup>+</sup> implique uma exacerbação das citocinas por ela reguladas (Miossec 2004). Isso explica também o facto dos dados retratarem um ligeiro aumento da libertação de IL-10 pelas células T CD8<sup>+</sup> em indivíduos com doença activa ( $p > 0,05$ ), e conseqüentemente uma diminuição não acentuada dos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-17 nesse grupo de doentes. Estes resultados demonstram que será fundamental continuar este ensaio de forma a colectar um maior número de SP e LS de doentes de AR de forma a permitir vermos e afirmarmos se essas diferenças se podem tornar cruciais para o desenvolvimento desta patologia, levando à destruição de cartilagem e devido a uma exacerbação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no LS, e dessa forma dar a devida importância ao TNF e IL-17 libertados por subpopulações de CTLs na aplicação de terapêuticas dirigidas a essas células.

Observando os resultados obtidos relativamente aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> que secretam IL-17, encontramos frequências similares no SP de doentes e controlos saudáveis, facto explicado por esta citocina ser principalmente produzida por células *Th17* (Korn *et al.* 2009). Contudo, a IL-17 pode também ser produzida por células T CD8<sup>+</sup> através de um mecanismo desencadeado pela IL-23, tal como já foi visto no processo inflamatório pulmonar por bactérias *Gram* negativas, o que nos leva a sugerir na que AR se desenvolva um mecanismo similar, no qual as células T CD8<sup>+</sup> dos locais de inflamação sejam estimuladas a produzir maiores níveis desta citocina (Happel *et al.* 2003). Esta hipótese é sustentada, quando verificámos que existe um aumento significativo da frequência de células T CD8<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup> no LS comparativamente ao SP desses doentes. Este aumento poderá conduzir ao estímulo ou à inibição da produção e libertação de factores imunológicos por várias células (Fossiez *et al.* 1996).

Desta forma complementamos com os nossos resultados os trabalhos já feitos que constataram que esta citocina está presente em elevados níveis no tecido sinovial de doentes de AR, contribuindo para a degradação das articulações, ao demonstrarmos pela primeira vez que as células T CD8<sup>+</sup> contribuem fortemente para a sua secreção nesse local, suportando a utilização desta citocina como um alvo terapêutica na AR (Kotake *et al.* 1999; Cai *et al.* 2001).

O facto de termos verificado uma baixa produção de PRF1 pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos doentes de AR, nomeadamente nos indivíduos AR<sub>Activa</sub> assim como no local de inflamação (LS), está de acordo com o que é referido na literatura quanto à função dessa enzima em infecções bacterianas, crónicas ou virais (Trapani *et al.* 2002). Ou seja, a PRF1 tem um papel intrínseco na regulação da expansão e também da contracção da população de células T CD8<sup>+</sup> depois da infecção, evidência que apoia a existência de um mecanismo dependente dessa citocina para regular o grau de expansão clonal das CTLs em patologias como a AR. De modo coerente com a importância da PRF1 na homeostase das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> activadas, os nossos resultados sugerem que a diminuição da frequência das CTLs que libertam PRF1 estará directamente implicada no aumento das células T CD8<sup>+</sup> activadas e consequentemente na forte degradação das articulações e mantimento da inflamação.

Análises *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o TNF- $\alpha$  desenvolve um papel central na regulação de outras citocinas, quimiocinas e factores de crescimento (IL-6, IL-8, MCP-1, MMP1, MMP3, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) interferindo significativamente no seu potencial patológico (Brennan *et al.* 1989; Fong *et al.* 1989; Feldmann *et al.* 2001).

Algumas dessas moléculas têm as mesmas propriedades, sendo que o fenómeno de redundância de citocinas é verificado em várias patologias e é essencial que se consiga compreender como de se regulam de forma a auxiliar na síntese de alvos terapêuticos (Feldmann *et al.* 2001).

Para os resultados obtidos das frequências de células T CD8<sup>+</sup> que sintetizam TNF- $\alpha$  e para as que sintetizam IL-6 obtivemos significativamente maior presença no SP dos doentes de AR comparativamente ao SP dos controlos saudáveis. Ainda nos doentes vemos que estão presentes maiores frequências dessas subpopulações no LS dos doentes comparativamente ao SP dos mesmos, no entanto sem que esse aumento atinja significância estatística.

Este fenómeno está directamente de acordo com o que é referido na literatura relativamente à acção do TNF- $\alpha$  sobre a resposta de outras citocinas, sendo o TNF- $\alpha$  o principal gatilho para o alarme inflamatório. Num ensaio descrito na literatura, verificaram que quando a libertação de TNF- $\alpha$  numa fase de stress celular é diminuída, conseqüentemente a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-1e a IL-6 é igualmente reduzida (Fong *et al.* 1989). Este mecanismo poderá ser uma explicação para o que verificámos para os indivíduos com diferentes actividades da doença, pois o aumento significativo da libertação de TNF- $\alpha$  pelas células T CD8<sup>+</sup> nos doentes AR Remissão esteve associado a um declínio da síntese de IL-6.

O TNF- $\alpha$  libertado pelas células T CD8<sup>+</sup> é alvo de grande atenção porque tem uma importante acção de regulação positiva sobre as funções do SI, mas por outro lado quando essas células estão sob uma prolongada exposição ao TNF- $\alpha$ , este adquire um comportamento imuno-supressor. Sugerimos que na AR estejam a ocorrer mecanismos de regulação positiva e negativa de TNF- $\alpha$  ao longo da evolução desta doença crónica, levando a ciclos de remissão e actividade.

O IFN- $\gamma$  aumenta a eficácia dos mecanismos de apresentação dos antígenos virais, portanto as APCs devido à acção dessa citocina induz o aumento da expressão de genes correspondentes ao MHC I e MHC II que ganham a capacidade de expor mais antígenos à superfície. Desta forma dá-se a melhoria na apresentação do antígeno às células T. Isto demonstra portanto a sua importância na regulação simultânea da RII e da RIA (Billiau 1996).

Os nossos resultados indicam que existem maiores frequências de células T CD8<sup>+</sup> a libertar IFN- $\gamma$  no SP dos doentes de AR comparativamente aos controlos sãos. Estas evidências surgem provavelmente porque o IFN- $\gamma$  libertado por estes linfócitos T CD8<sup>+</sup> não está a exercer um papel directamente como agente anti-viral neste caso, mas sim como um modulador do crescimento das células T CD8 assim como na diferenciação funcional e na transdução de sinais intracelulares diferentes dos observados com células alvo de diferentes origens, mecanismo já descrito para as células T na literatura (Landolfo *et al.* 1988; Zhang *et al.* 2010).

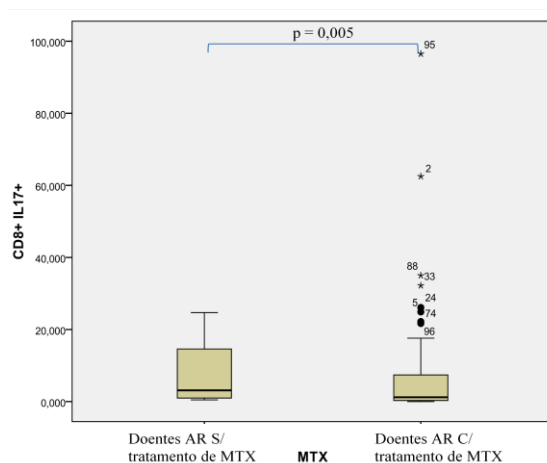
O papel desta citocina na AR já foi demonstrado em modelos de AR induzida em ratinhos, comprovando que essa proteína pode desempenhar efeitos em direcções contrárias nesta patologia, pois actua sobre diferentes vias (administração sistémica e local de IFN- $\gamma$  nesses modelos de AR resulta em diferentes comportamentos) (Mauritz *et al.* 1988; Williams *et al.* 1993; Boissier *et al.* 1995). Também em humanos já foi demonstrada a presença e importância do IFN- $\gamma$  no tecido sinovial afectado com AR (Hopkins *et al.* 1988).

Visto que encontramos uma elevada presença de células T CD8<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> activadas no LS dos doentes de AR, sugerimos que esse aumento comparativamente ao SP se deva à maior produção de IFN- $\gamma$  por essas células nesse local (embora sem diferenças significativas). Isto porque, tal como refere Siegel, o IFN- $\gamma$  intervêm no aumento da activação celular dos CTLs humanos, e foi no LS que observamos a maior presença de células activadas também (Siegel 1988). Os nossos resultados em conjunto com dados da literatura leva-nos a concluir que o IFN- $\gamma$  libertado pelas células T CD8<sup>+</sup> desempenha um papel no aumento do desencadeamento de processos inflamatórios nas articulações dos doentes de AR (promovendo o aumento dessa população) e por outro lado impulsiona um aumento do *homing* e presença das CTLs nesses doentes. Do ponto de vista clínico e terapêutico, já falados também na literatura, seria importante

encaminhar as células T CD8<sup>+</sup> que sintetizam IFN- $\gamma$ , e a própria citocina, para um potencial uso eficaz no tratamento da AR, pois o facto de as células activadas não terem capacidade de produzir IFN- $\gamma$  suficiente para a manutenção homeostática das células imunes articulares, pode ser prejudicial para a actuação das mesmas (Obert *et al.* 1985; Cannon *et al.* 1989).

### 3.1.5 Caracterização fenotípica de subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em SP- Estudo comparativo entre dois grupos de doentes de AR sem e com a terapêutica de MTX

Os doentes estudados, foram divididos em dois grupos consoante a terapêutica que estavam a seguir. Desta forma foram estudadas as subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> entre o grupo de doentes AR<sub>S/MTX</sub> e AR<sub>C/MTX</sub> (ANEXO I). Analisadas essas populações igualmente por CF e comparadas estatisticamente, verificámos que existem diferenças significativas para: a subpopulação de células T<sub>MC</sub> (CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) com *p-value*=0,023 sendo que aos doentes AR<sub>C/MTX</sub> têm uma maior frequência dessa subpopulação; a subpopulação T<sub>ME</sub> (CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) com *p-value*=0,004 em que observámos que os doentes AR<sub>S/MTX</sub> têm um aumento muito significativo no seu SP; para as frequências de expressão da citocina intracelular IL-17 com *p-value*=0,05, com um aumento dessas no SP dos doentes AR<sub>S/MTX</sub> (Figura 9).



**Figura 9. Comparação da subpopulação de CTLs em SP entre doentes de AR sem tratamento com MTX e doentes de AR que são tratados com MTX.** Podemos ver no *Boxplot* que a mediana determinada estatisticamente para as frequências de expressão da citocina intracelular IL-17 de doentes AR<sub>S/MTX</sub> é superior (2,6 (0,6 – 18,1)) relativamente à mediana para os níveis dessa população em doentes AR<sub>C/MTX</sub> (1,2 (0,3 – 7,5)).

O MTX, medicamento de primeira linha no tratamento da AR, já demonstrou auxiliar na melhoria de sintomas a nível da sensibilidade e inchaço das articulações envolvidas na inflamação crónica, exibindo uma maior eficácia e melhor tolerabilidade que a maioria dos outros DMARDs (Salliot *et al.* 2009; Visser *et al.* 2009).

Como já referimos anteriormente o grupo de doentes de artrite apresenta no seu SP maiores frequências de células T CD8<sup>+</sup> com fenótipos CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>.

Visto que a subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória central está aumentada nos indivíduos com AR, nomeadamente nos grupos AR<sub>Activa</sub> e AR<sub>C/MTX</sub>, sugerimos mais uma vez que esta subpopulação tem uma importância relevante na mediação da protecção no processo inflamatório. Isto porque esses linfócitos se encontram à disposição para um novo estímulo nos OLS, sem exercerem funções inflamatórias e citotóxicas que por vezes causam um aumento da gravidade da patologia, e quando estimulados dão origem a novas CTLs efectoras. Ou seja, o MTX quando actua sobre as subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> provavelmente auxilia no combate contra a migração de células para o local de inflamação de forma a reduzir os danos causados pelas células CTLs e pelas citocinas por elas libertadas,

Esta observação é sustentada pelos resultados obtidos para a subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> efectoras com fenótipo CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>, que se encontra aumentada nos doentes AR<sub>S/MTX</sub>, ou seja, neste grupo de doentes os linfócitos T<sub>ME</sub> continuam a ser maioritariamente encaminhados para o local de inflamação (esta população está em maiores frequências no LS de doentes de AR comparativamente ao SP dos mesmos). Pensamos que isto poderá acontecer devido a na ausência de MTX as células T<sub>ME</sub> se dirigirem para os locais de inflamação para manterem esse processo depois de serem novamente estimuladas (passando de imediato à libertação de citocinas), alimentando o mecanismo de cronicidade desta patologia.

Quando analisadas as frequências da subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> no SP de doentes de AR verificámos como já foi dito que não havia diferenças significativas entre doentes e controlos. Os nossos resultados demonstraram contudo, que as subpopulações de CTLs que libertam IL-17 são alvo de acção da terapia com MTX. Isto porque os doentes AR<sub>C/MTX</sub> apresentam uma diminuição significativa na frequência dessa subpopulação no SP. Estes dados estão em concordância com o que já

foi visto por Li *et al*, que depois de pré-cultivar o SP de doentes de AR na presença de MTX e estimular a produção de IL-17 com mAb para CD3 e CD28, obtiveram, em vez de um aumento, uma diminuição dos níveis proteicos e de mRNA de IL-17 nessa cultura (Li *et al*. 2011).

Estes fenómenos indicam que a presença de células T CD8<sup>+</sup> que libertam esta citocina pró-inflamatória pode ser significativamente diminuída pelo tratamento com MTX e desta forma leva-nos a sugerir que a diminuição dos níveis poderá ser um dos mecanismos de acção desse DMARD na AR.

### 3.1.6 Correlação dos níveis de citocinas intracelulares expressas pelas células T CD8<sup>+</sup> no SP e correlações dos níveis das mesmas citocinas no LS de doentes de AR

Entre as várias citocinas envolvidas na inflamação e destruição articular na patologia da AR, sabemos existir uma correlação entre elas de forma a induzirem ou inibirem a produção umas das outras pelas células que as libertam.

Verificou-se que no SP existe uma correlação moderada entre as subpopulações que expressam IL-6 e TNF- $\alpha$  ( $r=0,610$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ) e também uma correlação semelhante entre as subpopulações que expressam IL-6 e IL-17 ( $r=0,472$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ).

Da correlação dos níveis de citocinas expressas por células T CD8<sup>+</sup> no LS de doentes de AR evidenciamos que existe uma forte correlação significativa entre as subpopulações que expressam PRF1 e IL-6 ( $\rho=0,886$ ,  $p\text{-value}=0,019$ ) e as subpopulações que expressam TNF- $\alpha$  e IL-6 ( $\rho=0,773$ ,  $p\text{-value}=0,005$ ). Verificámos também que existe uma correlação, embora sem significância estatística mas com coeficiente de correlação a apontar para uma correlação forte entre as subpopulações que expressam GZMB e PRF1 ( $\rho=0,771$ ,  $p\text{-value}=0,072$ ).

Quando analisadas as frequências da subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> que liberta IL-6 no SP verificámos que essa era significativamente maior nos doentes de AR, e que no LS desses indivíduos havia um aumento da presença dessas células, embora de forma não significativa. Ao fazermos as análise de forma a correlacionarmos

as frequências das várias citocinas libertadas pelas subpopulações de CTLs tanto no SP como no LS verificámos que a IL-6 está correlacionada com outras citocinas tal como já foi referido.

Por um lado os níveis de TNF- $\alpha$  na membrana sinovial de doentes de AR parece estar correlacionada com a inflamação e a erosão óssea em geral (Husby *et al.* 1988; Neidel *et al.* 1995). Por outro lado existem várias evidências que a citocina pró-inflamatória IL-6 está directamente correlacionada com a actividade da AR, pois estimula a secreção de Ig por plasmócitos, activa e promove a proliferação de linfócitos T, induz o aumento do número de neutrófilos, plaquetas e da presença de proteínas da fase aguda como a PCR, fibrinogénio, haptoglobina e a amilóide A sérica, regula a proliferação e diferenciação de osteoclastos e está envolvida na reabsorção óssea (Matsuno *et al.* 1998). Segundo os nossos resultados e de acordo com a literatura, a libertação destas duas citocinas pelas CTLs está directamente relacionada com o facto de actuarem de forma sinérgica e em alguns processos de forma sobreposta, mesmo que esses efeitos tenham origem em mecanismos diferentes (Shalaby *et al.* 1989; Matsuno *et al.* 2002). Desta forma apontamos as subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> que secretam TNF- $\alpha$  e as que secretam IL-6 como um alvo terapêutico, pois o controle da produção das citocinas discutidas levará à melhoria dos sintomas inflamatórios assim como auxiliaria na redução da destruição óssea.

Embora não tenhamos encontrado uma numerosa literatura a cerca da produção de IL-17 por células T e a produção dessa citocina por células T CD8<sup>+</sup> seja restrita, encontramos estudos que sugerem que a limitada produção de IL-17 por essas células induz ou contribui para o processo inflamatório, fenómeno já descrito também para a IL-6 libertada pelas mesmas (Fossiez *et al.* 1996).

O facto destas duas citocinas apresentarem uma correlação moderada no SP dos doentes de AR está relacionada com o facto de a IL-17 exercer uma estimulação sobre as células do estroma, incluindo sobre os sinoviócitos derivados da patologia de AR, induzindo o aumento da produção de IL-6 e IL-8 (Fossiez *et al.* 1996; Miossec 2007).

Quanto à correlação forte que obtivemos entre a IL-6 e a PRF1 no LS de doentes de AR, sugerimos que apesar de não termos encontrado referências na literatura quanto à produção dessas proteínas estar interligada, não implica que funcionalmente, isto é, a presença de uma proteína não influencie a acção da outra. Aliás, sendo ambas partes

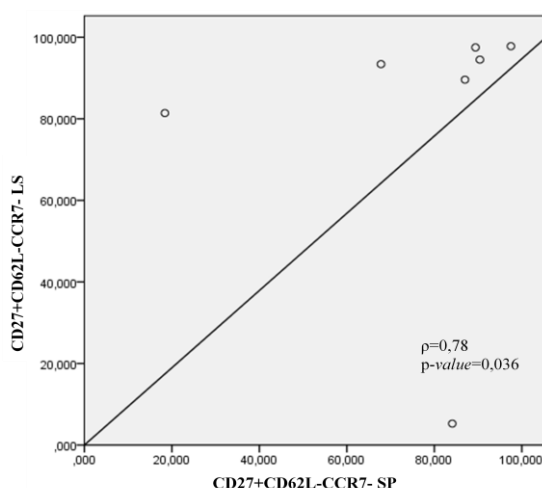
importantes no processo inflamatório, em que a IL-6 está directamente relacionada com a inflamação, atraindo várias células do SI nomeadamente os linfócitos B, e a PRF1 está implicada no processo de eliminação de células que apresentam os auto-antigénios sobre a membrana, como é o caso das células da cartilagem, do osso e dos tendões quando afectados por AR, é esperado que estejam correlacionados de forma que o aumento de uma implique o aumento de outra, embora por diferentes motivos.

Estes resultados demonstram que vários elementos que participam na inflamação crónica estão presentes no LS, local principal onde ocorre fenómenos de inflamação dos doentes de AR, levando à destruição das articulações e à cronicidade desta patologia.

### 3.1.7 Correlação das várias populações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em estudo, entre SP e LS de doentes de AR

As células T CD8<sup>+</sup> de memória efectora (CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) são, como já discutido, células com importância no desenvolvimento da citotoxicidade a nível do LS de articulações inflamadas nos doentes de AR e, por tanto, na degradação das mesmas.

No nosso trabalho verificámos que as frequências estimadas para as células T<sub>ME</sub> entre SP e LS dos doentes de AR estão fortemente correlacionados ( $\rho=0,78$   $p\text{-value}=0,036$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Correlação entre as frequências obtidas para a subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória efectora presentes no SP e LS de doentes de AR. Tal como podemos ver no gráfico, cada ponto representa cada um dos doentes com AR em estudo. Podemos ver que existe um enriquecimento desta subpopulação em ambas as amostras biológicas dos doentes, embora no LS esteja especialmente aumentada.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> de memória efectora acumulam-se nos tecidos inflamados, onde ficam após a resolução da inflamação (como reserva de células efectoras), e também nos OLS, esperando novos estímulos por liberação de quimiocinas e interações com APCs (Weninger *et al.* 2001; Guarda *et al.* 2007). Esta situação encontra-se maximizada em doenças autoimunes como a AR, sendo esta caracterizada pela presença de auto-antígenos nos locais de inflamação como o LS.

Alegamos por tanto, que a forte correlação encontrada entre SP e LS para estas células seja devida a uma mobilização maciça das mesmas a partir dos OLS, que através da circulação sanguínea periférica e à elevada neovascularização do sinóvio reumatóide, chegam ao LS. Este processo faz com que as frequências dessas células no LS e no SP sejam correlacionadas. No entanto, como já referido, encontrámos uma maior frequência desta subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no LS. Este resultado não é contrastante com a correlação encontrada, sendo os locais de inflamação sítios onde os linfócitos sofrem uma ulterior expansão.

A correlação das frequências das células T<sub>ME</sub> entre SP e LS tem aspectos muito relevantes em termos clínicos e de diagnóstico. De facto estes nossos dados demonstram que os níveis de células T<sub>ME</sub> no SP são um importante factor de avaliação do estado de infiltração celular no LS (fenómeno característico da AR) e, por tanto, um factor prognóstico da doença. Esta é uma das evidências mais importantes deste estudo, pois o estudo desta subpopulação a partir do SP poderá dar-nos uma indicação muito aproximada do que estará a ocorrer a nível do LS das articulações inflamadas, confirmando ou não o diagnóstico de forma menos dolorosa, evitando recolha de LS dos doentes de AR.

### **3.2 Quantificação de citocinas e quimiocinas em soro de doentes de AR (com diferentes actividade da doença) e análise do efeito da terapêutica com MTX na sua expressão**

#### **3.2.1 Quantificação da concentração de citocinas no soro de doentes de AR e comparação com indivíduos controlo**

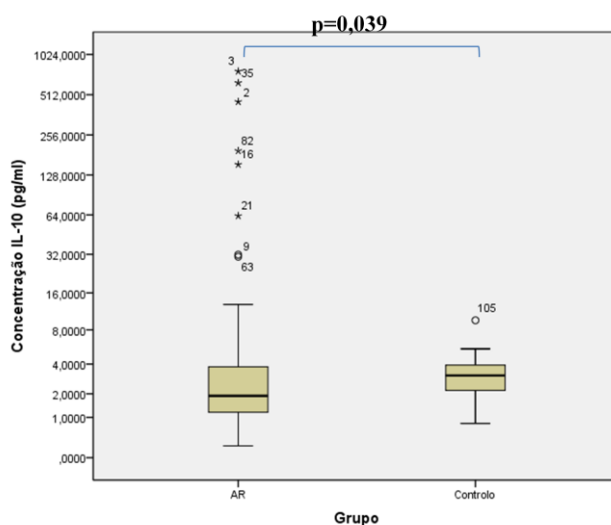
A partir da análise de quantificação de citocinas de doentes de AR verificou-se que relativamente às mesmas em indivíduos controlo, não existem diferenças

significativas para as concentrações das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Por outro lado, para a citocina IL-10 existem diferenças significativas relativamente a estas citocinas entre doentes de AR e os Controlos (Tabela 5).

**Tabela 5. Quantificação de citocinas Humanas no soro de doentes de AR e comparação com controlos saudáveis (Mediana (Q1-Q3))**

Citocinas (pg/ml)	AR (N= 82)	Controlo (N= 30)	p-value
IFN	5,2 (2,8 – 11,7)	7,6 (4,6 – 8,5)	NS
IL-6	0,4 (0,3 – 0,7)	0,5 (0,3 – 0,7)	NS
IL-10	1,9 (1,2 – 3,8)	3,1 (2,1 – 4,0)	0,039
IL-1 $\beta$	3,7 (1,6 – 7,3)	4,11 (2,5 – 5,7)	NS
TNF- $\alpha$	4,6 (2,4 – 10,0)	1,9 (1,0 – 2,8)	NS

No *BoxPlot* da Figura 11 apresentamos a distribuição da concentração sérica da citocina IL-10 em doentes e controlos, no qual podemos ver que alguns dos doentes de AR deram origem a observações anormais (*outliers*) para os valores desta citocina por se tratar de um grupo heterogéneo a nível da terapêutica seguida, do sexo, e da fase da doença em que se encontravam.



**Figura 11. Quantificação da concentração de IL-10 no soro de doentes de AR e comparação com indivíduos controlo.**

### 3.2.2 Quantificação da concentração de citocinas no soro de doentes de AR com diferente actividade da doença, e comparação entre ambos

Divididos os doentes de AR em dois grupos com base na actividade da doença – AR<sub>Remissão</sub> e AR<sub>Activa</sub>, procedeu-se à quantificação de citocinas no soro, e procedeu-se à

análise comparativa dos mesmos. Verificámos que à excepção da citocina IL-10 ( $p$ -value=0,052), não existem diferenças significativas entre os dois grupos para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Verificámos no entanto, que os títulos séricos das citocinas analisadas encontram-se em maiores concentrações nos indivíduos com doença activa (ANEXO II).

### 3.2.3 Quantificação da concentração de citocinas no soro de doentes de AR aos quais não foi administrado MTX e de doentes de AR que seguiram o tratamento com MTX, e comparação entre ambos

Após verificada qual a terapêutica seguida por cada doente, constituíram-se dois grupos formados por doentes AR<sub>S/MTX</sub> e AR<sub>C/MTX</sub>. Quantificadas e comparadas as concentrações das citocinas em estudo (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) apurámos que não existem diferenças significativas entre os dois grupos de doentes de AR.

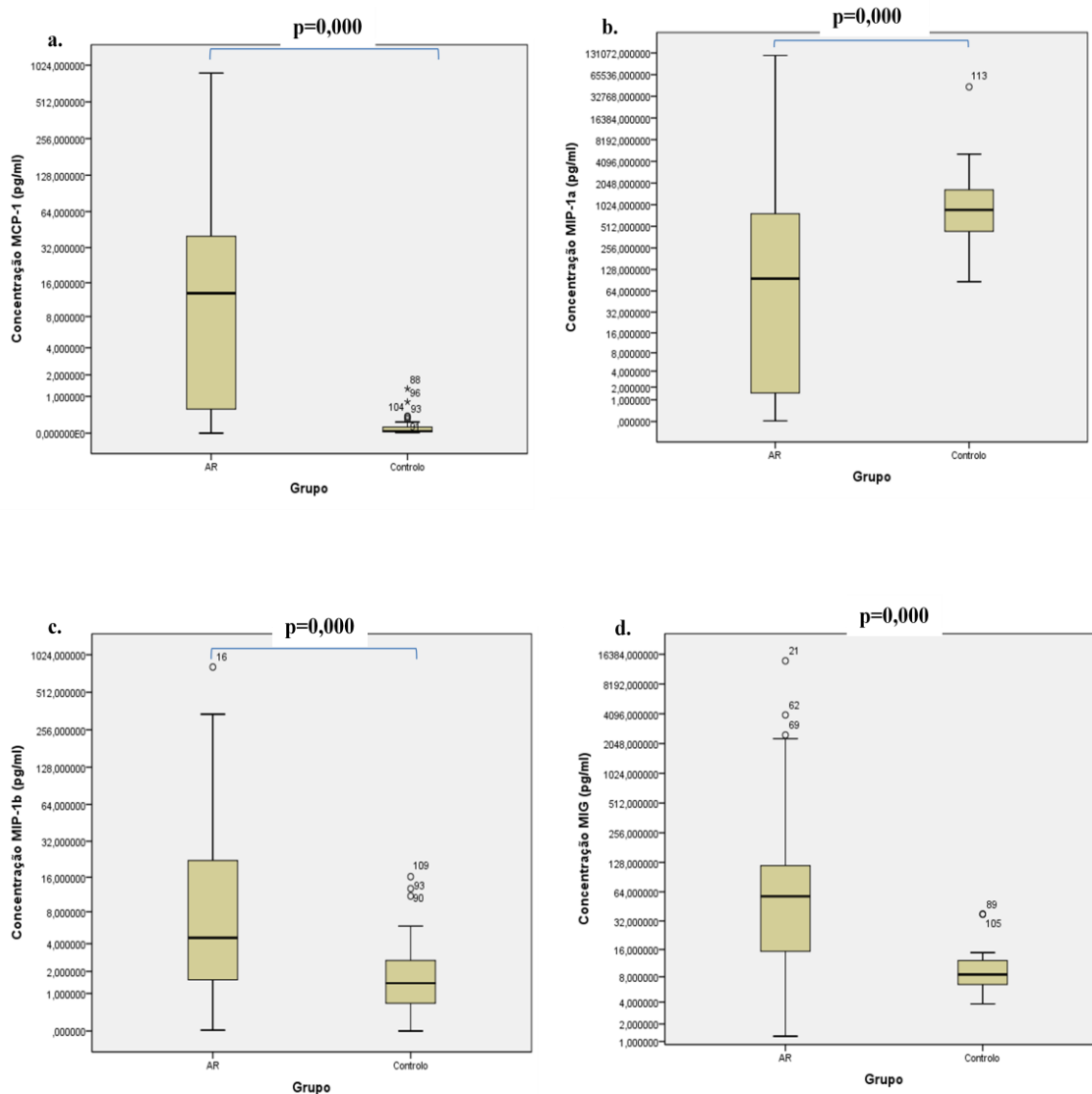
### 3.2.4 Quantificação da concentração de quimiocinas no soro de doentes de AR e comparação com indivíduos Controlo

Da quantificação de quimiocinas de doentes de AR e da sua comparação estatística com valores destas em indivíduos sãos, verificámos que a IL-8, MIP-1 $\beta$ , MIG, MCP-1, MIP-1 $\alpha$  e apresentam diferenças significativas entre os grupos analisados. Os resultados retratam também que existe maior concentração das quimiocinas MCP-1, MIB-1 $\beta$ , MIG e IL-8 no soro dos doentes de AR comparativamente aos controlos (Tabela 6).

**Tabela 6. Quantificação de quimiocinas Humanas no soro de doentes de AR e comparação com controlos saudáveis (Mediana (Q1-Q3))**

Citocinas (pg/ml)	AR (N= 82)	Controlo (N=30)	p-value
MCP-1	13,0 (0,5 – 42,2)	0,04 (0,02 – 0,13)	0,000
MIP-1 $\alpha$	95,1 (1,5 – 820,6)	866,6 (432,6 – 1674,9)	0,000
MIP-1 $\beta$	4,6 (1,5 – 23,5)	1,42 (0,6 – 2,7)	0,000
MIG	57,6 (14,8 – 122,7)	8,5 (6,5 – 12,2)	0,000
IL-8	236,4 (63,3 – 1994,0)	6,2 (3,9 – 17,5)	0,000

Tal como feito para as citocinas, fizemos os *Boxplots* respectivos às quimiocinas com as quais se obtiveram diferenças significativas entre os dois grupos em estudo (Figura 12).



**Figura 12. Quantificação da concentração de quimiocinas no soro de doentes de AR e comparação com indivíduos controlo. a.** Verificámos no *Boxplot*, que tal como já dito existe uma maior concentração de MCP-1 no soro de doentes de AR relativamente aos controlos saudáveis. **b.** Quanto à concentração de MIP-1 $\alpha$  no soro, existe uma maior concentração desta citocina no grupo controlo. **c.** Tal como vemos no *Boxplot*, a proteína MIP-1 $\beta$  é expressa em maior concentração no soro de doentes de AR. **d.** O MIG é igualmente expresso em maior concentração no soro de doentes de AR.

### **3.2.5** Quantificação da concentração de quimiocinas no soro de doentes de AR com diferente actividade da doença, e comparação estatística entre ambos

A quantificação de quimiocinas foi igualmente feita no soro de doentes de AR divididos com base na actividade da doença e fez-se a sua análise comparativa. Verificámos que não existem diferenças significativas para as quimiocinas em estudo (IL-8, MCP-1, MIB-1 $\alpha$ , MIB-1 $\beta$  e MIG).

### **3.2.6** Quantificação da concentração de quimiocinas no soro de doentes de AR aos quais não foi administrado MTX e de doentes de AR que seguiram o tratamento com MTX, e comparação entre ambos

Ao dividirem-se os doentes em dois grupos formados com base na administração ou ausência de terapêutica com MTX, apurámos que não existem diferenças significativas entre os dois grupos de doentes de AR em relação às concentrações das quimiocinas em estudo (IL-8, MCP-1, MIB-1 $\alpha$ , MIB-1 $\beta$  e MIG).

### **3.2.7** Discussão dos resultados de quantificação de citocinas e quimiocinas no soro de doentes de AR

Os mecanismos que ocorrem nos processos de inflamação, os fenómenos de infiltração celular, a activação e regulação de células principais da RII (monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) e da RIA são induzidos por citocinas e quimiocinas.

Neste estudo, através da metodologia de CBA's, conseguimos encontrar alterações importantes, a nível do soro, quanto à presença de algumas citocinas e quimiocinas que estão envolvidas nos mecanismos imunitários de recrutamento (para os locais de inflamação) e de regulação da actividade das células da RII assim como da RIA.

Observando os resultados experimentais deste trabalho, em contraste com outros estudos publicados na literatura, não foram observadas diferenças significativas entre os soros de doentes de artrite e controlos saudáveis de citocinas reguladoras da RII e da

inflamação (IL-6, IL-1 $\beta$ ) (Chomarat *et al.* 1995; Morita *et al.* 1998; O'Rourke *et al.* 2008; Raposo *et al.* 2010). Por sua vez, os níveis do maior mediador de inflamação, ou seja, o TNF- $\alpha$ , encontram-se aumentados no soro de doentes de AR, embora sem diferenças significativas.

Os baixos níveis de IL-10 encontrados no soro de doentes de AR comprovam a importância da falta da acção citocina anti-inflamatória no avanço de desordens autoimunitárias. Os doentes em remissão apresentaram concentrações menores de IL-10 quando comparados com indivíduos com doença activa. Isso concorda com a actividade do tipo retroalimentação negativa realizada por essa citocina.

Para além de termos observado, em doentes de AR, uma maior presença de quimiocinas tipicamente pró-inflamatórias, produzidas especialmente por macrófagos e monócitos, encontramos alterações a nível da expressão de citocinas e quimiocinas envolvidas na regulação dos linfócitos T em doenças autoimunitárias e por isso propomos que estas representam factores importantes na manifestação da doença.

Os níveis maiores de MCP-1 encontrados no soro de doentes de AR (comparados com controlos) comprovam a relevância dessa quimiocina, que desempenha funções quimiótaxicas sobre os macrófagos, e tem uma posição central na inflamação crónica. Por outro lado, na literatura há referência que a terapêutica com mAb contra MCP-1 não se demonstrou relevante na resolução da AR mas sim agravante quando efectuada com doses altas de Ac (Haringman *et al.* 2006). Relativamente ao tratamento de doentes de AR com MTX, verificámos que os doentes tratados apresentam menores concentrações de MCP-1. Sugerimos portanto uma provável implicação dessa proteína na amplificação dos fenómenos inflamatórios, na regulação das células efectoras e que a modificação da homeostase de MCP-1 pode ser avaliada como um indicador da doença pois essa tende a aumentar na fase de remissão da doença.

Para além de ter uma função quimioatraente as proteínas MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  são reguladoras dos linfócitos T em doenças autoimunitárias (Karpus *et al.* 1997).

Os nossos resultados indicam que essa quimiocina é muito sintetizada na fase activa da doença, confirmando uma importante relação entre essa quimiocina e a inflamação crónica. Em relação ao grupo de doentes de AR, estes demonstram ter uma

menor concentração de MIP-1 $\alpha$  quando comparado com o grupo de controlos saudáveis. Esta situação, aparentemente anómala, pode significar que o MIP-1 $\alpha$  na AR, tal como já descrito em outras patologias sofre uma regulação negativa como acontece com as citocinas de tipo *Th1* (Zhang *et al.* 2010). Por outro lado, para além de serem esperados níveis altos de MIP-1 $\alpha$  nos doentes de AR pensamos que haverá uma maior concentração dessa próximo do floco inflamatório devido á sua acção no recrutamento de células participantes no processo inflamatório, ou seja, na membrana sinovial. Acerca do marcador MIP-1 $\beta$  podemos concluir que também é relevante na AR, pois é expresso significativamente em maiores níveis no soro dos doentes de AR, diminuído em doentes AR<sub>C/MTX</sub>. No entanto esta quimiocina está presente em maiores concentrações no soro de AR<sub>Remissão</sub> comparativamente a AR<sub>Activa</sub>, fenómeno este explicável através dos mecanismos de tolerância periférica, por esta proteína estar envolvida na regulação da actividade dos linfócitos T efectores.

Outro resultado considerável é a diferença encontrada entre os níveis das quimiocinas MIG entre indivíduos com artrite e controlos saudáveis. Esta proteína, produzida por macrófagos, tem um papel importante na atracção específica para o local de inflamação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, como já foi demonstrado no processo imunológico que ocorre no Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Agostini *et al.* 2000). Os nossos resultados, demonstrando uma presença de maiores concentrações no soro de doentes de AR, sugerem que esta quimiocina através da sua acção quimiotáctica específica é um factor determinante na degradação das membranas sinoviais no contexto da AR e que uma terapêutica com mAb anti-MIG poderia revelar-se uma nova estratégia para a melhoria da doença.

Os níveis de IL-8 muito altos no soro de doentes de AR confirmam que muito provavelmente a IL-8 será uma das quimiocinas mais importantes no processo de infiltração dos neutrófilos e por tanto nos danos dos tecidos sinoviais, pois tal como Endo *et al* referem no seu trabalho, existem elevados níveis desta quimiocina no LS de doentes AR<sub>Activa</sub>, sendo esses níveis correlacionados directamente com o número de neutrófilos infiltrados nesse local (Endo *et al.* 1991). É importante referir que os nossos resultados quanto à presença desta citocina no soro dos doentes de AR estão de acordo com os trabalhos de Koch e van den Brink, pois também estes encontraram níveis de IL-8 em doentes com essa patologia, no entanto ao contrário do que foi sugerido por outros autores (Koch *et al.* 1991; Peichl *et al.* 1992; Verburgh *et al.* 1993; van den

Brink *et al.* 1994). Conseguimos observar que o estado de remissão da doença é caracterizada por uma diminuição da presença de IL-8 no soro dos doentes de artrite, e além disso, os doentes não tratados com MTX apresentam maiores concentrações dessa citocina no soro. Sugerimos que a IL-8 é mais um factor relevante para avaliar o desenvolvimento da doença e que a sua libertação celular pode ter uma importante contribuição na deslocação e acumulação dos leucócitos e nos eventos inflamatórios que se dão nas articulações inflamadas.

### 3.2.8 Correlação entre as concentrações das várias citocinas e quimiocinas no soro de doentes de AR

Depois de quantificadas as citocinas e quimiocinas no soro dos doentes de AR fizemos o estudo de forma a correlacionarmos os seus níveis e confirmarmos se o aumento da concentração dessas citocinas no soro implica um igual aumento da concentração de outras citocinas ou se pelo contrário, causa uma diminuição da concentração de outras citocinas (Resultados tabelados no ANEXO III).

Verificámos que o IFN- $\gamma$  tem uma correlação forte e significativa com IL-10 ( $r=0,985$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ), IL-1 $\beta$  ( $r=0,935$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ), e com o TNF- $\alpha$  ( $r=0,751$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ). Para as citocinas IL-6 ( $r=0,330$ ,  $p\text{-value}=0,002$ ) e IL-8 ( $r=0,226$ ,  $p\text{-value}=0,034$ ) e a quimiocina MIP-1 $\beta$  ( $r=0,316$ ,  $p\text{-value}=0,003$ ), para além de obtermos um  $p\text{-value}$  estatisticamente significativo, a correlação que existe com o INF- $\gamma$  é baixa.

A correlação da IL-6 com as outras citocinas e quimiocinas em estudo demonstrou que esta tem uma correlação significativa mas baixa com: IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e MIP-1 $\alpha$ .

Para as correlações da IL-8 com as outras proteínas do soro em estudo observou-se que existe correlação moderada com o MIP-1 $\beta$  ( $r=0,406$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ).

Relativamente à correlação da citocina IL-10 com as outras citocinas e quimiocinas em estudo, verificámos que existe correlação forte e com um  $p\text{-value}$  significativo dessa com as citocinas IL-1 $\beta$  ( $r=0,921$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ) e TNF- $\alpha$  ( $r=0,737$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ). Para a correlação da IL-10 com o MIP-1 $\beta$  ( $r=0,406$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ) verificou-se que existe uma correlação moderada.

Para as correlações da IL-1 $\beta$  com as várias proteínas em estudo no soro dos doentes de AR, obteve-se correlação significativa forte com o TNF- $\alpha$  ( $r=0,893$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ). A IL-1 $\beta$  e o MIP-1 $\alpha$  têm uma correlação significativa moderada ( $r=0,432$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ).

O TNF- $\alpha$ , para além das correlações significativas fortes ditas anteriormente que verificámos ter com outras citocinas, também tem correlação moderada com o MIP-1 $\alpha$  ( $r=0,696$ ,  $p\text{-value}=0,000$ ).

O facto de os níveis de IL-10 (citocina anti-inflamatória) estarem correlacionados fortemente e moderadamente respectivamente com os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  deve-se ao facto de estes doentes em estudo sofrerem de uma patologia crónica nos quais essas proteínas normalmente têm um papel atribuído, o que faz com que conseqüentemente haja fases de diferente actividade da doença devido á persistência das mesmas em circulação a recrutar células do SI. Com isto sugerimos que os níveis de IL-10 aumentam porque os níveis de citocinas pró-inflamatórias começam a aumentar devido à presença contínua de células a expôr os auto-antigénios, e ao SI tentar alcançar a homeostase, libertando citocinas que actuem sobre as células que estão a participar na continuidade da doença para diminuir a sua acção.

No respeitante aos resultados relativos ao IFN- $\gamma$ , e visto que é produzido por várias células do SI de forma a melhorar a apresentação de antigénios e a resposta aos mesmos, é importante olharmos directamente para as citocinas que estão indiscutivelmente presentes nesta patologia crónica. Desta forma observámos que os níveis de IFN- $\gamma$  demonstram uma correlação forte com os níveis das citocinas IL-10 (tal como já referido), IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Sendo que, tal como vimos na literatura, esta citocina tem um importante papel em vários mecanismos de defesa assim como na melhoria do desempenho dos mesmos, é de esperar que nesta patologia desenvolva estas correlações com citocinas já descritas como principais responsáveis pelos fenómenos que ocorrem na membrana sinovial de doentes de AR.

Tal como já vimos, os níveis de IL-6 no soro dos doentes de AR apresentam diferenças significativas entre os doentes de AR e os controlos saudáveis, e é de salientar que os níveis desta citocina se encontram bastante baixos ao contrário do esperado, por ser uma citocina correlacionada com vários sinais da inflamação assim como no aumento de várias moléculas da fase aguda da AR (Houssiau *et al.* 1988).

Devido à presença de baixas concentrações de IL-6 no soro dos doentes, as correlações desenvolvidas também se tornaram baixas. No entanto, tal como refere a literatura e os nossos resultados demonstraram, esta citocina tem um importante papel nos processos inflamatórios que ocorrem nos doentes de AR.

Nos nossos resultados já discutidos vimos que a IL-8 está presente em maiores concentrações no soro de doentes de AR comparativamente a indivíduos sãos, e visto que está associada a uma situação de inflamação é considerada um dos principais mediadores da resposta inflamatória. Esperávamos obter correlações fortes desta citocina com o TNF- $\alpha$  e a IL-1, no entanto obtivemos correlações muito baixas da IL-8 com a maioria das citocinas e quimiocinas estudadas no soro de doentes de AR. Sugerimos que estes resultados assim como os outros já apresentados se devam à acção da medicação de cada doente, que poderá estar a induzir um decréscimo significativo dos níveis das principais citocinas nos doentes, e a inibir dessa forma também as correlações biológicas entre elas.

De acordo com o esperado, as concentrações das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estão correlacionadas no soro dos doentes de AR, pois estes mediadores inflamatórios desempenham várias actividades de forma sobreposta, e em muitas das situações de forma complementar (William *et al.* 1997). Esperávamos observar uma maior correlação entre os níveis de IL-1 $\beta$  e a IL-6 por ambos desempenharem algumas funções comuns, e visto que são imprescindíveis nos fenómenos inflamatórios seria de esperar então uma maior correlação nesta patologia.

Embora tenhamos conseguido compreender o comportamento desempenhado pelas várias subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> assim como das diversas citocinas e quimiocinas referidas na artrite reumatóide, verificámos que se tornou uma limitação neste estudo o facto de os doentes fazerem parte de um grupo muito heterogéneo a vários níveis, o que nos dificultou uma discussão mais concisa de todos os nossos resultados.

Entre as variáveis que interferiram determinantemente nos resultados encontra-se a duração da doença de cada indivíduo; a possibilidade de alguns doentes poderem estar a iniciar o desenvolvimento de outra patologia que ainda não esteja registada no processo clínico do doente, o qual foi tido em conta na análise dos resultados; a terapêutica que cada um está a seguir, independentemente do que está a tomar para o

tratamento da AR; e o estado de actividade da doença no dia em que cada individuo doou sangue periférico e líquido sinovial.

Cada um destes factores contribuiu para uma elevada heterogeneidade dentro da população em estudo. Pretendemos contudo num futuro próximo controlar essas variáveis de forma a caracterizar os vários subgrupos de doentes de AR de forma a melhorar a fenotipagem que os vai caracterizar.

## **CAPITULO 4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS**

## CAPITULO 4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com este trabalho pretendemos caracterizar as subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup> no SP e LS de doentes de AR de forma a contribuirmos para a compreensão da sua participação nesta doença, e quantificar a produção de citocinas e quimiocinas séricas.

Os principais locais afectados por esta inflamação crónica são as articulações e o sinóvio envolvente, sendo que as características clínicas se devem à presença de inflamação e danos nas articulações das mãos, pés, punhos, joelhos, quadris, entre outros. A sinovite envolve a presença de um infiltrado de leucócitos principalmente composto por macrófagos, linfócitos T e células do plasma, e é associada ao aumento da angiogénese.

Embora não se tenham obtido diferenças significativas da subpopulação de células T CD8<sup>+</sup> entre doentes de AR e controlos saudáveis, verificámos que a presença e comportamento de algumas subpopulações se revelam determinantes no estabelecimento da doença. Entre essas encontramos que as subpopulações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, ou seja, as CTLs activadas (e dentro deste grupo aquelas que expressam o receptor de *homing* CXCR4), as células T<sub>ME</sub> e T<sub>MC</sub>, assim como as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e grânulos citotóxicos (granzima B) produzidos pelas células T CD8<sup>+</sup> apresentam maiores frequências nos doentes de artrite.

Concluimos que a partir do conhecimento das frequências de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> no SP de doentes de AR (frequência desta subpopulação está aumentada na presença da patologia) poderá ser possível confirmar um prognóstico de AR, assim como auxiliar o reumatologista na caracterização do nível de actividade da mesma. Na eventual necessidade de retirar LS de doentes, a análise imunológica das frequências desta subpopulação será igualmente um bom indicador da presença de inflamação característica da AR, e da fase em que se encontra.

No que diz respeito à distinção entre doença em remissão e activa, este estudo foi pioneiro na caracterização nas subpopulações de CTLs, apontando que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> activados (CD69<sup>+</sup>, CD69<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> e CD25<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>), memória efectora e central, e CTLs que libertam TNF- $\alpha$  são os principais contribuintes para essa distinção.

A confirmação da fase da doença é especialmente importante para que o Reumatologista possa actuar com uma terapêutica mais indicada para a mesma, visto que as células do SI que estão em acção, não são de todo as mesmas, como demonstrámos.

Neste estudo também vimos que, na comparação das frequências de subpopulações de CTLs entre SP e LS em indivíduos com AR estabelecida, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> activados, T<sub>ME</sub> (CD27<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>), CTLs ligados ao receptor de *homing* CXCR4 e T CD8<sup>+</sup> produtores de IL-17 e IL-10, manifestam significativamente maiores frequências no LS desses doentes.

Ainda na vertente de confirmação de prognóstico, visto que as frequências das células T CD8<sup>+</sup> de memória efectora presentes no SP e no LS desenvolvem uma correlação forte, embora o LS seja relativamente mais rico nesta população, concluímos também que esta subpopulação tem um importante interesse direccionado para a clínica. Em suma, o facto desta subpopulação no SP nos dar uma ideia aproximada do que decorre no LS, podemos a partir do estudo da primeira amostra biológica fazer um *screening* primário e só em caso de positividade recorrer à análise do LS, um método mais evasivo.

As células T<sub>MC</sub> CD8<sup>+</sup> na AR poderão vir a ter um interesse como um alvo futuro para vacinas, pois tal como em outros trabalhos, demonstra ser um mediador superior na protecção contra os antigénios, relativamente às T<sub>ME</sub> (Wherry *et al.* 2003; Castiglioni *et al.* 2004; Vaccari *et al.* 2005).

As citocinas e as quimiocinas séricas estudadas estão envolvidas numa série de mecanismos inflamatórios: activação celular, adesão intercelular, angiogénese, destruição de tecidos, assim como outros processos subjacentes à sinovite.

Por um lado o decréscimo das proteínas IL-10 e MIP-1 $\alpha$ , que desempenham funções anti-inflamatórias e recrutamento de leucócitos polimorfonucleares na fase aguda da inflamação, poderá estar directamente associado com o aumento da presença de citocinas que podem levar à degradação das articulações e ao decréscimo de células no combate dessa inflamação. Por outro lado o aumento de outras quimiocinas com principal acção pró-inflamatória tal como já referido, têm uma importante acção de recrutar vários tipos de células e neste estudo mostraram mais uma vez serem

fundamentais na manifestação da doença. Desta forma, alvos anti-quimiocina podem proporcionar benefícios terapêuticos, tal como outros autores têm também descrito para esta e outras patologias.

Relativamente à administração de MTX como terapêutica na AR, vimos que resulta num aumento das subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> de memória central e na diminuição das subpopulações de memória efectora, assim como nas células T CD8<sup>+</sup> que libertam IL-17 no SP. Um próximo alvo será estudar este comportamento após diferentes períodos de terapêutica e em diferentes fases da doença, assim como a alteração comportamental no local de inflamação após a terapia.

Estes dados confirmam a necessidade de aprofundar os estudos sobre os mecanismos responsáveis desta condição, nomeadamente as vias de sinalização que têm maior impacto, de forma a desenvolver uma terapêutica dirigida a controlar o estado de actividade das células T CD8<sup>+</sup> em doentes de AR, com vista a um potencial uso em aplicações clínicas, tal como já é praticado para outras patologias.

## **CAPITULO 5.BIBLIOGRAFIA**

## CAPITULO 5. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. K., J. S. Pober and A. H. Lichtman (2000). Cellular and Molecular Immunology, Saunders.
- Adrain, C., P. J. Duriez, G. Brumatti, P. Delivani and S. J. Martin (2006). "The cytotoxic lymphocyte protease, granzyme B, targets the cytoskeleton and perturbs microtubule polymerization dynamics." J Biol Chem **281**(12): 8118-8125.
- Afeltra, A., M. Galeazzi, G. M. Ferri, A. Amoroso, O. De Pita, F. Porzio and L. Bonomo (1993). "Expression of CD69 antigen on synovial fluid T cells in patients with rheumatoid arthritis and other chronic synovitis." Ann Rheum Dis **52**(6): 457-460.
- Afeltra, A., M. Galeazzi, G. D. Sebastiani, G. M. Ferri, D. Caccavo, M. A. Addressi, R. Marcolongo and L. Bonomo (1997). "Coexpression of CD69 and HLADR activation markers on synovial fluid T lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis: a three-colour cytometric analysis." Int J Exp Pathol **78**(5): 331-336.
- Agostini, C., M. Facco, M. Siviero, D. Carollo, S. Galvan, A. M. Cattelan, R. Zambello, L. Trentin and G. Semenzato (2000). "CXC chemokines IP-10 and mig expression and direct migration of pulmonary CD8+/CXCR3+ T cells in the lungs of patients with HIV infection and T-cell alveolitis." Am J Respir Crit Care Med **162**(4 Pt 1): 1466-1473.
- Akahoshi, T., C. Wada, H. Endo, K. Hirota, S. Hosaka, K. Takagishi, H. Kondo, S. Kashiwazaki and K. Matsushima (1993). "Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis. Regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor." Arthritis Rheum **36**(6): 762-771.
- Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, 3rd, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, B. Combe, K. H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, K. Hobbs, T. W. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T. K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H. A. Menard, L. W. Moreland, R. L. Naden, T. Pincus, J. S. Smolen, E. Stanislawski-Biernat, D. Symmons, P. P. Tak, K. S. Upchurch, J. Vencovsky, F. Wolfe and G. Hawker (2010). "2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative." Arthritis Rheum **62**(9): 2569-2581.
- Allavena, P., G. Bianchi, D. Zhou, J. van Damme, P. Jilek, S. Sozzani and A. Mantovani (1994). "Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3." Eur J Immunol **24**(12): 3233-3236.
- Alonzi, T., E. Fattori, D. Lazzaro, P. Costa, L. Probert, G. Kollias, F. De Benedetti, V. Poli and G. Ciliberto (1998). "Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis." J Exp Med **187**(4): 461-468.
- Amichay, D., R. T. Gazzinelli, G. Karupiah, T. R. Moench, A. Sher and J. M. Farber (1996). "Genes for chemokines MuMig and Crg-2 are induced in protozoan and viral infections in response to IFN-gamma with patterns of tissue expression that suggest nonredundant roles in vivo." J Immunol **157**(10): 4511-4520.
- Appel, H., L. Neure, M. Kuhne, J. Braun, M. Rudwaleit and J. Sieper (2004). "An elevated level of IL-10- and TGFbeta-secreting T cells, B cells and macrophages in the synovial membrane of patients with reactive arthritis compared to rheumatoid arthritis." Clin Rheumatol **23**(5): 435-440.

- Arnett, F. C., S. M. Edworthy, D. A. Bloch, D. J. McShane, J. F. Fries, N. S. Cooper, L. A. Healey, S. R. Kaplan, M. H. Liang, H. S. Luthra and et al. (1988). "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **31**(3): 315-324.
- Bertolini, D. R., G. E. Nedwin, T. S. Bringman, D. D. Smith and G. R. Mundy (1986). "Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors." Nature **319**(6053): 516-518.
- Billiau, A. (1996). "Interferon-gamma in autoimmunity." Cytokine Growth Factor Rev **7**(1): 25-34.
- Boehm, U., T. Klamp, M. Groot and J. C. Howard (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-795.
- Boissier, M. C., G. Chiochia, N. Bessis, J. Hajnal, G. Garotta, F. Nicoletti and C. Fournier (1995). "Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis." Eur J Immunol **25**(5): 1184-1190.
- Bradfield, P. F., N. Amft, E. Vernon-Wilson, A. E. Exley, G. Parsonage, G. E. Rainger, G. B. Nash, A. M. Thomas, D. L. Simmons, M. Salmon and C. D. Buckley (2003). "Rheumatoid fibroblast-like synoviocytes overexpress the chemokine stromal cell-derived factor 1 (CXCL12), which supports distinct patterns and rates of CD4+ and CD8+ T cell migration within synovial tissue." Arthritis Rheum **48**(9): 2472-2482.
- Brennan, F. M., D. Chantry, A. Jackson, R. Maini and M. Feldmann (1989). "Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis." Lancet **2**(8657): 244-247.
- Brennan, F. M. and I. B. McInnes (2008). "Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis." J Clin Invest **118**(11): 3537-3545.
- Bromberg, J. S. (1995). "IL-10 immunosuppression in transplantation." Curr Opin Immunol **7**(5): 639-643.
- Buchan, G., K. Barrett, T. Fujita, T. Taniguchi, R. Maini and M. Feldmann (1988). "Detection of activated T cell products in the rheumatoid joint using cDNA probes to Interleukin-2 (IL-2) IL-2 receptor and IFN-gamma." Clin Exp Immunol **71**(2): 295-301.
- Buckley, C. D., N. Amft, P. F. Bradfield, D. Pilling, E. Ross, F. Arenzana-Seisdedos, A. Amara, S. J. Curnow, J. M. Lord, D. Scheel-Toellner and M. Salmon (2000). "Persistent induction of the chemokine receptor CXCR4 by TGF-beta 1 on synovial T cells contributes to their accumulation within the rheumatoid synovium." J Immunol **165**(6): 3423-3429.
- Butcher, E. C. and L. J. Picker (1996). "Lymphocyte homing and homeostasis." Science **272**(5258): 60-66.
- Butler, D. M., R. N. Maini, M. Feldmann and F. M. Brennan (1995). "Modulation of proinflammatory cytokine release in rheumatoid synovial membrane cell cultures. Comparison of monoclonal anti TNF-alpha antibody with the interleukin-1 receptor antagonist." Eur Cytokine Netw **6**(4): 225-230.
- Cai, L., J. P. Yin, M. A. Starovasnik, D. A. Hogue, K. J. Hillan, J. S. Mort and E. H. Filvaroff (2001). "Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo." Cytokine **16**(1): 10-21.
- Campbell, J. J., K. E. Murphy, E. J. Kunkel, C. E. Brightling, D. Soler, Z. Shen, J. Boisvert, H. B. Greenberg, M. A. Vierra, S. B. Goodman, M. C. Genovese, A. J. Wardlaw, E. C. Butcher and L. Wu (2001). "CCR7 expression and memory T cell diversity in humans." J Immunol **166**(2): 877-884.

- Cannon, G. W., S. H. Pincus, R. D. Emkey, A. Denes, S. A. Cohen, F. Wolfe, P. A. Saway, A. M. Jaffer, A. L. Weaver, L. Cogen and et al. (1989). "Double-blind trial of recombinant gamma-interferon versus placebo in the treatment of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **32**(8): 964-973.
- Carr, M. W., S. J. Roth, E. Luther, S. S. Rose and T. A. Springer (1994). "Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3652-3656.
- Castiglioni, P., M. Gerloni and M. Zanetti (2004). "Genetically programmed B lymphocytes are highly efficient in inducing anti-virus protective immunity mediated by central memory CD8 T cells." Vaccine **23**(5): 699-708.
- Cella, M., D. Scheidegger, K. Palmer-Lehmann, P. Lane, A. Lanzavecchia and G. Alber (1996). "Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation." J Exp Med **184**(2): 747-752.
- Chabaud, M., F. Fossiez, J. L. Taupin and P. Miossec (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.
- Chabaud, M. and P. Miossec (2001). "The combination of tumor necrosis factor alpha blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model." Arthritis Rheum **44**(6): 1293-1303.
- Chaplin, D. D. (2010). "Overview of the immune response." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S3-23.
- Chomarat, P., E. Vannier, J. Dechanet, M. C. Rissoan, J. Banchereau, C. A. Dinarello and P. Miossec (1995). "Balance of IL-1 receptor antagonist/IL-1 beta in rheumatoid synovium and its regulation by IL-4 and IL-10." J Immunol **154**(3): 1432-1439.
- Chu, C. Q., M. Field, M. Feldmann and R. N. Maini (1991). "Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **34**(9): 1125-1132.
- Daly, C. and B. J. Rollins (2003). "Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies." Microcirculation **10**(3-4): 247-257.
- Davies, E. G., D. Isaacs and R. J. Levinsky (1982). "Defective immune interferon production and natural killer activity associated with poor neutrophil mobility and delayed umbilical cord separation." Clin Exp Immunol **50**(2): 454-460.
- Dayar, J. M. (2003). "The pivotal role of interleukin-1 in the clinical manifestations of rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **42 Suppl 2**: ii3-10.
- Dayar, J. M., B. Beutler and A. Cerami (1985). "Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts." J Exp Med **162**(6): 2163-2168.
- de Paz, B., M. Alperi-Lopez, F. J. Ballina-Garcia, C. Prado, C. Gutierrez and A. Suarez (2010). "Cytokines and regulatory T cells in rheumatoid arthritis and their relationship with response to corticosteroids." J Rheumatol **37**(12): 2502-2510.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor and J. E. de Vries (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J Exp Med **174**(5): 1209-1220.

- Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti and S. Romagnani (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production." J Immunol **150**(2): 353-360.
- Deleuran, B., P. Lemche, M. Kristensen, C. Q. Chu, M. Field, J. Jensen, K. Matsushima and K. Stengaard-Pedersen (1994). "Localisation of interleukin 8 in the synovial membrane, cartilage-pannus junction and chondrocytes in rheumatoid arthritis." Scand J Rheumatol **23**(1): 2-7.
- Deleuran, B. W., C. Q. Chu, M. Field, F. M. Brennan, T. Mitchell, M. Feldmann and R. N. Maini (1992). "Localization of tumor necrosis factor receptors in the synovial tissue and cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. Implications for local actions of tumor necrosis factor alpha." Arthritis Rheum **35**(10): 1170-1178.
- Dolan, B. P., K. D. Gibbs, Jr. and S. Ostrand-Rosenberg (2006). "Dendritic cells cross-dressed with peptide MHC class I complexes prime CD8+ T cells." J Immunol **177**(9): 6018-6024.
- Ehinger, M., M. Vestberg, A. C. Johansson, M. Johannesson, A. Svensson and R. Holmdahl (2001). "Influence of CD4 or CD8 deficiency on collagen-induced arthritis." Immunology **103**(3): 291-300.
- Elliott, M. J., R. N. Maini, M. Feldmann, A. Long-Fox, P. Charles, P. Katsikis, F. M. Brennan, J. Walker, H. Bijl, J. Ghrayeb and et al. (1993). "Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha." Arthritis Rheum **36**(12): 1681-1690.
- Endo, H., T. Akahoshi, K. Takagishi, S. Kashiwazaki and K. Matsushima (1991). "Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joints." Lymphokine Cytokine Res **10**(4): 245-252.
- Erhardt, C. C., P. A. Mumford, P. J. Venables and R. N. Maini (1989). "Factors predicting a poor life prognosis in rheumatoid arthritis: an eight year prospective study." Ann Rheum Dis **48**(1): 7-13.
- Farber, J. M. (1990). "A macrophage mRNA selectively induced by gamma-interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(14): 5238-5242.
- Farber, J. M. (1993). "HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines." Biochem Biophys Res Commun **192**(1): 223-230.
- Feldmann, M., F. M. Brennan, B. M. Foxwell and R. N. Maini (2001). "The role of TNF alpha and IL-1 in rheumatoid arthritis." Curr Dir Autoimmun **3**: 188-199.
- Feldmann, M., F. M. Brennan and R. N. Maini (1996). "Rheumatoid arthritis." Cell **85**(3): 307-310.
- Feldmann, M. and R. N. Maini (2001). "Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned?" Annu Rev Immunol **19**: 163-196.
- Felson, D. T., J. S. Smolen, G. Wells, B. Zhang, L. H. van Tuyl, J. Funovits, D. Aletaha, C. F. Allaart, J. Bathon, S. Bombardieri, P. Brooks, A. Brown, M. Matucci-Cerinic, H. Choi, B. Combe, M. de Wit, M. Dougados, P. Emery, D. Furst, J. Gomez-Reino, G. Hawker, E. Keystone, D. Khanna, J. Kirwan, T. K. Kvien, R. Landewe, J. Listing, K. Michaud, E. Martin-Mola, P. Montie, T. Pincus, P. Richards, J. N. Siegel, L. S. Simon, T. Sokka, V. Strand, P. Tugwell, A. Tyndall, D. van der Heijde, S. Verstappen, B. White, F. Wolfe, A. Zink and M. Boers (2011). "American College of Rheumatology/European League Against

- Rheumatism provisional definition of remission in rheumatoid arthritis for clinical trials." *Arthritis Rheum* **63**(3): 573-586.
- Finkelman, F. D., I. M. Katona, T. R. Mosmann and R. L. Coffman (1988). "IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses." *J Immunol* **140**(4): 1022-1027.
- Firestein, G. S., J. M. Alvaro-Gracia and R. Maki (1990). "Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis." *J Immunol* **144**(9): 3347-3353.
- Firestein, G. S. and N. J. Zvaifler (1987). "Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue interferon suggest that gamma-interferon is not the primary macrophage activating factor." *Arthritis Rheum* **30**(8): 864-871.
- Firestein, G. S. and N. J. Zvaifler (2002). "How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end." *Arthritis Rheum* **46**(2): 298-308.
- Fong, Y., K. J. Tracey, L. L. Moldawer, D. G. Hesse, K. B. Manogue, J. S. Kenney, A. T. Lee, G. C. Kuo, A. C. Allison, S. F. Lowry and et al. (1989). "Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia." *J Exp Med* **170**(5): 1627-1633.
- Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J. J. Pin, P. Garrone, E. Garcia, S. Saeland, D. Blanchard, C. Gaillard, B. Das Mahapatra, E. Rouvier, P. Golstein, J. Banchereau and S. Lebecque (1996). "T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines." *J Exp Med* **183**(6): 2593-2603.
- Frucht, D. M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J. J. O'Shea and S. Koyasu (2001). "IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge." *Trends Immunol* **22**(10): 556-560.
- Gaffen, S. L. (2008). "An overview of IL-17 function and signaling." *Cytokine* **43**(3): 402-407.
- Gessani, S. and F. Belardelli (1998). "IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance." *Cytokine Growth Factor Rev* **9**(2): 117-123.
- Goronzy, J. J. and C. M. Weyand (2009). "Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis." *Arthritis Res Ther* **11**(5): 249.
- Graves, D. T., Y. L. Jiang, M. J. Williamson and A. J. Valente (1989). "Identification of monocyte chemotactic activity produced by malignant cells." *Science* **245**(4925): 1490-1493.
- Guarda, G., M. Hons, S. F. Soriano, A. Y. Huang, R. Polley, A. Martin-Fontecha, J. V. Stein, R. N. Germain, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2007). "L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells." *Nat Immunol* **8**(7): 743-752.
- Happel, K. I., M. Zheng, E. Young, L. J. Quinton, E. Lockhart, A. J. Ramsay, J. E. Shellito, J. R. Schurr, G. J. Bagby, S. Nelson and J. K. Kolls (2003). "Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection." *J Immunol* **170**(9): 4432-4436.
- Haringman, J. J., D. M. Gerlag, T. J. Smeets, D. Baeten, F. van den Bosch, B. Bresnihan, F. C. Breedveld, H. J. Dinant, F. Legay, H. Gram, P. Loetscher, R. Schouder, T. Woodworth and P. P. Tak (2006). "A randomized controlled trial with an anti-CCL2 (anti-monocyte chemotactic protein 1) monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **54**(8): 2387-2392.

- Harris, D. P., L. Haynes, P. C. Sayles, D. K. Duso, S. M. Eaton, N. M. Lepak, L. L. Johnson, S. L. Swain and F. E. Lund (2000). "Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells." Nat Immunol **1**(6): 475-482.
- Hatano, Y., T. Kasama, H. Iwabuchi, R. Hanaoka, H. T. Takeuchi, L. Jing, Y. Mori, K. Kobayashi, M. Negishi, H. Ide and M. Adachi (1999). "Macrophage inflammatory protein 1 alpha expression by synovial fluid neutrophils in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **58**(5): 297-302.
- Haworth, C., F. M. Brennan, D. Chantry, M. Turner, R. N. Maini and M. Feldmann (1991). "Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rheumatoid arthritis: regulation by tumor necrosis factor-alpha." Eur J Immunol **21**(10): 2575-2579.
- Hayashida, K., T. Nanki, H. Girschick, S. Yavuz, T. Ochi and P. E. Lipsky (2001). "Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8." Arthritis Res **3**(2): 118-126.
- Honorati, M. C., R. Meliconi, L. Pulsatelli, S. Cane, L. Frizziero and A. Facchini (2001). "High in vivo expression of interleukin-17 receptor in synovial endothelial cells and chondrocytes from arthritis patients." Rheumatology (Oxford) **40**(5): 522-527.
- Hopkins, S. J. and A. Meager (1988). "Cytokines in synovial fluid: II. The presence of tumour necrosis factor and interferon." Clin Exp Immunol **73**(1): 88-92.
- Hosaka, S., T. Akahoshi, C. Wada and H. Kondo (1994). "Expression of the chemokine superfamily in rheumatoid arthritis." Clin Exp Immunol **97**(3): 451-457.
- Houssiau, F. A., J. P. Devogelaer, J. Van Damme, C. N. de Deuxchaisnes and J. Van Snick (1988). "Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides." Arthritis Rheum **31**(6): 784-788.
- Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel and M. Aguet (1993). "Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor." Science **259**(5102): 1742-1745.
- Hueber, A. J., D. L. Asquith, I. B. McInnes and A. M. Miller (2010). "Embracing novel cytokines in RA - complexity grows as does opportunity!" Best Pract Res Clin Rheumatol **24**(4): 479-487.
- Hull, J., H. Ackerman, K. Isles, S. Usen, M. Pinder, A. Thomson and D. Kwiatkowski (2001). "Unusual haplotypic structure of IL8, a susceptibility locus for a common respiratory virus." Am J Hum Genet **69**(2): 413-419.
- Husby, G. and R. C. Williams, Jr. (1988). "Synovial localization of tumor necrosis factor in patients with rheumatoid arthritis." J Autoimmun **1**(4): 363-371.
- Hussein, M. R., N. A. Fathi, A. M. El-Din, H. I. Hassan, F. Abdullah, E. Al-Hakeem and E. A. Backer (2008). "Alterations of the CD4(+), CD8 (+) T cell subsets, interleukins-1beta, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor-alpha and soluble intercellular adhesion molecule-1 in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: preliminary observations." Pathol Oncol Res **14**(3): 321-328.
- Huston, D. P. (1997). "The biology of the immune system." JAMA **278**(22): 1804-1814.
- Imhof, B. A. and M. Aurrand-Lions (2004). "Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes." Nat Rev Immunol **4**(6): 432-444.
- Isomaki, P., R. Luukkainen, O. Lassila, P. Toivanen and J. Punnonen (1999). "Synovial fluid T cells from patients with rheumatoid arthritis are refractory to the T helper type 2 differentiation-inducing effects of interleukin-4." Immunology **96**(3): 358-364.

- Jiang, H., S. I. Zhang and B. Pernis (1992). "Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis." Science **256**(5060): 1213-1215.
- Joosten, L. A., M. M. Helsen, T. Saxne, F. A. van De Loo, D. Heinegard and W. B. van Den Berg (1999). "IL-1 alpha beta blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced arthritis, whereas TNF-alpha blockade only ameliorates joint inflammation." J Immunol **163**(9): 5049-5055.
- Kaech, S. M., E. J. Wherry and R. Ahmed (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." Nat Rev Immunol **2**(4): 251-262.
- Kahle, P., J. G. Saal, K. Schaudt, J. Zacher, P. Fritz and G. Pawelec (1992). "Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue." Ann Rheum Dis **51**(6): 731-734.
- Kamijo, R., J. Le, D. Shapiro, E. A. Havell, S. Huang, M. Aguet, M. Bosland and J. Vilcek (1993). "Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with Bacillus Calmette-Guerin and subsequent challenge with lipopolysaccharide." J Exp Med **178**(4): 1435-1440.
- Kang, Y. M., X. Zhang, U. G. Wagner, H. Yang, R. D. Beckenbaugh, P. J. Kurtin, J. J. Goronzy and C. M. Weyand (2002). "CD8 T cells are required for the formation of ectopic germinal centers in rheumatoid synovitis." J Exp Med **195**(10): 1325-1336.
- Karpus, W. J. and K. J. Kennedy (1997). "MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation." J Leukoc Biol **62**(5): 681-687.
- Kasama, T., R. M. Strieter, N. W. Lukacs, P. M. Lincoln, M. D. Burdick and S. L. Kunkel (1995). "Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis." J Clin Invest **95**(6): 2868-2876.
- Kiely, P. D., D. O'Brien and D. B. Oliveira (1996). "Anti-CD8 treatment reduces the severity of inflammatory arthritis, but not vasculitis, in mercuric chloride-induced autoimmunity." Clin Exp Immunol **106**(2): 280-285.
- Kikly, K., L. Liu, S. Na and J. D. Sedgwick (2006). "The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation." Curr Opin Immunol **18**(6): 670-675.
- Kishimoto, T. (2005). "Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology." Annu Rev Immunol **23**: 1-21.
- Klebanoff, C. A., L. Gattinoni and N. P. Restifo (2006). "CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy." Immunol Rev **211**: 214-224.
- Klimiuk, P. A., H. Yang, J. J. Goronzy and C. M. Weyand (1999). "Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent." Clin Immunol **90**(1): 65-78.
- Koch, A. E., S. L. Kunkel, J. C. Burrows, H. L. Evanoff, G. K. Haines, R. M. Pope and R. M. Strieter (1991). "Synovial tissue macrophage as a source of the chemotactic cytokine IL-8." J Immunol **147**(7): 2187-2195.
- Koch, A. E., S. L. Kunkel, L. A. Harlow, D. D. Mazarakis, G. K. Haines, M. D. Burdick, R. M. Pope and R. M. Strieter (1994). "Macrophage inflammatory protein-1 alpha. A novel chemotactic cytokine for macrophages in rheumatoid arthritis." J Clin Invest **93**(3): 921-928.
- Koch, A. E., S. L. Kunkel, M. R. Shah, S. Hosaka, M. M. Halloran, G. K. Haines, M. D. Burdick, R. M. Pope and R. M. Strieter (1995). "Growth-related gene product

- alpha. A chemotactic cytokine for neutrophils in rheumatoid arthritis." J Immunol **155**(7): 3660-3666.
- Koch, A. E., P. J. Polverini and S. J. Leibovich (1986). "Stimulation of neovascularization by human rheumatoid synovial tissue macrophages." Arthritis Rheum **29**(4): 471-479.
- Konya, C., J. J. Goronzy and C. M. Weyand (2009). "Treating autoimmune disease by targeting CD8(+) T suppressor cells." Expert Opin Biol Ther **9**(8): 951-965.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Kotake, S., N. Udagawa, N. Takahashi, K. Matsuzaki, K. Itoh, S. Ishiyama, S. Saito, K. Inoue, N. Kamatani, M. T. Gillespie, T. J. Martin and T. Suda (1999). "IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis." J Clin Invest **103**(9): 1345-1352.
- Krzysiek, R., E. A. Lefevre, W. Zou, A. Foussat, J. Bernard, A. Portier, P. Galanaud and Y. Richard (1999). "Antigen receptor engagement selectively induces macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokine production in human B cells." J Immunol **162**(8): 4455-4463.
- Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, C. Jemma, M. Giovarelli and G. Cavallo (1988). "Interferon-gamma is not an antiviral, but a growth-promoting factor for T lymphocytes." Eur J Immunol **18**(4): 503-509.
- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2000). "Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells." Science **290**(5489): 92-97.
- Lapinet, J. A., P. Scapini, F. Calzetti, O. Perez and M. A. Cassatella (2000). "Gene expression and production of tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta (IL-1beta), IL-8, macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and gamma interferon-inducible protein 10 by human neutrophils stimulated with group B meningococcal outer membrane vesicles." Infect Immun **68**(12): 6917-6923.
- Larsson, P., T. J. Goldschmidt, L. Klareskog and R. Holmdahl (1989). "Oestrogen-mediated suppression of collagen-induced arthritis in rats. Studies on the role of the thymus and of peripheral CD8+ T lymphocytes." Scand J Immunol **30**(6): 741-747.
- Lee, J. Y., D. Goldman, L. M. Piliero, M. Petri and K. E. Sullivan (2001). "Interferon-gamma polymorphisms in systemic lupus erythematosus." Genes Immun **2**(5): 254-257.
- Lee, Y. H., Y. Ishida, M. Rifa'i, Z. Shi, K. Isobe and H. Suzuki (2008). "Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **180**(2): 825-832.
- Li, Y., L. Jiang, S. Zhang, L. Yin, L. Ma, D. He and J. Shen (2011). "Methotrexate attenuates the Th17/IL-17 levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and RA patients." Rheumatol Int.
- Liao, F., R. L. Rabin, J. R. Yannelli, L. G. Koniaris, P. Vanguri and J. M. Farber (1995). "Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization." J Exp Med **182**(5): 1301-1314.
- Loetscher, P., M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini and B. Moser (1994). "Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes." FASEB J **8**(13): 1055-1060.
- Lu, B., B. J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N. W. Lukacs, S. L. Kunkel, R. North, C. Gerard and B. J. Rollins (1998). "Abnormalities in monocyte recruitment and

- cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice." J Exp Med **187**(4): 601-608.
- Lubberts, E., M. I. Koenders, B. Oppers-Walgreen, L. van den Bersselaar, C. J. Coenende Roo, L. A. Joosten and W. B. van den Berg (2004). "Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion." Arthritis Rheum **50**(2): 650-659.
- Masopust, D., V. Vezys, E. J. Wherry and R. Ahmed (2007). "A brief history of CD8 T cells." Eur J Immunol **37** Suppl 1: S103-110.
- Matsuno, H., T. Sawai, T. Nezuka, M. Uzuki, H. Tsuji, N. Nishimoto and K. Yoshizaki (1998). "Treatment of rheumatoid synovitis with anti-reshaping human interleukin-6 receptor monoclonal antibody: use of rheumatoid arthritis tissue implants in the SCID mouse model." Arthritis Rheum **41**(11): 2014-2021.
- Matsuno, H., K. Yudoh, R. Katayama, F. Nakazawa, M. Uzuki, T. Sawai, T. Yonezawa, Y. Saeki, G. S. Panayi, C. Pitzalis and T. Kimura (2002). "The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera." Rheumatology (Oxford) **41**(3): 329-337.
- Matsushima, K., C. G. Larsen, G. C. DuBois and J. J. Oppenheim (1989). "Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line." J Exp Med **169**(4): 1485-1490.
- Mauritz, N. J., R. Holmdahl, R. Jonsson, P. H. Van der Meide, A. Scheynius and L. Klareskog (1988). "Treatment with gamma-interferon triggers the onset of collagen arthritis in mice." Arthritis Rheum **31**(10): 1297-1304.
- McInnes, I. B. (2003). "Leukotrienes, mast cells, and T cells." Arthritis Res Ther **5**(6): 288-289.
- McInnes, I. B. and G. Schett (2007). "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis." Nat Rev Immunol **7**(6): 429-442.
- Medzhitov, R. (2007). "Recognition of microorganisms and activation of the immune response." Nature **449**(7164): 819-826.
- Miossec, P. (2004). "IL-17 in rheumatoid arthritis: a new target for treatment or just another cytokine?" Joint Bone Spine **71**(2): 87-90.
- Miossec, P. (2007). "Interleukin-17 in fashion, at last: ten years after its description, its cellular source has been identified." Arthritis Rheum **56**(7): 2111-2115.
- Morita, Y., M. Yamamura, K. Nishida, S. Harada, H. Okamoto, H. Inoue, Y. Ohmoto, R. L. Modlin and H. Makino (1998). "Expression of interleukin-12 in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **41**(2): 306-314.
- Motyka, B., G. Korbitt, M. J. Pinkoski, J. A. Heibin, A. Caputo, M. Hobman, M. Barry, I. Shostak, T. Sawchuk, C. F. Holmes, J. Gauldie and R. C. Bleackley (2000). "Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis." Cell **103**(3): 491-500.
- Murphy, K. M., P. Travers and M. Walport (2007). Janeway's Immunobiology, Garland Science.
- Nakae, S., A. Nambu, K. Sudo and Y. Iwakura (2003). "Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice." J Immunol **171**(11): 6173-6177.
- Neidel, J., M. Schulze and J. Lindschau (1995). "Association between degree of bone-erosion and synovial fluid-levels of tumor necrosis factor alpha in the knee-joints of patients with rheumatoid arthritis." Inflamm Res **44**(5): 217-221.

- Neogi, T., D. Aletaha, A. J. Silman, R. L. Naden, D. T. Felson, R. Aggarwal, C. O. Bingham, 3rd, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, B. Combe, K. H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, K. Hobbs, T. W. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, D. Khanna, T. K. Kvien, T. Laing, K. Liao, P. Mease, H. A. Menard, L. W. Moreland, R. Nair, T. Pincus, S. Ringold, J. S. Smolen, E. Stanislawska-Biernat, D. Symmons, P. P. Tak, K. S. Upchurch, J. Vencovsky, F. Wolfe and G. Hawker (2010). "The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report." Arthritis Rheum **62**(9): 2582-2591.
- Northrop, J. K. and H. Shen (2004). "CD8+ T-cell memory: only the good ones last." Curr Opin Immunol **16**(4): 451-455.
- O'Garra, A., P. L. Vieira, P. Vieira and A. E. Goldfeld (2004). "IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage." J Clin Invest **114**(10): 1372-1378.
- O'Rourke, K. P., G. O'Donoghue, C. Adams, H. Mulcahy, C. Molloy, C. Silke, M. Molloy, F. Shanahan and F. O'Gara (2008). "High levels of Lymphotoxin-Beta (LT-Beta) gene expression in rheumatoid arthritis synovium: clinical and cytokine correlations." Rheumatol Int **28**(10): 979-986.
- Obert, H. J. and P. H. Hofschneider (1985). "[Interferon in chronic polyarthritis. Positive effect in clinical evaluation]." Dtsch Med Wochenschr **110**(46): 1766-1769.
- Oliva, A., A. L. Kinter, M. Vaccarezza, A. Rubbert, A. Catanzaro, S. Moir, J. Monaco, L. Ehler, S. Mizell, R. Jackson, Y. Li, J. W. Romano and A. S. Fauci (1998). "Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro." J Clin Invest **102**(1): 223-231.
- Ormerod, M. G. and D. Novo (2008). Flow Cytometry - A Basic Introduction, Privately published.
- Panayi, G. S., V. M. Corrigan and C. Pitzalis (2001). "Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other beasts." Rheum Dis Clin North Am **27**(2): 317-334.
- Panayi, G. S., J. S. Lanchbury and G. H. Kingsley (1992). "The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **35**(7): 729-735.
- Panitch, H. S., R. L. Hirsch, A. S. Haley and K. P. Johnson (1987). "Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon." Lancet **1**(8538): 893-895.
- Pearl, J. E., B. Saunders, S. Ehlers, I. M. Orme and A. M. Cooper (2001). "Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse." Cell Immunol **211**(1): 43-50.
- Peichl, P., M. Ceska, H. Broell, F. Effenberger and I. J. Lindley (1992). "Human neutrophil activating peptide/interleukin 8 acts as an autoantigen in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **51**(1): 19-22.
- Pereira da Silva, J. A. and A. D. Woolf (2010). Rheumatology in Practice, Springer.
- Perussia, B., E. T. Dayton, V. Fanning, P. Thiagarajan, J. Hoxie and G. Trinchieri (1983). "Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway." J Exp Med **158**(6): 2058-2080.

- Pinkoski, M. J., M. Hobman, J. A. Heibein, K. Tomaselli, F. Li, P. Seth, C. J. Froelich and R. C. Bleackley (1998). "Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis." *Blood* **92**(3): 1044-1054.
- Plater-Zyberk, C., L. A. Joosten, M. M. Helsen, M. I. Koenders, P. A. Baeuerle and W. B. van den Berg (2009). "Combined blockade of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 17 pathways potently suppresses chronic destructive arthritis in a tumour necrosis factor alpha-independent mouse model." *Ann Rheum Dis* **68**(5): 721-728.
- Pulsatelli, L., P. Dolzani, A. Piacentini, T. Silvestri, R. Ruggeri, G. Gualtieri, R. Meliconi and A. Facchini (1999). "Chemokine production by human chondrocytes." *J Rheumatol* **26**(9): 1992-2001.
- Raposo, B. R., P. Rodrigues-Santos, H. Carneiro, A. M. Agua-Doce, L. Carvalho, J. A. Pereira da Silva, L. Graca and M. M. Souto-Carneiro (2010). "Monoclonal anti-CD8 therapy induces disease amelioration in the K/BxN mouse model of spontaneous chronic polyarthritis." *Arthritis Rheum* **62**(10): 2953-2962.
- Robinson, E., E. C. Keystone, T. J. Schall, N. Gillett and E. N. Fish (1995). "Chemokine expression in rheumatoid arthritis (RA): evidence of RANTES and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 beta production by synovial T cells." *Clin Exp Immunol* **101**(3): 398-407.
- Roth, M. D. (1994). "Interleukin 2 induces the expression of CD45RO and the memory phenotype by CD45RA+ peripheral blood lymphocytes." *J Exp Med* **179**(3): 857-864.
- Ruddy, M. J., G. C. Wong, X. K. Liu, H. Yamamoto, S. Kasayama, K. L. Kirkwood and S. L. Gaffen (2004). "Functional cooperation between interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha is mediated by CCAAT/enhancer-binding protein family members." *J Biol Chem* **279**(4): 2559-2567.
- Rudolph, E. H. and J. M. Woods (2005). "Chemokine expression and regulation of angiogenesis in rheumatoid arthritis." *Curr Pharm Des* **11**(5): 613-631.
- Ruth, J. H., J. B. Rottman, K. J. Katschke, Jr., S. Qin, L. Wu, G. LaRosa, P. Ponath, R. M. Pope and A. E. Koch (2001). "Selective lymphocyte chemokine receptor expression in the rheumatoid joint." *Arthritis Rheum* **44**(12): 2750-2760.
- Said, E. A., F. P. Dupuy, L. Trautmann, Y. Zhang, Y. Shi, M. El-Far, B. J. Hill, A. Noto, P. Ancuta, Y. Peretz, S. G. Fonseca, J. Van Grevenynghe, M. R. Boulassel, J. Bruneau, N. H. Shoukry, J. P. Routy, D. C. Douek, E. K. Haddad and R. P. Sekaly (2010). "Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection." *Nat Med* **16**(4): 452-459.
- Salcedo, R., M. L. Ponce, H. A. Young, K. Wasserman, J. M. Ward, H. K. Kleinman, J. J. Oppenheim and W. J. Murphy (2000). "Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression." *Blood* **96**(1): 34-40.
- Salliot, C. and D. van der Heijde (2009). "Long-term safety of methotrexate monotherapy in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature research." *Ann Rheum Dis* **68**(7): 1100-1104.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." *Nature* **401**(6754): 708-712.
- Sancho, D., M. Gomez, F. Viedma, E. Esplugues, M. Gordon-Alonso, M. A. Garcia-Lopez, H. de la Fuente, A. C. Martinez, P. Lauzurica and F. Sanchez-Madrid (2003). "CD69 downregulates autoimmune reactivity through active

- transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis." J Clin Invest **112**(6): 872-882.
- Sarvetnick, N., D. Liggitt, S. L. Pitts, S. E. Hansen and T. A. Stewart (1988). "Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma." Cell **52**(5): 773-782.
- Schall, T. J., K. Bacon, R. D. Camp, J. W. Kaspari and D. V. Goeddel (1993). "Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes." J Exp Med **177**(6): 1821-1826.
- Schroder, A. E., A. Greiner, C. Seyfert and C. Berek (1996). "Differentiation of B cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 221-225.
- Scott, D. L., F. Wolfe and T. W. Huizinga (2010). "Rheumatoid arthritis." Lancet **376**(9746): 1094-1108.
- Sen, G. C. (2001). "Viruses and interferons." Annu Rev Microbiol **55**: 255-281.
- Shalaby, M. R., A. Waage and T. Espevik (1989). "Cytokine regulation of interleukin 6 production by human endothelial cells." Cell Immunol **121**(2): 372-382.
- Sherry, B., P. Tekamp-Olson, C. Gallegos, D. Bauer, G. Davatellis, S. D. Wolpe, F. Masiarz, D. Coit and A. Cerami (1988). "Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta." J Exp Med **168**(6): 2251-2259.
- Sheu, B. C., R. H. Lin, H. N. Ho and S. C. Huang (1997). "Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma." Hum Immunol **56**(1-2): 39-48.
- Siegel, J. P. (1988). "Effects of interferon-gamma on the activation of human T lymphocytes." Cell Immunol **111**(2): 461-472.
- Simon, A. K., E. Seipelt and J. Sieper (1994). "Divergent T-cell cytokine patterns in inflammatory arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(18): 8562-8566.
- Smolen, J. S., A. Beaulieu, A. Rubbert-Roth, C. Ramos-Remus, J. Rovensky, E. Alecock, T. Woodworth and R. Alten (2008). "Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial." Lancet **371**(9617): 987-997.
- Smolen, J. S., R. Landewe, F. C. Breedveld, M. Dougados, P. Emery, C. Gaujoux-Viala, S. Gorter, R. Knevel, J. Nam, M. Schoels, D. Aletaha, M. Buch, L. Gossec, T. Huizinga, J. W. Bijlsma, G. Burmester, B. Combe, M. Cutolo, C. Gabay, J. Gomez-Reino, M. Kouloumas, T. K. Kvien, E. Martin-Mola, I. McInnes, K. Pavelka, P. van Riel, M. Scholte, D. L. Scott, T. Sokka, G. Valesini, R. van Vollenhoven, K. L. Winthrop, J. Wong, A. Zink and D. van der Heijde (2010). "EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs." Ann Rheum Dis **69**(6): 964-975.
- Smyth, M. J. and J. A. Trapani (1995). "Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis." Immunol Today **16**(4): 202-206.
- Stankovic, A., V. Slavic, B. Stamenkovic, B. Kamenov, M. Bojanovic and D. R. Mitrovic (2009). "Serum and synovial fluid concentrations of CCL2 (MCP-1) chemokine in patients suffering rheumatoid arthritis and osteoarthritis reflect disease activity." Bratisl Lek Listy **110**(10): 641-646.

- Strand, V., R. Kimberly and J. D. Isaacs (2007). "Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions." Nat Rev Drug Discov **6**(1): 75-92.
- Strieter, R. M., P. J. Polverini, D. A. Arenberg and S. L. Kunkel (1995). "The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis." Shock **4**(3): 155-160.
- Strieter, R. M., R. Wiggins, S. H. Phan, B. L. Wharram, H. J. Showell, D. G. Remick, S. W. Chensue and S. L. Kunkel (1989). "Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **162**(2): 694-700.
- Sun, J. C. and M. J. Bevan (2003). "Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help." Science **300**(5617): 339-342.
- Suzuki, Y., M. A. Orellana, R. D. Schreiber and J. S. Remington (1988). "Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*." Science **240**(4851): 516-518.
- Szekanecz, Z., M. M. Halloran, M. V. Volin, J. M. Woods, R. M. Strieter, G. Kenneth Haines, 3rd, S. L. Kunkel, M. D. Burdick and A. E. Koch (2000). "Temporal expression of inflammatory cytokines and chemokines in rat adjuvant-induced arthritis." Arthritis Rheum **43**(6): 1266-1277.
- Szekanecz, Z., J. Kim and A. E. Koch (2003). "Chemokines and chemokine receptors in rheumatoid arthritis." Semin Immunol **15**(1): 15-21.
- Szekanecz, Z. and A. E. Koch (2001). "Chemokines and angiogenesis." Curr Opin Rheumatol **13**(3): 202-208.
- Szekanecz, Z. and A. E. Koch (2007). "Macrophages and their products in rheumatoid arthritis." Curr Opin Rheumatol **19**(3): 289-295.
- Szekanecz, Z., A. E. Koch, S. L. Kunkel and R. M. Strieter (1998). "Cytokines in rheumatoid arthritis. Potential targets for pharmacological intervention." Drugs Aging **12**(5): 377-390.
- Szekanecz, Z., R. M. Strieter, S. L. Kunkel and A. E. Koch (1998). "Chemokines in rheumatoid arthritis." Springer Semin Immunopathol **20**(1-2): 115-132.
- Szekanecz, Z., A. Vegvari, Z. Szabo and A. E. Koch (2010). "Chemokines and chemokine receptors in arthritis." Front Biosci (Schol Ed) **2**: 153-167.
- Tada, Y., A. Ho, D. R. Koh and T. W. Mak (1996). "Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis." J Immunol **156**(11): 4520-4526.
- Takemura, S., A. Braun, C. Crowson, P. J. Kurtin, R. H. Cofield, W. M. O'Fallon, J. J. Goronzy and C. M. Weyand (2001). "Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis." J Immunol **167**(2): 1072-1080.
- Tanaka, J., H. Nomiya, T. Yamamoto, F. Hamada and T. Kambara (1993). "T-cell chemotactic activity of cytokine LD78: a comparative study with interleukin-8, a chemotactic factor for the T-cell CD45RA+ phenotype." Int Arch Allergy Immunol **100**(3): 201-208.
- Tanaka, Y., D. H. Adams, S. Hubscher, H. Hirano, U. Siebenlist and S. Shaw (1993). "T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta." Nature **361**(6407): 79-82.
- Taub, D. D., K. Conlon, A. R. Lloyd, J. J. Oppenheim and D. J. Kelvin (1993). "Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta." Science **260**(5106): 355-358.
- Taylor, P. C., A. M. Peters, E. Paleolog, P. T. Chapman, M. J. Elliott, R. McCloskey, M. Feldmann and R. N. Maini (2000). "Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **43**(1): 38-47.

- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." *Nat Rev Immunol* **2**(10): 735-747.
- Troughton, P. R., R. Platt, H. Bird, E. el-Manzalawi, M. Bassiouni and V. Wright (1996). "Synovial fluid interleukin-8 and neutrophil function in rheumatoid arthritis and seronegative polyarthritis." *Br J Rheumatol* **35**(12): 1244-1251.
- Vaccari, M., C. J. Trindade, D. Venzon, M. Zanetti and G. Franchini (2005). "Vaccine-induced CD8+ central memory T cells in protection from simian AIDS." *J Immunol* **175**(6): 3502-3507.
- van den Berg, W. B., L. A. Joosten, M. Helsen and F. A. van de Loo (1994). "Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment." *Clin Exp Immunol* **95**(2): 237-243.
- van den Brink, H. R., M. J. van Wijk, R. G. Geertzen and J. W. Bijlsma (1994). "Influence of corticosteroid pulse therapy on the serum levels of soluble interleukin 2 receptor, interleukin 6 and interleukin 8 in patients with rheumatoid arthritis." *J Rheumatol* **21**(3): 430-434.
- Verburgh, C. A., M. H. Hart, L. A. Aarden and A. J. Swaak (1993). "Interleukin-8 (IL-8) in synovial fluid of rheumatoid and nonrheumatoid joint effusions." *Clin Rheumatol* **12**(4): 494-499.
- Villiger, P. M., R. Terkeltaub and M. Lotz (1992). "Production of monocyte chemoattractant protein-1 by inflamed synovial tissue and cultured synoviocytes." *J Immunol* **149**(2): 722-727.
- Visser, K., W. Katchamart, E. Loza, J. A. Martinez-Lopez, C. Salliot, J. Trudeau, C. Bombardier, L. Carmona, D. van der Heijde, J. W. Bijlsma, D. T. Boumpas, H. Canhao, C. J. Edwards, V. Hamuryudan, T. K. Kvien, B. F. Leeb, E. M. Martin-Mola, H. Mielants, U. Muller-Ladner, G. Murphy, M. Ostergaard, I. A. Pereira, C. Ramos-Remus, G. Valentini, J. Zochling and M. Dougados (2009). "Multinational evidence-based recommendations for the use of methotrexate in rheumatic disorders with a focus on rheumatoid arthritis: integrating systematic literature research and expert opinion of a broad international panel of rheumatologists in the 3E Initiative." *Ann Rheum Dis* **68**(7): 1086-1093.
- von Boehmer, H., P. Kisielow, H. Kishi, B. Scott, P. Borgulya and H. S. Teh (1989). "The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the alpha beta receptor for antigen." *Immunol Rev* **109**: 143-151.
- Wagner, U. G., P. J. Kurtin, A. Wahner, M. Brackertz, D. J. Berry, J. J. Goronzy and C. M. Weyand (1998). "The role of CD8+ CD40L+ T cells in the formation of germinal centers in rheumatoid synovitis." *J Immunol* **161**(11): 6390-6397.
- Wakasa-Morimoto, C., T. Toyosaki-Maeda, T. Matsutani, R. Yoshida, S. Nakamura-Kikuoka, M. Maeda-Tanimura, H. Yoshitomi, K. Hirota, M. Hashimoto, H. Masaki, Y. Fujii, T. Sakata, Y. Tsuruta, R. Suzuki, N. Sakaguchi and S. Sakaguchi (2008). "Arthritis and pneumonitis produced by the same T cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis." *Int Immunol* **20**(10): 1331-1342.
- Wakim, L. M. and M. J. Bevan (2011). "Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection." *Nature* **471**(7340): 629-632.
- Wang, B., A. Gonzalez, C. Benoist and D. Mathis (1996). "The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus." *Eur J Immunol* **26**(8): 1762-1769.

- Wang, C. R. and M. F. Liu (2003). "Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis." Clin Exp Immunol **132**(2): 371-378.
- Wang, P., P. Wu, M. I. Siegel, R. W. Egan and M. M. Billah (1995). "Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms." J Biol Chem **270**(16): 9558-9563.
- Weninger, W., M. A. Crowley, N. Manjunath and U. H. von Andrian (2001). "Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells." J Exp Med **194**(7): 953-966.
- Wherry, E. J., V. Teichgraber, T. C. Becker, D. Masopust, S. M. Kaech, R. Antia, U. H. von Andrian and R. Ahmed (2003). "Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets." Nat Immunol **4**(3): 225-234.
- William, N. K., E. D. Harris and S. Ruddy (1997). Textbook of Rheumatology, W.B. Saunders Co.
- Williams, R. O., M. Feldmann and R. N. Maini (1992). "Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(20): 9784-9788.
- Williams, R. O., D. G. Williams, M. Feldmann and R. N. Maini (1993). "Increased limb involvement in murine collagen-induced arthritis following treatment with anti-interferon-gamma." Clin Exp Immunol **92**(2): 323-327.
- Wolpe, S. D., G. Davatelis, B. Sherry, B. Beutler, D. G. Hesse, H. T. Nguyen, L. L. Moldawer, C. F. Nathan, S. F. Lowry and A. Cerami (1988). "Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties." J Exp Med **167**(2): 570-581.
- Yang, X., H. R. Stennicke, B. Wang, D. R. Green, R. U. Janicke, A. Srinivasan, P. Seth, G. S. Salvesen and C. J. Froelich (1998). "Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7." J Biol Chem **273**(51): 34278-34283.
- Yoshimoto, T., K. Takeda, T. Tanaka, K. Ohkusu, S. Kashiwamura, H. Okamura, S. Akira and K. Nakanishi (1998). "IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production." J Immunol **161**(7): 3400-3407.
- Yoshimura, T., E. A. Robinson, S. Tanaka, E. Appella, J. Kuratsu and E. J. Leonard (1989). "Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants." J Exp Med **169**(4): 1449-1459.
- Yoshimura, T., E. A. Robinson, S. Tanaka, E. Appella and E. J. Leonard (1989). "Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes." J Immunol **142**(6): 1956-1962.
- Young, H. A. and K. J. Hardy (1995). "Role of interferon-gamma in immune cell regulation." J Leukoc Biol **58**(4): 373-381.
- Zhang, D., Y. Liu, M. Shi, C. X. You, M. Cao, R. C. Luo and P. L. Hermonat (2010). "Autocrine, not paracrine, interferon-gamma gene delivery enhances ex vivo antigen-specific cytotoxic T lymphocyte stimulation and killing." J Biomed Biotechnol **2010**: 270985.
- Zhang, N., Z. Wang, X. Tang, H. Wang, H. Li, H. Huang, H. Bai and X. Yang (2010). "Type 1 T-cell responses in chlamydial lung infections are associated with local MIP-1alpha response." Cell Mol Immunol **7**(5): 355-360.

## **CAPITULO 6. ANEXOS**

**ANEXO I** – Tabela de resultados da caracterização fenotípica de subpopulações de células T CD8<sup>+</sup> com base na expressão de marcadores de superfície em doentes sem e com tratamento com MTX

<b>Populações de células T CD8<sup>+</sup>(%) (Mediana (Q1-Q3))</b>	<b>Doente AR <sub>S/MTX</sub></b>	<b>Doente AR <sub>C/MTX</sub></b>	<b>p-value</b>
<b>CD27+CD62L+CCR7<sup>+</sup></b>	72,650 (32,625 – 79,250)	73,300 (51,600 – 83,900)	0,023
<b>CD27+CD62L-CCR7<sup>-</sup></b>	92,650 (88,725 – 96,975)	79,600 (60,800 – 94,400)	0,004
<b>IL-17<sup>+</sup></b>	2,560 (0,642 – 18,125)	1,20 (0,292 – 7,522)	0,05

**ANEXO II** – Tabela de resultados de quantificação de citocinas humanas no soro de doentes de AR com diferente actividade da doença (Mediana (Q1-Q3))

<b>Citocinas (pg/ml)/ Mediana (Q1-Q3)</b>	<b>AR Remissiva (N=43)</b>	<b>AR Activa (N=28)</b>	<b>p-value</b>
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	4,9 (2,9 – 9,5)	7,6 (3,1 – 14,2)	NS
<b>IL-6</b>	0,4 (0,3 – 0,6)	0,5 (0,3 – 1,5)	NS
<b>IL-10</b>	1,7 (0,9 – 3,3)	2,7 (1,4 – 4,6)	0,052
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	3,7 (1,5 – 6,0)	4,7 (1,8 – 12,0)	NS
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	4,1 (2,7 – 7,9)	6,6 (2,2 – 18,0)	NS

**ANEXO III** - Tabela de resultados das correlações entre as concentrações das várias citocinas e quimiocinas no soro de doentes de AR

Correlação de	Coefficiente de Correlação de Pearson (r)	p-value
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>		
<i>IL-6</i>	0.330	0.002
<i>IL-8</i>	0.226	0.034
<i>IL-10</i>	0.985	0.000
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	0.935	0.000
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0.751	0.000
<i>MCP-1</i>	0.062	NS
<i>MIP-1<math>\alpha</math></i>	0.132	NS
<i>MIP-1<math>\beta</math></i>	0.316	0.003
<i>MIG</i>	0.031	NS
<b>IL-6</b>		
<i>IL-8</i>	0.256	0.016
<i>IL-10</i>	0.315	0.003
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	0.298	0.005
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	0.198	0.065
<i>MCP-1</i>	-0.011	NS
<i>MIP-1<math>\alpha</math></i>	0.209	0.055
<i>MIP-1<math>\beta</math></i>	0.062	NS
<i>MIG</i>	-0.033	NS
<b>IL-8</b>		
<i>IL-10</i>	0.231	0.031
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	0.289	0.006
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0.295	0.005
<i>MCP-1</i>	0.321	0.003
<i>MIP-1<math>\alpha</math></i>	0.348	0.001
<i>MIP-1<math>\beta</math></i>	0.406	0.000
<i>MIG</i>	0.032	NS
<b>IL-10</b>		
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	0.921	0.000
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0.737	0.000
<i>MCP-1</i>	0.065	NS
<i>MIP-1<math>\alpha</math></i>	0.169	NS
<i>MIP-1<math>\beta</math></i>	0.406	0.000
<i>MIG</i>	0.050	NS
<b>IL-1<math>\beta</math></b>		
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	0.893	0.000
<i>MCP-1</i>	0.036	NS
<i>MIP-1<math>\alpha</math></i>	0.432	0.000
<i>MIP-1<math>\beta</math></i>	0.250	0.020
<i>MIG</i>	0.061	NS