

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica



Laurindo Ferreira da Rocha Junior

**DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS DA VIA TH17 E DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DO NOVO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO
LPSF/TM17, AGONISTA DO PPAR γ , EM CÉLULAS DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE
REUMATOIDE**

Recife – 2013

LAURINDO FERREIRA DA ROCHA JUNIOR

**DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS DA VIA TH17 E DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DO NOVO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO
LPSF/TM17, AGONISTA DO PPAR γ , EM CÉLULAS DO SANGUE
PERIFÉRICO DE PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE
REUMATOIDE**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica da Universidade
Federal de Pernambuco, para a
obtenção do Título de Mestre em
Inovação Terapêutica.**

Orientadora:

Prof. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta - UFPE

Co-orientadora:

Prof. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte - HC/UFPE

Recife – 2013

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Rocha Júnior, Laurindo Ferreira da

Determinação de citocinas da via TH17 e da atividade imunomoduladora do novo derivado Tiazolidínico LPSF/TM17, agonista do PPAR γ , em células do sangue periférico de pacientes portadores de artrite reumatoide / Laurindo Ferreira da Rocha Júnior. – Recife: O Autor, 2013.

204 f.: il.

Orientadores: Maira Galdino da Rocha Pitta, Ângela Luzia Branco Pinto Duarte

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2013.

Inclui referências, anexos e apêndices

1. Artrite reumatoide 2. Tiazóis 3. Terapêutica I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orient.) II. Duarte, Ângela Luzia Branco Pinto (coorient.) III. Título.

616.7227
247

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-

Laurindo Ferreira da Rocha Junior

**DETERMINAÇÃO DE CITOCINAS DA VIA TH17 E DA ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DO NOVO DERIVADO TIAZOLIDÍNICO LPSF/TM17,
AGONISTA DO PPAR γ , EM CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES PORTADORES DE ARTRITE REUMATOIDE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte
dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovado em 07/02/2013

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a.: Maira Galdino da Rocha Pitta (orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: -----

Prof^a. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Assinatura: -----

Prof^a Dr^a Cláudia Diniz Lopes Marques
Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: -----

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR:

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR:

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO:

Prof. Francisco de Souza Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Prof^ª. Maria Eduarda Lacerda Larrazábal da Silva

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

Prof^ª. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO
TERAPÊUTICA:**

Prof César Augusto Souza de Andrade

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
INOVAÇÃO TERAPÊUTICA:**

Prof Luiz Alberto Lira Soares

DEDICATÓRIA

Às duas grandes mulheres e mães, Alzenira Moreira de Amorim e Suely Lins Galdino(In memorian), exemplos de caráter e dedicação aos seus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A família querida que entendeu (ou pelo menos tentou) os momentos de ausência para realização desse trabalho: Alzi, Lili, Laurinha, Christianne e Laurindo.

A grande orientadora e amiga Maíra Galdino da Rocha Pitta que me ensinou muito na elaboração desse trabalho, principalmente a transformar os momentos de adversidade em força de vontade.

Ao grande amigo e sócio Evandro Brito por todos os momentos em que me ajudou durante a minha construção como pesquisador e por todas as vezes que quebrou os meus galhos em outros hospitais fazendo esse trabalho possível.

A Dra. Ângela Duarte pela co-orientação, por todas as oportunidades concebidas e pela confiança ao me propor ser médico pioneiro no Curso de Mestrado do PPGIT.

Aos grandes amigos e colegas Andréa Dantas e Henrique Mariz por todos os momentos divertidos no ambulatório de pesquisa e momentos de desabafo e ajuda ao próximo também.

Ao grande amigo Moacyr Rêgo que me ensinou muito e foi bastante paciente comigo em vários momentos da minha formação

Aos pacientes, sem os quais seria impossível a realização desse trabalho.

A toda a equipe do LINAT que foi onipresente na realização dos experimentos desse trabalho e que me ensinou muito sobre bancada e convivência também.

A todo o corpo docente do PPGIT que mostrou que se cada um fizer a sua parte o resultado final é bastante relevante.

A todos os funcionários do Hospital das Clínicas, a Paulo Germano e Terezinha pela disponibilidade.

A todos os colegas reumatologistas do Hospital das Clínicas: Dra. Ângela, Dra. Fátima, Dra. Cláudia, Dr. Fernando, Aline, Nara, Andréa, Henrique, Alexandre, Sérgio, Dra. Lilian, Rafaela, Bárbara e André, pelo trabalho e dedicação em conjunto.

A Mariana Brayner e Michelly Pereira que ajudaram de forma imprescindível.

Ao grupo de clínica médica do Hospital São Marcos que me cobriu em momentos de ausência para realização desse trabalho: Evandro Brito, Marcos Almeida, Andréa Simone e Alice Ibiapina.

Aos colegas discentes do PPGIT pelos momentos de descontração e coletividade durante as aulas.

A todos os meus amigos que não vejo há muito tempo por estar imbuído de minha construção como profissional.

A professora e minha paciente Maria do Carmo Alves de Lima, a Nena, a mãe das moléculas e professora, paciente, amiga do peito.

A família Pitta: Maíra, Professor Ivan, Marina, Raíssa e a inesquecível professora Suely Lins Galdino, por me mostrarem o mundo da pesquisa e o mundo da pesquisa em família.

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória sistêmica que tem como característica principal o acometimento articular. As citocinas estão diretamente implicadas na patogênese da AR. Este trabalho objetivou determinar os níveis de citocinas da via Th17, particularmente IL-17A e IL-22 e correlacionar seus níveis séricos com dados clínicos, demográficos, radiológicos e laboratoriais de pacientes com AR, bem como avaliar a atividade imunomoduladora do novo derivado tiazolidínico LPSF/TM17. Os pacientes foram provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A coleta de dados clínico-demográficos foi realizada por questionário específico e os pacientes que preencheram os critérios de inclusão realizaram coleta do sangue periférico. A quantificação de citocinas foi realizada em 83 pacientes e 30 controles saudáveis por ELISA. Os níveis de IL-22 mostraram-se aumentados nos pacientes (média 432,37 pg/ml) quando comparados aos controles (67,45 pg/ml), $p < 0,001$. Houve correlação da IL-22 com os índices clínicos de atividade de doença DAS28 ($p = 0.037$) e CDAI ($p = 0.013$). Houve correlação dos níveis desta citocina com a presença de erosões radiográficas ($p = 0.0001$) e com a presença do autoanticorpo fator reumatoide ($p = 0.001$). Visando avaliar o efeito imunomodulador do LPSF/TM17, foram dosadas citocinas em sobrenadantes de culturas de células mononucleares periféricas após estimulação com PMA e Ionomicina de parte destes pacientes com AR (IFN γ , IL-17A, IL-6 e IL-22). O LPSF/TM17 inibiu significativamente a produção de IFN γ na concentração de 100 μ M e de IL-17A e IL-22 nas concentrações de 1, 10 e 100 μ M ($p < 0,05$). Este estudo foi pioneiro em associar os níveis de IL-22 com a gravidade da doença implicando importante papel desta citocina na patogênese da AR. O presente estudo mostrou a associação da IL-22 na patogênese da AR e que, nessa doença, o LPSF/TM17 pode ser importante na abordagem terapêutica, uma vez que inibiu citocinas envolvidas na doença (IFN γ , IL-17^a e IL-22).

Palavras-chave: Artrite reumatoide, derivado tiazolidínico, CDAI, DAS28, interleucina-22, interleucina-17A.

ABSTRACT

Rheumatoid Arthritis (RA) is an inflammatory systemic autoimmune disease with joint involvement as main clinical feature. Cytokines are directed implicated in RA pathogenesis. This study aimed to assess the cytokine profile of Th17 pathway, particularly IL-17A and IL-22 as well as correlate these cytokines serum levels with clinical, demographic, radiographic e laboratory data from patients with Rheumatoid Arthritis (RA) and we also evaluated the immunomodulatory activity of the new thiazolidinedione LPSF/TM17. The patients were recruited at Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Clinical and demographic data were recorded in standard questionnaire and patients who fulfilled the inclusion criteria had their blood collected. Cytokines were assayed with ELISA in 83 RA patients and 30 healthy controls. IL-22 levels were increased in patients with RA compared with controls (mean 432.37 pg/ml and 67.45 pg/ml, respectively; $p < 0.001$). Levels of IL-22 correlated with the composites indices of disease activity DAS28 ($p=0.037$) and CDAI ($p=0.013$). Rheumatoid factor (RF) positivity and the presence of bone erosions correlated with higher levels of IL-22 in patients with RA, $p=0.001$ and $p=0.0001$, respectively. The immunomodulatory effect of LPSF/TM17 was assessed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from RA patients after cytokines assays (IFN γ , IL-17A e IL-22) in culture supernatants after stimulation with PMA and Ionomycin. This was the first study to associate IL-22 serum levels with disease severity suggesting an important role of this cytokine in RA pathogenesis. Importantly, LPSF/TM17 significantly inhibited IFN γ production in the concentration of 100 μ M and induced lower levels of IL-17A and IL-22 in the concentrations of 1, 10 and 100 μ M ($p<0,05$). The role of the thiazolidinediones, synthetics agonists of PPAR γ , in RA and in other autoimmune diseases has been described suggesting that these compounds may be of great importance in the therapeutic approach of these diseases.

Key words: Rheumatoid Arthritis, thiazolidinedione, CDAI, DAS28, interleukin-22, interleukin-17A.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Deformidades típicas de Artrite Reumatoide: desvio ulnar de quirodáctilos (resultantes do deslocamento dos tendões extensores dos dedos e subluxações das metacarpofalangeanas), deformidade em “botoeira”(flexão das articulações interfalangeanas proximais e hiperextensão das interfalangeanas distais), nódulos reumatoides e atrofia de musculatura interóssea palmar em mão esquerda de paciente com artrite reumatoide atendido no Ambulatório de Reumatologia do HC-UFPE (reproduzido com a permissão do paciente). 27
- FIGURA 2: Sinovite de joelhos bilateral mais evidente à direita em paciente com artrite reumatoide severa. Observa-se atrofia de músculo quadríceps (reproduzido com a permissão do paciente). 27
- FIGURA 3: Nódulo reumatoide em cotovelo esquerdo de paciente com AR atendido no Ambulatório de Reumatologia do HC-UFPE (reproduzido com a permissão do paciente). 28
- FIGURA 4: Principais mecanismos envolvidos na etiopatogênese da artrite reumatoide. Adaptado de McInnes & Schett(2011) 33
- FIGURA 5. A articulação normal (a) e articulação na AR (b). Adaptado de Smolen et al. (2003) 35
- FIGURA 6: Principais fenótipos celulares CD4+ e expressão de citocinas na AR. Adaptado de Scherer & Burmester (2011) 44
- FIGURA7: Estrutura química da tiazolidina-2,4-diona 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios do Colégio Americano de Reumatologia 1987 para classificação da artrite reumatoide	30
Tabela 2: Critérios classificatórios para AR 2012 ACR/ EULAR	31
Tabela 3: Cálculo e valor total dos índices compostos da atividade de doença (ICAD)	48
Tabela 4: Pontos de corte dos índices compostos de acordo com a atividade de AR	49
Tabela 5: Ligantes do PPAR γ	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACPA – anticorpo anti-proteínas citrulinadas, do inglês *anti-citrullinated protein/peptide antibodies*

ACR – Colégio Americano de Reumatologia, do inglês *American College of Rheumatology*

AHR – receptor aryl hidrocarbono, do inglês *aryl hydrocarbon receptor*

Anti-CCP – anticorpo antipeptídeo citrulinado cíclico, do inglês *anti-cyclic citrullinated peptide antibody*

AR – artrite reumatoide

BAFF – fator ativador de células B, do inglês *B cell activating factor*

BCR – receptor de células B, do inglês *B cell receptor*

Blys – fator estimulador de linfócitos B, do inglês *B lymphocyte stimulator*

CDAI – Índice Clínico de Atividade de doença, do inglês *clinical disease activity index*

CIA – artrite induzida por colágeno, do inglês *collagen induced arthritis*

COX – ciclooxigenase

DAMP – padrão molecular de reconhecimento de perigo, do inglês *danger-associated molecular*

DAS28 – Escore de Atividade de Doença em 28 articulações, do inglês *disease activity score 28 joints*

DMCD – droga modificadora do curso de doença

EULAR – Liga Europeia contra o Reumatismo, do inglês *European League against Rheumatism*

FR – fator reumatoide

HLA – antígeno leucocitário humano, do inglês *human leucocyte antigen*

IFN – interferon

Ig – imunoglobulina

LINAT - Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas

LPSF – Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos

MHC – complexo de histocompatibilidade maior, do inglês *major histocompatibility complex*

MMP – metaloproteinase de matriz, do inglês *matrix metalloproteinase*

NLR – receptores semelhantes a NOD, do inglês *NOD-like receptors*

PADI - peptil arginina deaminase, do inglês *peptidylarginine deiminase*

PAMP – padrão molecular de reconhecimento de patógeno, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*

PCR – proteína C reativa

PPAR – receptor ativado por proliferadores de peroxissoma, do inglês *peroxisome Proliferator-Activated Receptor*

ROS – espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*

RT-PCR – Reação de cadeia de polimerase por transcriptase reversa, do inglês *reverse-transcription polimerase chain reaction*

STAT – proteínas ativadoras e transdutoras de sinal de transcrição, do inglês *signal transducer and activator transcription*

TGF – fator de transformação de crescimento, do inglês *transforming growth factor*

Th – T auxiliar, do inglês *T helper*

TLR – receptores semelhantes a Toll, do inglês *Toll-like receptors*

TNF – fator de necrose tumoral, do inglês *tumour necrosis factor*

Treg – T regulatórias

VHS – velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	23
2.1	Geral	24
2.2	Específicos	24
3	REVISÃO DE LITERATURA	25
3.1	Artrite reumatoide – Conceito	26
3.2	Epidemiologia da Artrite Reumatoide	28
3.3	Fisiopatogênese da Artrite Reumatoide	31
3.3.1.	Fatores genéticos e ambientais	31
3.4	A artrite reumatoide e o sistema imune	34
3.4.1	Imunidade inata	35
3.4.2	Imunidade adaptativa	37
3.4.2.1.	O fenótipo Th1 e Th2	37
3.4.2.2.	O fenótipo Th17	39
3.4.2.3.	O fenótipo Th22 e a interleucina-22	41
3.5.	As células B e formação de autoanticorpos	44
3.6.	Diagnóstico e acompanhamento	47
3.7.	Alvos terapêuticos	49
3.8.	Os agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gamma (PPAR γ)	51
3.9.	PPAR γ na artrite reumatoide	54
4.	METODOLOGIA	58
4.1.	População do estudo	59
4.2.	Animais	59

4.3.	Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)	59
4.4.	Preparação e cultura de esplenócitos	60
4.5.	Cultura de PBMCs	60
4.6.	Quantificação dos níveis de citocinas	61
4.7.	Método MTT	61
4.8.	Quantificação da expressão gênica por RT-PCR	61
4.8.1	Detecção e quantificação das citocinas em PBMCs	61
4.8.2	Purificação do RNA	62
4.8.3	Ensaio de transcrição reversa	62
4.8.4	Avaliação da expressão do RNAm para as citocinas (PCR em tempo real)	63
4.9.	Análise estatística	64
5.	RESULTADOS	65
5.1	Artigo I	66
5.2	Artigo II	93
5.3	Artigo III	112
5.4	Artigo IV	117
6	DISCUSSÃO	138
7	CONCLUSÕES	149
8	PERSPECTIVAS	151
	REFERÊNCIAS	153
	APÊNDICE	187
	Ficha clínica	188
	Pareceres	195
	Espectros do LPSF/TM17	197
	ANEXO	199

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As doenças reumatológicas compreendem um amplo grupo de diferentes condições. A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória sistêmica que acomete até 1% da população, leva a destruição das articulações e pode causar sintomas extra-articulares (LIAO& KARLSON, 2011). A AR está associada a importante morbidade, incapacidade e mortalidade (FIRESTEIN, 2003).

A etiologia da AR é desconhecida, entretanto fatores genéticos e ambientais contribuem para o desenvolvimento da doença (MCINNES& SCHETT, 2011). A patogênese da AR é bastante complexa. É bem reconhecido que o sistema imune é uma ferramenta poderosa na defesa contra micro-organismos e substâncias que podem causar dano tecidual. De maneira geral, o sistema imune é capaz de reconhecer patógenos invasores e seus produtos assim como sinais endógenos de perigo e eliminá-los sem causar danos ao hospedeiro(JANEWAY, 2001). Defeitos em regular a inflamação levam a resposta excessiva do sistema imune e a doenças autoimunes como a AR. Células B, células T e a interação de citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis importantes na fisiopatologia da doença. Numerosas citocinas são expressas e funcionalmente ativas nos tecidos sinoviais.As citocinas funcionam como uma complexa rede de interações relacionadas a mecanismos imunológicos específicos que promovem autoimunidade, inflamação crônica e destruição tecidual(MCINNES & SCHETT, 2007).

A presença de autoanticorpos, estruturas semelhantes a centros germinativos na sinóvia reumatoide e alterações de células B reforçam o papel das células B na patogênese da AR. Além disso, funcionam como células apresentadoras de antígeno, secretam citocinas de forma abundante e expressam receptores semelhantes a Toll (*toll-like receptors*), tais receptores são capazes de reconhecer "sinais de perigo", mecanismo importante da imunidade inata (DORNER, JACOBI & LIPSKY, 2009;SCHERER& BURMESTER, 2011).

Células T efetoras autorreativas também estão implicadas no desenvolvimento da AR. A membrana sinovial inflamada é rica principalmente em células CD4+ T *helper* (Th). Essas células são divididas em subpopulações baseadas no fator de transcrição e citocinas que expressam (SCHERER & BURMESTER, 2011). Subtipos celulares com potencial relevância na patogênese da AR incluem as células Th1, Th17, células T regulatórias (Treg) e recentemente, tem sido descrito o fenótipo Th22 (LUNDY et al., 2007;ZHANG et al., 2011a). O progresso da melhor compreensão da patogênese da AR tem levado a um melhor manejo farmacológico da doença e melhor prognóstico para os pacientes. Atualmente a abordagem farmacológica tem como alvo terapêutico remissão ou atividade leve da doença e na prática clínica diária a avaliação dos pacientes pode ser feita através dos índices compostos de atividade CDAI e DAS28. Tais índices facilitam os cuidados com o paciente e permitem avaliar a terapia instituída de forma objetiva (PREVOO et al., 1995;ALETAHA et al., 2005). A terapia medicamentosa da AR, atualmente inclui um grupo de drogas chamadas *drogas modificadoras de curso de doença* (DMCD), que incluem DMCDs sintéticas e biológicas (DA MOTA et al., 2012). Entretanto, apesar de um perfil de eficácia favorável das terapias atuais, existem ainda vários desafios clínicos, particularmente para os pacientes que apresentam eventos adversos ou não respondem a terapia instituída. Além disso, as DMCDs biológicas, embora terapias promissoras, tem importante ação imunomoduladora e estão associadas a um maior risco de infecção,além do custo financeiro bastante elevado(CHOY, 2012; RUBBERT-ROTH, 2012;FURST et al., 2012; SINGH et al., 2012).

Estudos recentes tem destacado as propriedades anti-inflamatórias dos agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gamma (PPAR γ) em modelos experimentais de artrite e em diversas células que participam da cascata inflamatória(JIANG, TING & SEED 1998; RICOTE et al., 1998; KAWAHITO et al., 2000; SHIOJIRI et al., 2002; CUZZOCREA et al., 2003;AMORUSO et al., 2007). A expressão do PPAR γ nas articulações tem sido descrita(JI et al., 2001). Os agonistas do PPAR γ , em nível celular, inibem

a indução transcricional de genes que contribuem para a patologia articular (GIAGINIS, GIAGINI & THEOCHARIS, 2009).

As tiazolidinadonas ou derivados tiazolidínicos são agonistas sintéticos do PPAR γ e atualmente tem sido usadas no tratamento do diabetes melito tipo 2 (CARIOU, CHARBONNEL & STAELS, 2012). Recentemente tem sido objeto de pesquisa como alvo terapêutico *in vitro* e *ex vivo* em doenças inflamatórias e autoimunes como a AR (PALMA et al., 2012). O Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco vem investigando novos derivados tiazolidínicos para o tratamento destas doenças. O TM17 é uma tiazolidinediona recentemente sintetizada no LPSF da UFPE e é parte do escopo deste trabalho com foco em sua ação imunomoduladora na expressão de citocinas envolvidas na AR.

No decorrer do desenvolvimento desta dissertação foram elaborados 4 artigos, que se encontram anexos nos resultados. O primeiro artigo, intitulado PPAR- γ AGONISTS IN ADAPTIVE IMMUNITY: INTERPLAY WITH T AND B CELLS é um artigo de revisão e foi preparado a convite dos editores do periódico *PPAR Research*. Tem como objetivo descrever a relação dos agonistas do PPAR γ com a imunidade adaptativa e destacar seu importante papel na ativação, sobrevivência e diferenciação das células T e interface com os linfócitos B. Assim como também relatar a importância desses agonistas na expressão de citocinas importantes para as subpopulações celulares implicadas na patogênese de doenças autoimunes Th1 (IFN γ , IL-2 e IL-12), Th17 (IL17, IL-21, IL-22 e IL-23) e células T regulatórias.

O segundo artigo, publicado em julho de 2012 no *The Journal of Rheumatology*, intitulado “Increased Serum Interleukin 22 in Patients with Rheumatoid Arthritis and Correlation with Disease Activity” é resultado de trabalho em parceria entre o Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas (HC) e o Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) da UFPE (DA ROCHA et al., 2012). Esse trabalho foi pioneiro em demonstrar a importância da interleucina-22 na patogênese da AR ao correlacionar seus níveis séricos com atividade de doença e associar níveis

mais altos com a presença do autoanticorpo fator reumatoide e erosões radiográficas. O impacto do trabalho chamou a atenção de um grupo chinês que ratificou o papel da IL-22 na AR em um elegante artigo publicado no formato de *Letter* na edição de novembro de 2012 do mesmo periódico (XIE, WANG & LI, 2012). A tréplica, que também se encontra anexa nessa dissertação, foi publicada na mesma edição, mais uma vez destacando o papel da IL-22 na fisiopatologia da doença (ROCHA JR ET AL, 2012).

O quarto trabalho objetivou avaliar a atividade imunomoduladora do derivado tiazolidínico LPSF/TM17 *in vitro* em pacientes com AR e demonstrou que esse composto diminuiu a expressão de citocinas importantes na patogênese da doença, incluindo a interleucina-22.

Diante disso, devido a melhor compreensão da patogênese da AR tem se evoluído bastante na busca de biomarcadores e em sua abordagem terapêutica. Os ligantes sintéticos agonistas, do PPAR γ são compostos que apresentam efeito promissor em seu tratamento, mas ainda pouco se sabe do potencial terapêutico desses compostos na AR. Desta forma, a presente dissertação teve como objetivo avaliar a implicação de citocinas da via TH17 envolvidas na patogênese da AR e a atividade imunomoduladora na expressão dessas citocinas do LPSF/TM17, agonista sintético do PPAR γ , derivado tiazolidínico sintetizado no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da UFPE.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desta dissertação foi determinar as citocinas da via Th17, IL22 e IL17A em pacientes portadores de AR e investigar a atividade imunomoduladora do novo derivado tiazolidinico LPSF/TM17 em células mononucleadas do sangue periférico destes pacientes.

2.2. Específicos

- I. Determinar níveis plasmáticos das citocinas IL-22 e IL17A no plasma de pacientes portadores de AR;
- II. Correlacionar os níveis plasmáticos dessas citocinas com os parâmetros clínicos de atividade da doença CDAI e DAS28, assim como com a presença de erosões radiográficas e com a presença do autoanticorpo fator reumatoide;
- III. Avaliação do efeito imunomodulador do LPSF/TM17 na expressão das citocinas IL-6, IL-17A, IL-22 e IFN γ em células mononucleadas do sangue periférico provenientes de pacientes portadores de AR.

REVISÃO DE LITERATURA

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Artrite reumatoide – Conceito

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica, progressiva, sistêmica e autoimune caracterizada por um quadro de poliartrite inflamatória e pode estar associada a sintomas extra-articulares (HOCHBERG, JOHNSTON & JOHN, 2008). Há produção de autoanticorpos e destruição óssea e articular proveniente da proliferação e inflamação da membrana sinovial (sinovite) (MCINNES& SCHETT, 2011). O quadro clínico característico é de dor, edema e calor articular com importante limitação dos movimentos. Eventualmente pode haver rubor local.

A AR inicia-se predominantemente como uma doença articular e uma ou mais articulações podem estar afetadas. É mais comum em pequenas articulações de mãos, punhos e pés (FIGURA 1). Geralmente o acometimento articular é simétrico (FIGURA 2) com importante rigidez matinal que pode durar de minutos a horas. Por ser uma doença sistêmica, pode apresentar sintomas constitucionais acompanhando ou precedendo os sintomas articulares como febre, astenia, fadiga, mialgia e perda ponderal (DA MOTA et al., 2011; WOOLF, 2003; BRASINGTON et al., 2012). As manifestações extra-articulares são mais observados em pacientes com doença grave e com sorologia positiva para o fator reumatoide (FR) ou anticorpos antipeptídeos citrulinados cíclicos (anti-CCP - do inglês, *anti-cyclic citrullinated peptide antibody*). Tais manifestações incluem quadros de vasculite cutânea, nódulos reumatóides (FIGURA 3), manifestações oculares, pleuropulmonares, cardíacas, hematológicas e neurológicas (TURESSON et al., 2007a; GOELDNER et al., 2011).



FIGURA 1. Deformidades típicas de Artrite Reumatoide: desvio ulnar de quirodáctilos (resultantes do deslocamento dos tendões extensores dos dedos e subluxações das metacarpofalangeanas), deformidade em “botoeira” (flexão das articulações interfalangeanas proximais e hiperextensão das interfalangeanas distais), nódulos reumatoides e atrofia de musculatura interóssea palmar em mão esquerda de paciente com artrite reumatoide atendido no Ambulatório de Reumatologia do HC-UFPE (reproduzido com a permissão do paciente).



FIGURA 2: Sinovite de joelhos bilateral mais evidente à direita em paciente com artrite reumatoide severa. Observa-se atrofia de músculo quadríceps. (reproduzido com a permissão do paciente)



FIGURA 3: Nódulo reumatoide em cotovelo esquerdo de paciente com AR atendido no Ambulatório de Reumatologia do HC-UFPE (reproduzido com a permissão do paciente).

A maior parte dos pacientes apresenta doença com curso flutuante e períodos de exacerbação e remissão. Com a progressão da doença há comprometimento das atividades de vida diária dos pacientes e incapacidade funcional de graus variáveis. Por seu caráter crônico e incapacitante pode levar a importante perda de qualidade de vida gerando custos diretos e indiretos para a sociedade (AZEVEDO, FERRAZ & CICONELLI, 2008). Além disso, pacientes com AR tem mais chances de desenvolver doenças associadas a um maior risco cardiovascular como *diabetes mellitus* e hipertensão arterial sistêmica (PEREIRA et al., 2012).

3.2. Epidemiologia da Artrite Reumatoide

Estimar a incidência e a prevalência da AR tem sido difícil devido a escassez de estudos com o número de amostra e metodologia adequadas. As taxas de incidência são maiores no Norte da Europa e América do Norte, comparadas ao sul da Europa. A incidência média observada foi de 29 casos

por 100 000 habitantes no norte da Europa, 38 casos por 100 000 habitantes na América do Norte, e 16,5 casos por 100 000 habitantes no sul da Europa (ALAMANOS, VOULGARI & DROSOS, 2006). No Brasil não há estudos sobre a incidência de AR. A prevalência da AR é bastante variável no mundo todo com valores entre 0,2% e 1,1%. Estudo seccional brasileiro publicado em 2004, com 3038 pessoas estimou a prevalência da AR no país de 0,46% (SENNA et al., 2004). A maioria dos estudos mostra uma maior frequência no sexo feminino com uma taxa de 2-3 mulheres com AR para cada homem (LIAO, 2011). A faixa etária mais acometida varia dos 35-65 anos (LOUZADA-JUNIOR et al., 2007; SYMMONS&CHAKRAVARTY, 1993). Esses estudos foram baseados nos critérios de classificação do *American College of Rheumatology (ACR)* de 1987 (ARNETT et al., 1988)(TABELA 1). Com o desenvolvimento de novos critérios de classificação para AR em 2010 pelo *American College of Rheumatology(ACR)* e pela *European League Against Rheumatism (EULAR)* (ALETAHA et al., 2010)(TABELA 2). a incidência e prevalência da AR deve mudar visto que estes critérios são mais sensíveis. A mortalidade nos pacientes com AR é cerca de duas vezes maior que a população em geral (GONZALEZ et al., 2007) e, atualmente, já é bem estabelecido a associação da doença com maior risco cardiovascular (DEMARIA, 2002; SARZI-PUTTINI et al., 2010; KRAMER & GILES, 2011, SARMIENTO-MONROY et al., 2012).

Tabela 1

Critérios do Colégio Americano de Reumatologia 1987 para classificação da artrite reumatoide. Adaptado de Da Mota et al. (2011) e Arnett et al. (1988).

Critério	Definição
1) Rigidez Matinal	Rigidez matinal com duração de pelo menos 1 hora até a melhora máxima
2) Artrite de três ou mais áreas articulares	Ao menos três áreas articulares simultaneamente afetadas, observadas pelo médico (interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas, punhos, cotovelos, joelhos, tornozelos e metatarsofalangeanas)
3) Artrite das articulações das mãos	Artrite em punhos ou metacarpofalangeanas ou interfalangeanas proximais
4) Artrite simétrica	Envolvimento simultâneo de áreas de ambos os lados do corpo
5) Nódulos Reumatóides	Nódulos subcutâneos sobre proeminências ósseas, superfícies extensoras ou em regiões justa-articulares
6) Fator reumatoide sérico positivo	Presença de quantidades anormais de fator reumatoide
7) Alterações Radiográficas	Radiografias posteroanteriores de mãos e punhos demonstrando rarefação óssea justa-articular ou erosões

Para a classificação como artrite reumatoide, o paciente deve satisfazer a pelo menos 4 dos 7 critérios. Os critérios 1 até o 4 devem estar presentes, por no mínimo, 6 semanas. Adaptado de Da Mota et al. (2011) e Arnett et al. (1988).

Tabela 2

Critérios classificatórios para AR 2012 ACR/ EULAR

Adaptado de Da Mota et al. (2011) e Aletaha et al. (2010)

População-alvo (quem deve ser testado?)**Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema).*****Sinovite que não seja mais bem explicada por outra doença.*****Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes, um reumatologista deve ser consultado.****Acometimento articular (0-5)**

1 grande articulação	0
2 -10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações (grandes não contadas)	2
4-10 pequenas articulações (grandes não contadas)	3
>10 articulações (pelo menos uma pequena)	5

Sorologia (0-3)

FR negativo E ACPA negativo	0
FR positivo OU ACPA positivo em baixos títulos	2
FR positivo OU ACPA positivo em altos títulos	3

Duração dos sintomas (0-1)

<6 semanas	0
≥6 semanas	1

AProvas de atividade inflamatória (0-1)

PCR normal e VHS normal	0
PCR anormal OU VHS anormal	1

Pontuação maior ou igual a 6 é necessária para classificação definitiva de um paciente como AR. FR: fator reumatoide; ACPA: anticorpos antiproteínas e antipeptídeos citrulinados; PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação. Adaptado de Da Mota et al. (2011) e Aletaha et al. (2010)

3.3. Fisiopatogênese da Artrite Reumatoide**3.3.1. Fatores genéticos e ambientais**

A fisiopatogênese da AR é extremamente complexa e envolve uma interação de fatores genéticos e ambientais. Estudos com gêmeos corroboram a participação dos fatores genéticos na doença visto que há uma maior concordância nessa população (MACGREGOR et al., 2000). A associação da AR com o antígeno leucocitário humano (HLA)-DRB1 em pacientes com FR ou anticorpos antipeptídeos e proteínas citrulinados (ACPA) é bem documentada assim como uma maior susceptibilidade em pacientes que possuem uma sequência de aminoácidos no HLA-DRB1 chamada de epítipo compartilhado

(WEYAND & GORONZY, 1990; DE ALMEIDA et al., 2010). A associação da AR com HLA sugere que, alterações na apresentação de antígeno ou afinidade de peptídeo ou disfunção na seleção células T, têm papel importante em promover repostas adaptativas autorreativas implicadas na patogênese da doença. Outros *loci* associados a AR incluem *PTPN22*, *STAT4*, *TRAF1-C5* e *TNFAIP3* mas são responsáveis apenas por 3-5% da carga genética da AR (PLENGE, 2009).

Fatores ambientais como tabagismo e infecções também podem influenciar o desenvolvimento, a progressão e severidade da AR (KLARESKOG et al., 2007; GETTS & MILLE, 2010). O tabagismo e outras formas de estresse em brônquios, como a exposição a sílica, aumentam o risco de desenvolvimento da doença entre pessoas com os alelos de susceptibilidade HLA-DRB1 (SYMMONS et al., 1997). O tabaco nesses indivíduos aumentou o risco de desenvolver ACPA (KLARESKOG et al., 2006). O tabagismo está possivelmente associada a modificações pós-translacionais, através da peptil arginina deaminase tipo IV (PADI4), que resulta em uma alteração quantitativa ou qualitativa na citrulinização de proteínas da mucosa levando à formação destes autoanticorpos (MCINNES & SCHETT, 2011). Agentes infecciosos como o vírus Epstein-Barr, citomegalovírus, proteus e *Escherichia coli* e seus produtos têm sido associados com AR. Embora com mecanismos ainda pouco elucidados, alguns autores postulam que o mimetismo molecular possa estar associado a esses fatores. A formação de imunocomplexos durante o processo infeccioso desencadeia a formação do fator reumatoide, um autoanticorpo de alta afinidade contra a porção Fc da imunoglobulina. O envolvimento desse autoanticorpo na AR já é bem estabelecido, assim como seu envolvimento na patogênese da doença (FIRESTEIN, 2003; MCINNES & SCHETT, 2007). Adicionalmente, a AR e formação de ACPA tem sido associada a doença periodontal, particularmente a periodontite associada a infecção pela bactéria *Porphyromonas gingivalis* (WEGNER et al., 2010). Bactérias da flora intestinal também influenciam o surgimento de autoimunidade em modelos animais de artrite e seu papel tem sido melhor estabelecido atualmente (SCHER et al., 2010). A figura 4 demonstra os principais eventos envolvidos na patogênese da AR:

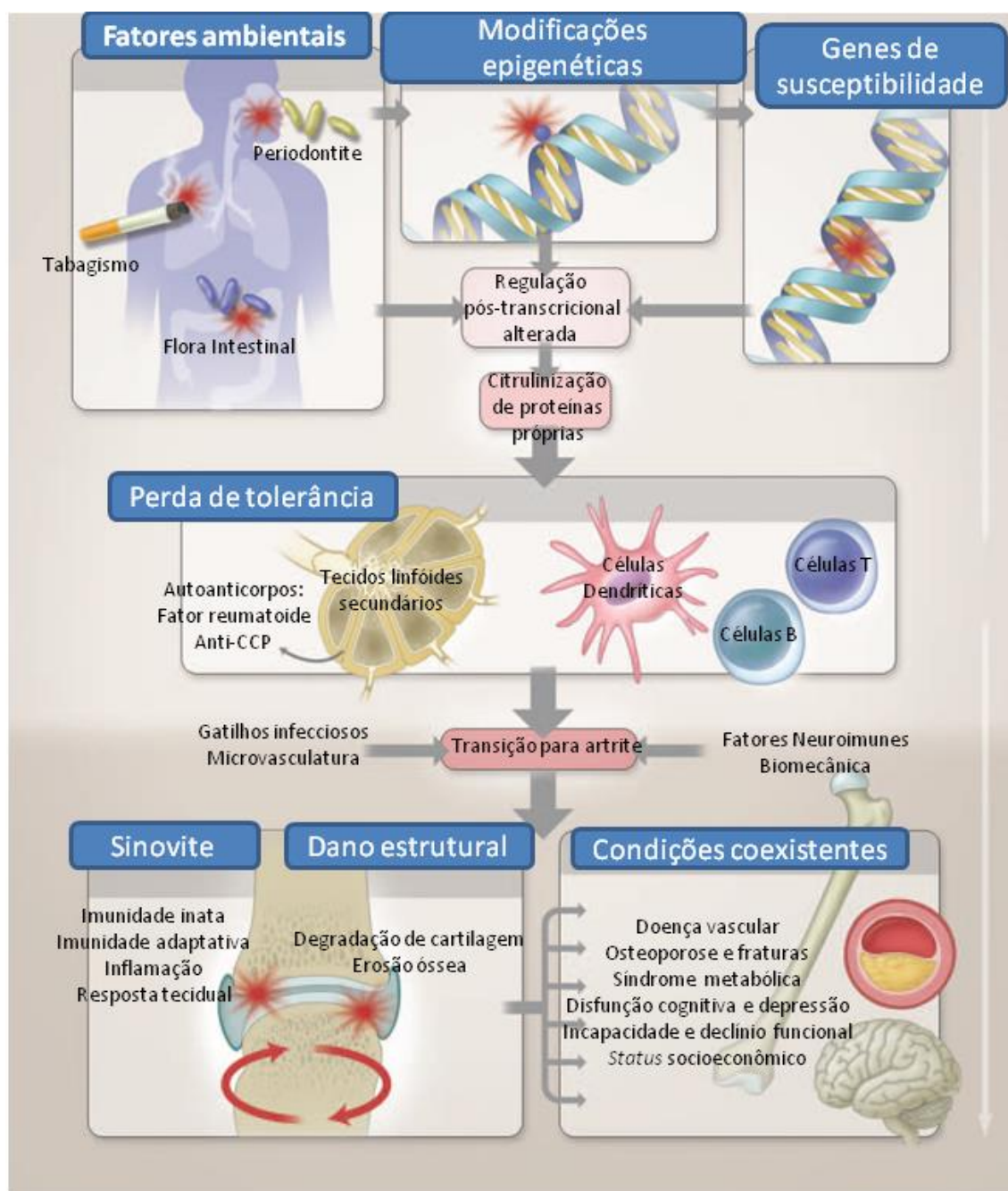


FIGURA 4: Principais mecanismos envolvidos na etiopatogênese da artrite reumatoide. Adaptado de McInnes & Schett (2011)

Os fatores genéticos e a presença de autoanticorpos colocam a imunidade adaptativa como foco central na patogênese da doença. Embora o número de células T seja abundante no tecido sinovial, seu papel ainda é pouco compreendido visto que, terapias depletoras de células T tem mostrado eficácia limitada. Tais achados refletem uma maior necessidade de melhor

compreensão dos subtipos de células T efectoras existentes assim como das células T regulatórias (PANAYI, 2006).

3.4. A artrite reumatoide e o sistema imune

Vários imunomoduladores (citocinas e células efectoras do sistema imune) e vias de sinalização estão envolvidos na patogênese da AR (SMOLEN et al., 2003). A interação complexa dos moduladores do sistema imune é responsável pelo dano articular que tem início na membrana sinovial e envolve todas as estruturas articulares. Sinovite é causada pelo influxo e/ou ativação local de células mononucleares (células T, células B, plasmócitos, células dendríticas, macrófagos e mastócitos) e angiogênese (FIGURA 5). Há aumento da expressão das moléculas de adesão e quimiocinas (SZEKANECZ et al., 2009). Essas alterações que ocorrem combinadas com reorganização profunda da arquitetura da sinóvia e ativação de fibroblastos locais permitem o desenvolvimento do processo inflamatório sinovial da AR. A camada sinovial interna torna-se hiperplásica e a membrana sinovial se expande e forma vilosidades. O tecido hiperplásico rico em osteoclastos é chamado de *pannuss* sendo responsável pela destruição óssea. As enzimas secretadas por neutrófilos, sinoviócitos e condrócitos degradam a cartilagem (MCINNES & SCHETT, 2007).

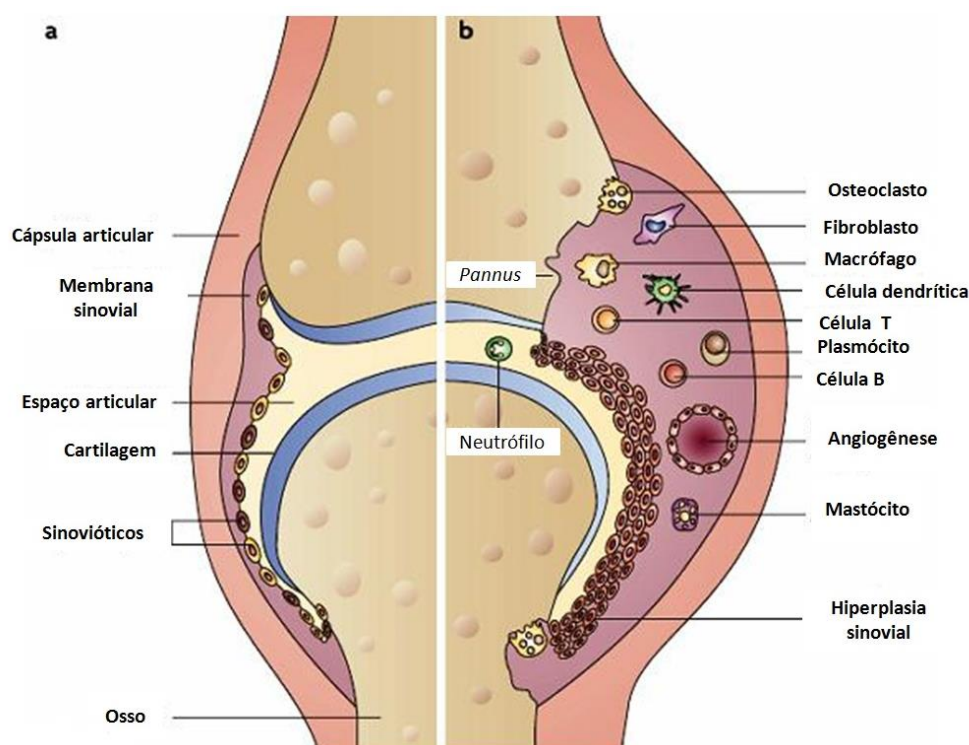


FIGURA5. A articulação normal (a) e articulação na AR (b). Adaptado de Smolen et al. (2003)

3.4.1. Imunidade inata

O evento inicial na patogênese da AR é a ativação da resposta imune inata. Há ativação de células dendríticas por material exógeno e antígenos autólogos (SMOLEN et al., 2003; SMOLEN et al., 2010). Células apresentadoras de antígeno (células dendríticas, macrófagos e células B) ativadas apresentam antígenos associados a artrite para as células T e estas desenvolvem seus mecanismos efetores de imunidade. Durante a progressão da AR a produção de citocinas, quimiocinas e metaloproteínas de matriz (MMP) também é oriunda da imunidade inata e leva a destruição óssea e articular (DREXLER et al., 2008). Os macrófagos desempenham papel fundamental na doença e estão presentes na sinóvia na AR em maior quantidade. O fator de necrose tumoral (TNF) é produzido principalmente por macrófagos (FELDMANN, BRENNAN & MAINI, 1996). O fator de transformação de crescimento (TGF) β e interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-1 e IL-23, derivados de macrófagos e células dendríticas favorecem um meio que auxilia na diferenciação das células Th1, Th17 e suprime a diferenciação das células T

regulatórias levando ao desequilíbrio da homeostase e inflamação (MCINNES & SCHETT, 2011). A ativação de macrófagos e fibroblastos mediada por contato com a célula-T leva a interações entre o CD40 e o ligante do CD40, entre o CD200 e o ligante do CD200 e entre a molécula de adesão intracelular tipo 1 e o antígeno associado a função leucocitária tipo 1 (MCINNES, LEUNG & LIEW, 2000; CHAKERA et al., 2012). A sinóvia reumatoide contém células dendríticas plasmocitoides e mieloides abundantes que expressam IL-12, 15, 18 e 23, moléculas do HLA classe II e moléculas co-estimulatórias que são necessárias para a ativação de células T e apresentação de antígenos (LEBRE et al., 2008; SCHRODER et al., 1996).

Adicionalmente, em articulações de pacientes com AR há evidência abundante para a presença de imunocomplexos e ativação do sistema complemento, contribuindo para a patogênese da doença. Os imunocomplexos ligam-se aos receptores Fcγ, e são capazes de ativar macrófagos e células dendríticas. Os receptores Fc são moléculas presentes na superfície de células mieloides e células B que são capazes de interagir com a porção Fc das moléculas de imunoglobulina. Esses receptores auxiliam na relação entre respostas adaptativa e inata e funcionam como mediadores de ativação e inibição de células efectoras, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e liberação de mediadores inflamatórios (GIERUT, PERLMAN & POPE, 2010).

A ativação persistente de macrófagos na AR está relacionada a expressão de ligantes endógenos dos receptores semelhantes a *Toll* (TLR, do inglês *toll like receptors*), que são regulados de forma positiva na AR. Muitos destes receptores estão expressos em tecido sinovial reumatoide e em cultura de fibroblastos sinoviais e tem sido associado a AR, incluindo TLR2, TLR3, TLR4 e TLR7 (GIERUT, PERLMAN & POPE, 2010).

Outras células da imunidade inata que estão envolvidas na patogênese da AR incluem os neutrófilos (EDWARDS & HALLETT, 1997), mastócitos (WOOLEY, 2003) e células *natural killer* (NK) (SCHERER & BURMESTER, 2011). Estas células estão presentes em grande quantidade e amplamente distribuídas no tecido e líquido sinoviais. São capazes de produzir várias citocinas que estão envolvidas na patogênese da AR, mas sua contribuição

para a patogênese da doença ainda é pouco compreendida (DREXLER et al., 2008).

Os inflamassomas são complexos multiproteicos que consistem de proteínas de receptores citosólicos (NLRs, do inglês *NOD-like receptors*) sensíveis a padrões de reconhecimento de patógeno e sinais de perigo (PAMPs e DAMPs, do inglês, *pathogen-associated molecular patterns* e *danger-associated molecular patterns*, respectivamente), uma molécula adaptadora e a caspase 1. O inflamassoma está associado a ativação, em macrófagos, da pró-IL1 β e pró-IL18 em suas formas bioativas pela caspase 1. As formas bioativas são as citocinas ativas IL1 β e IL18 e são liberadas pela célula quando formadas. Uma proteína NLR que tem sido bem descrita é a NALP3. A NALP3 está expressa na articulação de pacientes com AR e um estudo mostrou que níveis de mRNA de NALP3 estavam aumentados na sinóvia reumatoide comparado a sinóvia de pacientes com osteoartrite (ROSENGREN et al., 2004). Por outro lado, outro estudo mostrou não haver diferença na expressão de NALP3 na sinóvia da AR e da osteoartrite através da análise densitométrica por *Western blotting* (KOLLY et al., 2009). Desta forma, estudos adicionais para elucidar o papel do inflamassoma na patogênese da AR são necessários.

3.4.2. Imunidade adaptativa

3.4.2.1. O fenótipo Th1 e Th2

Inicialmente a AR era considerada uma doença mediada por células T helper tipo 1 (Th1). As células Th1 expressam citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-2, interferon γ (INF γ), linfotóxina β e fator de necrose tumoral (TNF) (MCINNES & SCHETT, 2007). Estão associadas a ativação de macrófagos, estimulando sua função fagocítica e aumentando sua capacidade de função na apresentação de antígeno pela regulação de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) tipo II. As células Th1 auxiliam a fixação de complemento, opsonização de anticorpos e indução de anticorpos envolvidos na citotoxicidade mediada por células dependente de

anticorpos, consequentemente envolvidas na imunidade celular (SCHULZE-KOOPS & KALDEN, 2001). A maturação das células Th1 é controlada pela IL-12 e o fator de transcrição T-bet. O IFN- γ é a citocina principal da via Th1. Durante a diferenciação da via Th1, a IL-12 sinaliza via IL-12R/STAT4 induzindo a expressão de IFN- γ , o IFN- γ secretado sinaliza via IFN- γ R/STAT1 para aumentar ainda mais os níveis de IFN- γ , deste modo formando uma autorregulação da própria via. As proteínas transdutoras e ativadoras de sinal (*signal transducer and activator* - STAT) STAT1 and STAT4 induzem a expressão do fator de transcrição específico da via Th1. (BOWEN et al., 2008; MCINNES & SCHETT, 2011; CHOI & BOTHWELL, 2012).

De início, a AR era caracterizada como uma doença na qual havia um desequilíbrio de citocinas inflamatórias da via Th1 e de citocinas anti-inflamatórias da via Th2. O IFN- γ mostrou-se inicialmente patogênico em camundongos na artrite induzida por colágeno, na qual se relatou que a administração de IFN- γ aumenta a severidade da artrite (MAURITZ et al., 1998; COOPER, 1998). Dessa forma, a AR era considerada ser induzida pelo fenótipo Th1. Entretanto, outros estudos posteriormente publicados falharam em estabelecer o papel do fenótipo Th1 em todos os mecanismos envolvidos na artrite e alguns apresentaram resultados paradoxais para o IFN- γ . Essa citocina melhora a artrite em camundongos e promove surtos de inflamação articular em camundongos saudáveis (BOISSIER et al., 2008). Concentrações de IFN- γ no líquido sinovial foram detectadas em baixas quantidades em comparação com outras citocinas já detectadas em maior quantidade, como a IL-1 e o TNF- α . Além disso, células T CD4⁺ IFN- γ ⁺, detectadas por imunocitoquímica, estavam presentes em número pequeno. Uma baixa proporção de células T secretoras de IFN- γ é encontrada no modelo experimental murino de artrite induzida por colágeno. Anticorpos monoclonais anti- IFN- γ não se mostraram eficazes na maioria dos pacientes (MANOURY-SCHWARTZ et al., 1997). Tais achados levaram a busca de outros mecanismos e subpopulações celulares envolvidos na patogênese da doença e descoberta de outro subtipo celular, as células Th17.

3.4.2.2. O fenótipo Th17

Recentemente tem sido identificados outros subtipos celulares envolvidos na patogênese da doença. O papel do subtipo Th17 foi recentemente implicado na patogênese da AR e de outras doenças inflamatórias imunomediadas (NALBANDIAN, CRISPIN & TSOKOS, 2006; CHABAUD et al., 1998; MIOSSEC, KORN & KUCHROO, 2009). Esse fenótipo celular é caracterizado pela produção de IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-26 IL-23R e quimiocinas como o CCL20. A diferenciação das células Th17 é regulada pelo STAT3 e pelo receptor órfão γ t relacionado ao ácido retinoico (ROR γ t), e pelo receptor aryl hidrocarbaono (AHR). É induzida pelo fator transformador de crescimento (TGF)- β (TGF), IL-1 e IL-6; IL-23 participa da estabilização e expansão da população celular (MANEL, UNUTMAZ & LITTMAN, 2008; VOLPE et al., 2008; GAFFEN, 2009). As interleucinas IL-17A e IL-17F induzem a expressão das citocinas inflamatórias IL-6, IL-1, TNF, e quimiocinas pró-inflamatórias como CXCL1, GCP-2 e IL-8, promovem inflamação tecidual e recrutamento de neutrófilos ao sítio de inflamação (BETTELLI, 2008). Nas doenças autoimunes, as células Th17 são recrutadas aos tecidos inflamados e promovem inflamação aumentando a produção de citocinas, e estas por sua vez, podem ativar a produção de anticorpos pelas células B, ativar células dendríticas e estimular células inflamatórias em tecidos alvo (DAVIS, HUTCHESON & MOHAN; 2011).

Na AR, respostas TH17 e produção de IL-17 aberrantes tem sido demonstradas (BUSH et al., 2002; NAKAE et al. 2003). Um estudo *in vivo* demonstrou que o modelo murino de artrite, chamado artrite induzida por colágeno (CIA) estava marcadamente suprimido em camundongos deficientes em IL-17, indicando a participação da IL-17 na ativação da resposta imune humoral e celular autoantígeno específica (NAKAE et al. 2003). A presença de células TH17 no líquido sinovial de pacientes com AR sugere o envolvimento da IL-17 na patogênese da doença como citocina pró-inflamatória. (ZANGH et al, 2011b)

As células Th-17 são mais abundantes no líquido sinovial de pacientes com AR quando comparados com sangue periférico de controles saudáveis e

de pacientes com AR (SHAHRARA et al., 2008). Os níveis de IL-17 estão aumentados no líquido sinovial e sangue periférico de pacientes com AR. Além disso, as células TH17 estão presentes no tecido sinovial na AR (PÈNE et al., 2008; KULIGOWSKA & ODRÓWAZ-SYPNIEWSKA, 2004; YUE et al., 2010; ZIOLKOWSKA et al., 2000; CHO et al., 2004).

Adicionalmente, a expressão do receptor da IL-17 (IL-17R) em fibroblastos, células endoteliais e neutrófilos indicam que esta citocina tem potencial em influenciar várias vias de sinalização e células efetoras envolvidas na AR (KOLLS & LINDÉN, 2004). A IL-17 tem ação sinérgica com o TNF- α na promoção da ativação de fibroblastos e condrócitos e, dessa forma, tem sido estudada como alvo terapêutico em ensaios clínicos (GENOVESE et al., 2010).

Células T regulatórias (*forkhead box P3 [Foxp3+]*) estão presentes em tecidos de pacientes com AR em menor quantidade quando comparadas com sangue periférico e líquido sinovial (BEHRENS et al., 2007). O desequilíbrio entre as células Th17 e células T regulatórias também reflete ação local do TNF- α , que bloqueia a atividade de células T regulatórias (NADKARNI, MAURI & EHRENSTEIN, 2007).

A IL-17 também pode atuar em sinergia com a IL-1 β (GENOVESE et al., 2010). Células explantadas de tecido sinovial produzem IL-17 biologicamente ativa, além de IL-6, TNF e IL-1 (CHABAUD et al., 1999). Análise imunohistoquímica da sinóvia na AR identificou uma infiltração de uma subpopulação de células T com expressão de IL-17 (CHABAUD et al., 1999; JOOSTEN et al., 2003).

Estudo prospectivo analisou tecidos sinoviais de pacientes com AR e demonstrou que a IL-17 e TNF α foram fatores de pior prognóstico de forma sinérgica (KIRKHAM et al., 2006). Em estudos pré-clínicos, a IL-17 tem demonstrado contribuir para a inflamação e destruição articular assim como para o desenvolvimento de erosões ósseas. O bloqueio da IL-17 por anticorpos ou receptores solúveis reduziu a inflamação e as erosões ósseas em vários modelos animais de artrite (LUBBERTS, 2008). Dessa forma, bloquear a atividade biológica da IL-17 pode trazer benefícios no tratamento da AR, potencialmente reduzindo a inflamação articular e evitando a erosão óssea características da doença.

3.4.2.3. O fenótipo Th22 e a interleucina-22

Apesar da IL-22 ser expressa na via Th17, alguns estudos demonstraram que algumas células expressam IL-22 e não IL-17 (NOGRALES et al., 2009; DUHEN et al., 2009; TRIFARI et al., 2009). Deste modo, um novo subtipo celular de células T helper, o Th22, foi identificado com identidade distinta das células Th17 e outros subtipos celulares com expressão gênica e funções distintas (EYERICH et al., 2009). O receptor aryl hidrocarbonato (AHR) é o fator de transcrição dessa via. Esse subtipo celular produz IL-22, IL-26, e IL-1. A IL-22 é a citocina funcional mais importante (ZHANG et al., 2011a). Estudos recentes indicam que a IL-6 e o TNF- α com o auxílio das células dendríticas podem induzir o fenótipo Th22 (DUHEN et al., 2009). A IL-23 e IL-6 podem induzir diretamente a produção de IL-22 em células *naïve* de murinos e humanos (ZHANG et al., 2011).

A IL-22 é produzida por células do sistema imune que incluem as células Th22, Th1 e Th17, células NK, células NKT e células indutoras de tecido linfóide. O principal papel biológico da IL-22 envolve o incremento da imunidade inata, proteção contra dano tecidual e auxílio a regeneração de tecidos. Suas células-alvo são células de tecido da pele, fígado e rim e de órgãos do trato respiratório e gastrointestinal modulando a resposta tecidual durante a inflamação. Essa citocina pode desempenhar papel protetor ou patogênico em doenças inflamatórias crônicas dependendo da natureza do tecido afetado e das citocinas presentes no meio (WITTE et al., 2010). IL-22 pode amplificar os efeitos de IL-1 β , TNF- α , IL-17 e IFN- γ e desta forma acentua o papel patogênico destas citocinas. A expressão da IL-22 em outras doenças autoimunes ou inflamatórias imunomediadas como doença inflamatória intestinal (WOLK & SABAT, 2006; ZENEWICZ & FLAVELL, 2011), síndrome de Sjögren (LAVOIE et al., 2011), esclerose sistêmica (MATHIAN et al., 2012) e psoríase (KAGAMI et al., 2010; MITRA, RAYCHAUDHURI & RAYCHAUDHURI, 2012) tem sido documentada.

A função mais bem descrita da IL-22 é na pele. Essa citocina tem ação inflamatória durante a inflamação cutânea. Camundongos transgênicos modificados para expressarem IL-22 de forma exacerbada tem um fenótipo de

pele aberrante que lembra a psoríase e a análise histológica mostra intenso infiltrado de macrófagos na derme (WOLK et al., 2009). Camundongos deficientes em IL-22, demonstraram redução na inflamação da derme induzida pela IL-23 reduzida (ZHENG et al., 2007). A IL-22 também mostrou estar relacionada a mediação da proliferação de queratinócitos e hiperplasia epitelial (ZENEWICS & FLAVELL, 2011).

O papel protetor da IL-22 durante a hepatite também foi demonstrado. Nos hepatócitos, IL-22 ativa vias antiapoptóticas e de sobrevivência dessas células. Células Th17 que expressam IL-22 transferidas para camundongos seguidas de indução de hepatite nestes animais diminuiu o dano hepático (ZENEWICS et al., 2007). O papel da IL-22 na regeneração hepática também tem sido descrito (REN, HU & COLLETTI, 2010). A IL-22 também revelou ter papel protetor na doença inflamatória intestinal e na fibrose pulmonar (ZENEWICS & FLAVELL, 2011).

A IL-22 tem função descrita também na inflamação induzida por patógenos. Mostrou-se patogênica no trato gastrointestinal na infecção pelo *Toxoplasma gondii* (WILSON et al., 2010). Devido a sua ação na manutenção de barreiras epiteliais, a IL-22 auxilia na prevenção da disseminação de bactérias patogênicas como *Klebsiella pneumoniae* no pulmão e *Citrobacter rodentium* e *Salmonella enterica* sorotipo *Typhimurium*, no trato gastrointestinal. Além disso, auxilia a eliminação de patógenos induzindo diversas proteínas antimicrobianas. Com relação às infecções fúngicas, dados são conflitantes mas a IL-22 parece ter papel protetor na candidíase mucocutânea (ZENEWICS & FLAVELL, 2011).

Na AR, estudos sugerem importante papel patogênico da IL-22 na fisiopatogênese dessa doença. Na artrite induzida por colágeno (CIA), em camundongos C57BL/6, a IL-22 mostrou ação pró-inflamatória através da importante atividade promotora de osteoclastogênese e produção de anticorpos. Camundongos *knockout* IL-22 $-/-$ foram menos susceptíveis a artrite induzida por colágeno quando comparados com camundongos selvagens com importante redução na incidência de artrite e menor formação de *pannus* (GEBOES et al., 2009). Tratamento anti-IL22 de um modelo experimental de

artrite (IL-1Ra-/-) reduziu significativamente a inflamação e erosões ósseas nesses animais (MARIJINISEN et al., 2011).

Níveis elevados de IL-22 foram demonstrados em tecidos sinoviais e as camadas internas da sinóvia reumatoide expressam níveis mais altos de receptor para IL-22 (IL-22R)(IKEUCHI et al., 2005). Outros estudos demonstraram que níveis de IL-22 séricos e no líquido sinovial estão aumentados em pacientes com AR comparados com controles(KIM et al., 2012; MITRA, RAYCHAUDHURI & RAYCHAUDHURI, 2012; LEIPE et al., 2011; ZHANG et al., 2011). Os níveis mais elevados de IL-22 foram associados a erosões ósseas (LEIPE et al., 2011). Células Th22 estão significativamente mais elevadas em pacientes com AR comparadas a controles saudáveis (ZHANG et al., 2011;ZHANG et al., 2012) e demonstraram correlação positiva com marcadores de inflamação como proteína C reativa e o DAS28(ZHANG et al., 2012). Células NK-22 demonstraram importante atividade proliferativa de fibroblastos sinoviais na AR (REN et al., 2011). Efeito inibitório na proliferação de fibroblastos sinoviais do anticorpo anti-IL-22R foi encontrado na AR(MITRA, RAYCHAUDHURI & RAYCHAUDHURI, 2012). A IL-22 também mostrou importante atividade promotora de osteoclastogênese na AR através da indução do ligante do receptor activador do NF-κB (RANKL) em fibroblastos sinoviais humanos (KIM et al., 2012).

A FIGURA 6 sumariza os principais fenótipos celulares CD4+ envolvidos na imunidade adaptativa e expressão de citocinas na AR.

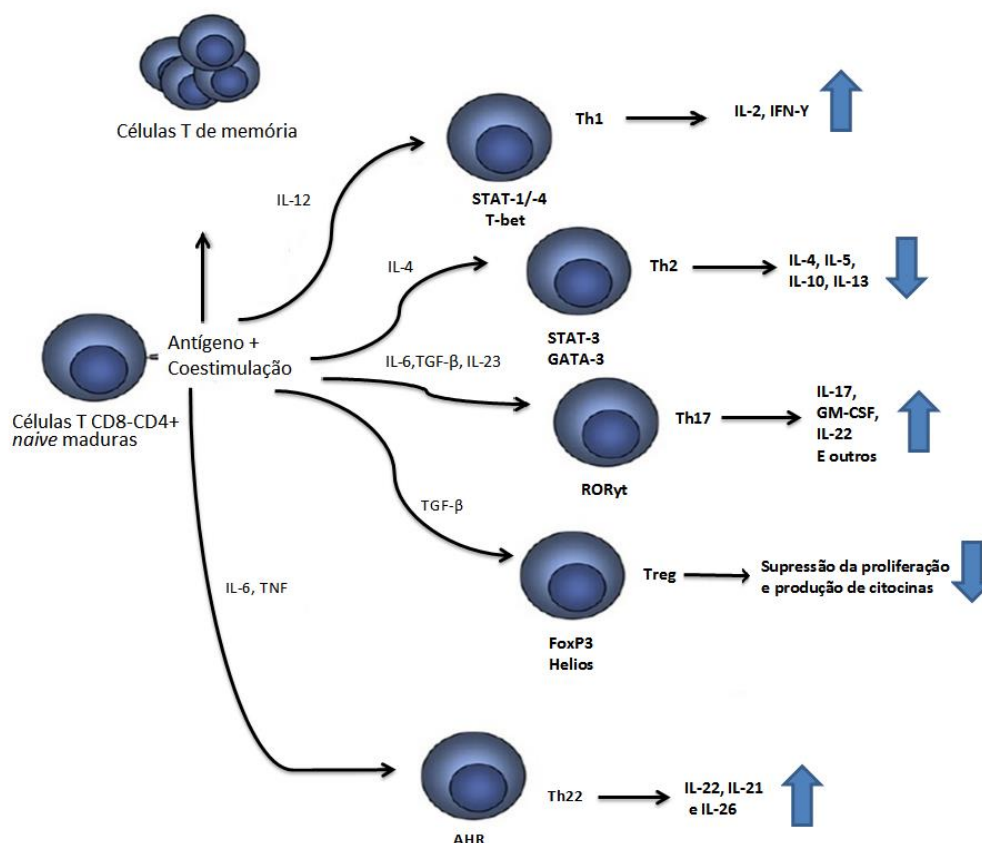


FIGURA 6: Principais fenótipos celulares CD4+ e expressão de citocinas na AR. Adaptado de Scherer & Burmester (2011)

3.5. As células B e formação de autoanticorpos

Os linfócitos B são formados na medula óssea com reatividade para antígenos específicos e liberados na circulação tornando-se células B *naíve* maduras. Elas são ativadas após contato com antígeno e participam de reações imunológicas nos centros germinativos. Estas reações envolvem interações de células B com células T oriundas da apresentação do antígeno a célula B através das moléculas co-estimulatórias. Esse processo leva a diversos mecanismos efetores. Células B de memória são geradas, assim como plasmócitos que secretam anticorpos (HOYER et al., 2005).

Autoanticorpos são encontrados no soro de pacientes com AR direcionados a diversos antígenos *self* como colágeno tipo II, catepsina, calreticulina, BiP, glicoproteína 39, a parte Fc da IgG (fator reumatoide) e uma

série de proteínas que sofreram modificações pós-translacionais nas quais a conversão de resíduos de arginina em citrulina torna a proteína antigênica (ACPA)(SCHERER & BURMESTER, 2011).

Na AR, os autoanticorpos com importante valor diagnóstico, prognóstico e que tem sido mas bem descritos são oFR e oACPA. O fator reumatoide foi o primeiro anticorpo identificado na AR e é dirigido contra a porção Fc da IgG. O papel fisiológico do FR é auxiliar no clareamento de imunocomplexos circulantes. Pode ser patogênico através da geração de imunocomplexos e causando inflamação em sítios onde o seu receptor FcγRIIIa é expresso (na sinóvia, superfícies serosas, e sítios onde há formação de nódulos reumatoides) (DASS et al., 2011), aumentando a permeabilidade vascular e a liberação de fatores quimiotáticos relacionados ao recrutamento de células efectoras imunocompetentes (SCHERER & BURMESTER, 2011). O FR-IgM pode ser detectado em 60 a 80% dos pacientes com AR e doença estabelecida. Contribui para atividade e cronicidade da doença através das vias mediadas por complemento. O FR pode ser positivo em pessoas sem artrites ou em outras doenças (DA MOTA et al., 2012). Pacientes com positividade para o FR sofrem de doença mais grave e destrutiva quando comparados a pacientes com a ausência deste anticorpo, estando também relacionado às manifestações extra-articulares (TURESSON et al., 2007b).

O ACPA é altamente específico para AR e também é expresso na sinóvia. Os ACPA tem sido bastante discutidos recentemente. Tem alta especificidade para AR e tem envolvimento potencial na patogênese da doença. Antígenos citrulinados estão presente na sinóvia inflamada e centros germinativos secundários no tecido sinovial, títulos aumentados de ACPA no líquido sinovial sugerem produção local destes anticorpos na articulação da AR (KINLOCH et al., 2008; HUMBY et al., 2009). Os ACPA são uma coleção policlonal de anticorpos que reconhecem diferentes epítomos citrulinados. O ensaio laboratorial para detecção de ACPA mais utilizado é o anti-CCP. Várias proteínas próprias (*self*) citrulinadas são detectadas no anti-CCP: α-enolase, fibrionogênio, fibronectina, queratina, colágeno e vimentina. Anticorpos que reconhecem essas proteínas tem sido encontrados em modelos experimentais de artrite (UYSAL et al., 2009; KUHN et al., 2006; HILL et al., 2008).

Ambos anticorpos podem estar presentes anos antes de qualquer manifestação da AR, desta forma ressaltando o importante papel das células B na doença (EDWARDS & CAMBRIDGE, 2003).

As células B também contribuem para a patogênese da doença por outros mecanismos além da produção de autoanticorpos. Em doadores saudáveis células B com reatividade aumentada são inativadas na medula óssea e células com reatividade aumentada na periferia são removidas. Percentagens elevadas de células B com polirreatividade são encontradas em sangue de pacientes com AR comparadas com doadores normais (SAMUELS et al., 2005). Além disso, a população de células B *naïve* encontradas no sangue periférico de pacientes com AR expressa uma alta frequência de receptores de células B autorreativos (BCRs, do inglês *Bcell receptor*) sugerindo que defeitos na tolerância de células B fazem parte da patogênese da doença (SAMUELS et al., 2005; FINNEGAN, ASHAYE & HAMEL, 2012).

O *pool* de células B periféricas é regulado pela citocina BAFF (do inglês, *B cell activating factor*) também chamada de BLyS (do inglês, *B lymphocyte stimulator*). O BAFF foi inicialmente descrito como fator importante para a sobrevivência de células B, mas foi posteriormente descrito como de importância crítica para o desenvolvimento deste grupo celular. Diversos estudos tem apontado a influência do BAFF na patologia da AR. Essa citocina mostrou-se aumentada em soro de pacientes com AR comparados a controles saudáveis (SEYLER et al., 2005), níveis de BAFF tiveram correlação positiva com níveis de FR (PERS et al., 2005) e também mostraram-se mais altos no líquido sinovial de pacientes com AR comparados com níveis séricos (MOURA et al., 2011). Além disso, BAFF e seu receptor BAFF-R estão amplamente expressos na sinóvia da AR e a expressão de BAFF é regulada por outras citocinas inflamatórias (NAKAJIMA et al., 2007; FINNEGAN, ASHAYE & HAMEL, 2012).

As células B também são ativadas após reconhecimento de antígeno e funcionam como apresentadoras de antígenos para as células T *helper* CD4+ para induzir resposta imune. Na AR células B autorreativas parecem exacerbar ou perpetuar a doença através da ativação de células T também autorreativas. Depleção de células B em modelos de camundongos com artrite está

associada a redução da ativação de células T (HAMEL et al., 2008; BOUAZIZ et al., 2007). A interação de células B e células T pode ocorrer de forma sistêmica em tecido linfóide periférico ou localmente na sinóvia onde os agregados linfóides otimizam o reconhecimento de antígeno (O'NEIL et al., 2005).

Os linfócitos B em humanos produzem uma variedade de citocinas (FINNEGAN, ASHAYE & HAMEL, 2012). Ao avaliar o mRNA de citocinas de diferentes populações celulares isoladas do líquido sinovial de pacientes com AR observou-se que células B de todos os pacientes expressaram transcritos para IL-12p35, IL-12p40, IL-23p19, IL-7, IL-15, TNF- α , LT- β , BAFF, APRIL e RANKL. Enquanto apenas células B de alguns pacientes expressaram IFN γ , IL-2, IL-1 β , IL-21, IL-18, IL-6 e IL-10 (YEO et al., 2011). Populações de células B com atividade regulatória que produzem IL-10 foram descritas em pacientes com AR (IWATA et al., 2011). Tais achados ressaltam o papel destas células como produtoras de citocinas na AR.

3.6. Diagnóstico e acompanhamento

O diagnóstico da AR depende da associação de sintomas e sinais clínicos e alterações encontradas em exames laboratoriais e de imagem, baseados nos critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (ACR-1987) e mais recentemente nos critérios ACR/EULAR 2010.

A avaliação da gravidade da doença é feita pela avaliação da dor e do edema com contagem das articulações acometidas, da perda funcional, quantificação da proteína C reativa, duração da rigidez matinal, radiografia de mãos, punhos e pés, da presença do fator reumatoide e seus títulos e da velocidade de hemossedimentação, bem como avaliação global da doença pelo médico e pelo paciente (FELSON et al., 1993; BOERS et al., 1994; DA MOTA et al., 2011). Quanto a gravidade da doença, a AR costuma ser dividida em: leve, moderada e grave. Para melhor avaliação da atividade da doença e da eficácia terapêutica em estudos clínicos utiliza-se os índices compostos de atividade da doença (ICADs) como o DAS, do inglês *disease activity score* (VAN DER HEIDJE et al., 1990), DAS28, do inglês *disease activity score in 28*

joints (PREVOO et al., 1995), SDAI, do inglês *simple disease activity index* (SMOLEN et al., 2003) e CDAI, do inglês *clinical disease activity index* (ALETAHA et al., 2005).

Os índices mais frequentemente utilizados incluem o DAS28 (do inglês, *disease activity score 28*) e o índice clínico de atividade de doença - CDAI (do inglês, *Clinical Disease Activity Index*). Esses índices utilizam uma contagem articular de 28 articulações (interfalangeanas proximais, metacarpofalangeanas, punhos, cotovelos, ombros e joelhos, bilateralmente) e determinam um valor numérico para atividade da AR (ALETAHA et al., 2005). A tabela 3 demonstra como calcular melhor tais índices (ALETAHA et al., 2005). Os pontos de corte estabelecidos para os valores numéricos do DAS28 e CDAI classificam a doença como em remissão, atividade leve, moderada ou alta. O *American College of Rheumatology* disponibiliza calculadora para o cálculo do DAS28 no endereço eletrônico em sua página na internet: <http://www.rheumatology.org/practice/clinical/quality/DAS28.asp>. Os pontos de corte e respectivas classificações estão demonstrados na tabela 4 (ALETAHA et al., 2005).

Tabela 3

Cálculo e valor total dos índices compostos da atividade de doença (ICAD)

Adaptado de Da Mota et al., 2011

Elementos	CDAI	DAS 28 (com 4 variáveis)
Contagem de articulações edemaciadas	(0-28) Soma simples	Raiz quadrada da soma simples
Contagem de articulações dolorosas	(0-28) Soma simples	Raiz quadrada da soma simples
Reagentes de fase aguda	----	VHS 2-100 mm ou PCR 0,1-10mg/ dL transformação logarítmica
Avaliação global saúde (Paciente)	----	0-100 mm
Avaliação de atividade de doença (Paciente)	(0-10 cm)	----
Avaliação de atividade de doença (Avaliador)	(0-10 cm)	----
Índice total (Variação do índice)	Soma simples (0-76)	Requer inserir o número na calculadora (0,49 – 9,07)

CDAI: índice clínico de atividade de doença; DAS28: índice de atividade de doença (28 articulações); PCR: proteína C reativa; VHS: velocidade de hemossedimentação. Assumindo uma variação entre 2 e 100 mm/h para a VHS e entre 0,1 e 10 mg/ dL para a PCR. (Adaptado de Da Mota et al., 2011)

Tabela 4

Pontos de corte dos índices compostos de acordo com a atividade de AR

Modificado a partir de Aletaha et al. (2005)

Índice	Estado da atividade de doença	Pontos de corte
CDAI	Remissão	$\leq 2,8$
	Baixa	$> 2,8$ e ≤ 10
	Moderada	> 10 e ≤ 22
	Alta	> 22
DAS28	Remissão	$\leq 2,6$
	Baixa	$> 2,6$ e $\leq 3,2$
	Moderada	$> 3,2$ e $\leq 5,1$
	Alta	$> 5,1$

CDAI: índice clínico de atividade de doença; DAS28: índice de atividade de doença (28 articulações); modificado a partir de Aletaha et al. (2005)

A recomendação do *Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para o diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide* é de que se deve sempre ter como objetivo, ao instituir a terapia medicamentosa dos pacientes com AR, atingir e manter a remissão clínica ($\text{CDAI} \leq 2,8$ e $\text{DAS28} \leq 2,6$) ou, pelo menos, o estado de baixa atividade da doença ($\text{CDAI} > 2,8$ e ≤ 10 e $\text{DAS28} > 2,6$ e $\leq 3,2$). Esse grupo de pacientes apresentam menor progressão radiográfica e melhor evolução funcional (DA MOTA et al., 2012; ALETAHA et al., 2005).

3.7. Alvos terapêuticos

O tratamento da AR inclui medidas não-medicamentosas e medicamentosas. As terapias não-farmacológicas incluem educação do paciente e de sua família, fisioterapia, apoio psicossocial, terapia ocupacional e abordagens cirúrgicas em alguns casos. As terapias medicamentosas incluem uso de anti-inflamatórios não hormonais (AINH), corticoides, drogas modificadoras do curso da doença (DMCD) sintéticas e biológicas e drogas imunossupressoras (DA MOTA et al., 2012). As DMCDs sintéticas são consideradas as drogas de primeira linha no tratamento da AR. O metotrexato deve ser a DMCD de primeira escolha (SMOLEN et al., 2010; KATCHMART et al., 2010; SCOTT, WOLFE & HUIZINGA, 2010). Seu mecanismo de ação ainda não está totalmente estabelecido, inibe a dihidrofolato redutase e leva liberação

extracelular de adenosina um conhecido inibidor das respostas imune e inflamatória. Reduz sinais e sintomas da doença, melhora o estado funcional e bloqueia a progressão das lesões radiográficas. Havendo contraindicação ou falta de resposta, sulfassalazina ou leflunomida podem ser utilizadas. A sulfassalazina diminui a resposta inflamatória local e inibe sistemicamente a síntese de prostaglandinas (SUAREZ-ALMAZOR et al., 2000), tem ação imunomodulatória em diversas funções neutrofílicas e linfocitárias e da quimiotaxia. É também um inibidor de enzimas folato-dependentes. Reduz a atividade da doença, efetiva no controle da dor e na avaliação clínica global. Tem boa eficácia clínica e diminui a progressão radiográfica. A leflunomida bloqueia autoanticorpos e reduz a inflamação inibindo a síntese de pirimidina e reduzindo a proliferação de células T (OSIRI et al., 2003). Os antimaláricos difosfato de cloroquina e hidroxicloroquina (VAN DER HEIJDE et al., 1990) devem ser indicados apenas para pacientes com doença leve ou artrite indiferenciada com baixo potencial erosivo. Os antimaláricos tem atividade anti-inflamatória (estabilização das membranas lisossomais, inibição de enzimas lisossômicas e da quimiotaxia e fagocitose de polimorfonucleares) e interferem na produção de prostaglandinas (CLARK et al., 1993; HERA STUDY, 1995).

As DMCD biológicas estão indicadas para os pacientes que persistam com atividade da doença, apesar do tratamento com DMCD sintéticas. Esse grupo de medicamentos tem demonstrado importante ação modificadora de doença com adequado controle da inflamação e acentuada melhora articular. As DMCDs biológicas usadas no tratamento da AR incluem os bloqueadores do TNF: adalimumabe, certolizumabe, etanercepte, infliximabe e golimumabe, o depletor de linfócito B, rituximabe; o bloqueador da coestimulação do linfócito T: abatacepte; e o bloqueador do receptor de interleucina-6 (IL-6): tocilizumabe (FURST et al., 2012; DA MOTA et al., 2012; SINGH, BEG & LOPEZ-OLIVO, 2011). Todas as DMCDs biológicas tem uma maior associação com a incidência de infecções como principal evento adverso, especialmente no primeiro ano de uso. Os bloqueadores do TNF (anti-TNF) tem uma maior associação com infecções causadas por patógenos intracelulares (como bacilo da tuberculose, listeria, histoplasma, micobactérias atípicas e legionella), além

de disfunção cardíaca, doenças desmielinizantes, fenômenos autoimunes (produção de autoanticorpos), vasculites cutâneas, doença pulmonar intersticial e eventual aumento do risco de linfoma (NAM et al., 2010; SINGH et al., 2012; CURTIS et al., 2007; DIXON et al., 2007). O rituximabe também tem associação com complicações infecciosas, bem como pneumonia intersticial, neutropenia e trombocitopenia (COHEN et al., 2006; EMERY et al., 2010; KEYSTONE et al., 2009; POPA et al., 2007). O bloqueio da IL-6 com tocilizumabe pode ocasionar neutropenia, plaquetopenia, elevação de transaminases, elevação do colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade e também aumenta a ocorrência de infecções (JONES et al., 2010; CAMPBELL et al., 2011; SINGH, BEG & LOPEZ-OLIVO, 2011).

3.8. Os agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gamma (PPAR γ)

Outros alvos terapêuticos na cascata inflamatória da AR tem sido continuamente identificados (TAK & KALDEN, 2011). Novas abordagens terapêuticas tem sido desafiadoras com o objetivo de evitar dano radiográfico particularmente em pacientes não respondedores às terapias estabelecidas ou que apresentem contraindicações ou eventos adversos às abordagens terapêuticas atuais. Adicionalmente, devido ao crescente aumento no conhecimento sobre a AR, pesquisadores têm como objetivo identificar subgrupos de pacientes específicos que teriam benefícios com outros tratamentos, o que permitiria otimizar a abordagem terapêutica e potencialmente reduzir custos e riscos aos pacientes e à sociedade.

Vários estudos têm destacado a ação anti-inflamatória dos agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ). Os PPAR γ pertencem a superfamília de receptores nucleares. Estes fatores de transcrição funcionam como receptores para uma variedade de pequenas moléculas solúveis em lipídios que são comumente geradas como hormônios ou intermediárias de várias vias metabólicas (SZANTO & NAGY, 2008). Estes

receptores regulam a expressão gênica através da heterodimerização com o receptor retinoide X pela ligação na região promotora de genes alvo específicos. Tais genes são regulados através da ligação transcricional e repressão que são mecanismos dependentes de ligantes (CLARK et al., 2000). Originalmente o PPAR γ foi identificado como um regulador chave da diferenciação de adipócitos (FARMER, 2006) e metabolismo da glicose (WILSON, LAMBERT & AND KLIEWER, 2001). Os PPAR γ expressam duas isoformas, PPAR γ 1 e PPAR γ 2. A isoforma PPAR γ 1 é expressa em macrófagos, células epiteliais colônicas, células endoteliais, células musculares lisas vasculares. O PPAR γ 2 está principalmente expresso em tecido adiposo e envolvido na regulação da adipogênese (CHUNG, KANG & KIM, 2003). O PPAR γ é ativado por diversas substâncias naturais ou sintéticas. Muitos ligantes que ativam e modulam o PPAR γ tem sido identificados (CHOI & BOTHWELL, 2012). Estes ligantes estão sumarizados na tabela 5 (CHOI & BOTHWELL, 2012).

Tabela 5. Ligantes do PPAR γ

Receptores	Ligantes endógenos	Agonistas sintéticos	Antagonistas sintéticos
PPAR γ	15d- PGJ2 15-HETE 9-HODE 13-HODE	Rosiglitazona Pioglitazona Troglitazona Ciglitazona	Gw-9662

O PPAR γ tem demonstrado estar envolvido na regulação da resposta inflamatória (STRAUS & GLASS, 2007). A observação de que o PPAR γ é ativado por metabolitos do ácido aracdônico e alguns anti-inflamatórios não esteroidais sugere que esse receptor nuclear tem importante ação na inflamação. É expresso de forma importante em monócitos e macrófagos e sua ativação nesses tipos celulares suprimiu a modulação da iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) e da produção espécies reativas de oxigênio (ROS) (LI, PASCUAL & GLASS, 2000; VON KINETHEN et al., 2007). Esse receptor demonstrou inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α ,

interleucina-1 β e interleucina-6 (SZELES, TÖRÖCSIK & NAGY, 2007). Os ligantes do PPAR γ reduzem a expressão de genes para o TNF- α , IL-6 e IL-1 β , iNOS, gelatinase B, receptor scavenger A e COX-2 e macrófagos ativados (JIANG, TING & SEED, 1998; RICOTE et al., 1998; SUBBARAMAIAH et al., 2001). PPAR γ está envolvido no mecanismo de respostas imunes adaptativas de células T e B. (CHOI & BOTHWELL, 2012). Células T naíve e células T ativadas expressam PPAR γ , e ligantes para estes receptores inibem a proliferação e diminuem significativamente a viabilidade desses tipos celulares (HARRIS & PHIPPS, 2001).

Os PPAR γ são utilizados como alvos moleculares para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2, cujos ligantes sintéticos incluem as tiazolidinas: troglitazona, rosiglitazona e pioglitazona (DESVERGNE & WAHLI, 1999; CARIU, CHARBONNEL & STAELS, 2012). A tiazolidina ou tiazolidina-2,4-diona (TZD) é um núcleo pentagonal que apresenta em sua estrutura química um átomo de enxofre na posição 1 (azul), átomo de nitrogênio na posição 3 (verde) e grupos carbonilas nas posições 2 e 4 (vermelho) (FIGURA 7). Derivados tiazolidínicos tem sido amplamente estudados (CARIU, CHARBONNEL & STAELS, 2012).

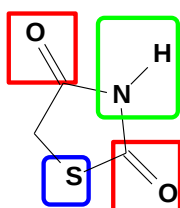


Figura 7: Estrutura química da tiazolidina-2,4-diona

A troglitazona e a rosiglitazona foram retiradas do mercado devido a eventos adversos (hepatotoxicidade e suspeita de risco cardiovascular aumentado). Atualmente, a TZD disponível para o tratamento de diabetes mellitus é a pioglitazona (CARIU, CHARBONNEL & STAELS, 2012).

As TZDs atuam basicamente por dois mecanismos moleculares: transativação ou transrepressão. Na transativação, as TZDs ligam-se ao PPAR γ induzindo mudanças conformacionais que levam ao recrutamento de proteínas e coativadores. PPAR γ , então, forma um heterodímero com o

receptor retinoide-x (RXR) e reconhece elementos de resposta de DNA específicos chamados elementos de respostas do PPAR (PPRE do inglês, *PPAR response elements*) na região promotora dos genes-alvo. Isso resulta na transcrição desses genes. Muitos desses genes estão envolvidos na homeostase metabólica. Na transrepressão, os PPARs podem reprimir a transcrição gênica interferindo de forma negativa com outras vias de sinalização-transdução, tais como a via de sinalização do fator nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), proteínas AP-1 e fator nuclear ativado de células T (NFAT), de uma maneira independente de ligação de DNA. Esse mecanismo reduz a expressão de genes de resposta-inflamatória (CARIOU, CHARBONNEL & STAEELS, 2012; CONSOLI & DEVANGELIO, 2005). A ativação do PPAR γ nas células do sistema imune resulta predominantemente em transrepressão da expressão gênica pró-inflamatória, resultando em inflamação (SCHMIDT, BRÜNE & VON KNETHEN, 2010).

3.9. PPAR γ na artrite reumatoide

A expressão de PPAR γ em cartilagem humana e cultura de condrócitos já foi documentada (FAHMI et al., 2001). Além disso, o papel anti-inflamatório dos ligantes do PPAR γ em células do tecido conectivo das articulações já foi reportado (GIAGINIS, GIAGINI & THEOCHARIS, 2009). Esses receptores estão expressos em condrócitos de camundongos e humanos e seus ligantes inibem a produção de IL-1 β induzida por óxido nítrico e metaloproteinases de matriz - MMP (do inglês, *matrix metalloproteinases*) assim como também causam diminuição na síntese de proteoglicanos (SABATINI et al., 2002; BORDJI et al., 2000; FAHMI et al., 2001). Sinoviócitos de ratos também demonstraram expressar esses receptores e seus ligantes reduziram a expressão de COX-2, iNOS, IL-1 β e TNF- α nessas células (SIMONIN et al., 2002). Os ligantes do PPAR inibem a expressão de MMP-1 causada pela IL-1 β em fibroblastos sinoviais humanos (FAHMI et al., 2002).

A ação dos agonistas do PPAR γ em modelos experimentais de artrite já foi demonstrada. Estudo publicado em 2000 (KAWAHITO et al., 2000), evidenciou que administração intraperitoneal do agonista endógeno 15d-PGJ₂ e

do agonista sintético troglitazona diminuiu artrite induzida por adjuvantes com marcada supressão da formação de *pannus* e da infiltração de células mononucleares em camundongos Lewis fêmeas. Esse mesmo estudo mostrou que a expressão de PPAR γ em tecido sinovial de pacientes com AR está aumentada. Houve marcada expressão do PPAR γ em macrófagos, e também uma expressão modestamente aumentada na camada interna da sinóvia (imunocitoquímica), fibroblastos e células endoteliais em tecidos sinoviais de 20 pacientes com AR comparados com tecidos sinoviais de 10 pacientes com osteoartrose. A expressão do PPAR γ em cultura de sinoviócitos foi determinada pelo método de quantificação do mRNA com RT-PCR e de proteínas por Western Blot. Além disso, a ativação do PPAR γ pelos agonistas induziu a apoptose de sinoviócitos *in vitro* (KAWAHITO et al., 2000).

Dois anos mais tarde, nesse mesmo modelo experimental de artrite, os efeitos da rosiglitazona e pioglitazona foram investigados na formação de nitrotirosina e na expressão de mediadores da inflamação iNOS (do inglês, *inducible oxide synthase*), ciclooxigenase-2 e moléculas de adesão intercelulares tipo 1 – ICAM-1 (do inglês, *intercellular adhesion molecule-1*). Os dois ligantes inibiram, de forma significativa, a formação de nitrotirosina e a expressão da iNOS nas articulações de tornozelos e temporomandibulares dos camundongos. A rosiglitazona também inibiu a expressão de células positivas M30, um marcador de apoptose, nos tecidos articulares. A expressão do PPAR γ nos tecidos articulares foi mensurada através da detecção de níveis de proteína desses receptores através da técnica de Western Blot (SHIOJIRI et al., 2002).

O mesmo modelo de artrite em ratos (AIA) foi usado em um estudo publicado em 2008, mostrando que níveis elevados de rosiglitazona ou pioglitazona estavam associados a redução de picos febris associados a inflamação da doença. As duas TZDs utilizadas, quando em dose altas, reduziram a sinovite e a expressão sinovial de TNF- α e IL-1 β . Nesses animais as TZDs falharam em evitar a degradação da cartilagem, entretanto reduziram as erosões ósseas e a perda óssea causada pela inflamação. (KOUFANY et al., 2008).

No modelo experimental de artrite chamado artrite induzida por colágeno - CIA (do inglês *collagen-induced arthritis*), o tratamento de camundongos com rosiglitazona aliviou os sinais clínicos de artrite e melhorou sinais histológicos na articulação e na pata dos animais. Nesse mesmo estudo avaliou-se outros fatores inflamatórios como expressão de quimiocinas, infiltração de neutrófilos, produção de citocinas plasmáticas (TNF α , IL-1 β e IL-6), expressão de iNOS e COX-2 assim como peroxidação de lipídios, formação de nitrotirosina e ativação do PARP. Em todos esses parâmetros a rosiglitazona mostrou significativa ação anti-inflamatória (CUZZOCREA et al., 2003). A pioglitazona associada ou não o metotrexato produziu melhora significativa de parâmetros séricos de estresse oxidativo e citocinas inflamatórias em ratos com artrite. Assim como também melhorou de forma robusta parâmetros de atividade clínica de doença e os níveis de proteína C reativa (SHAHIN et al., 2011).

Um trabalho recente demonstrou que tecidos sinoviais obtidos de ratos diversos que tiveram artrite induzida por pristano apresentaram níveis diferentes da expressão de PPAR γ , liberação de citocinas e severidade da doença. Em um dos modelos usados, de “ratos resistentes a artrite” há reduzida expressão de citocinas inflamatórias e proteases implicadas no dano articular. Nesses animais houve uma expressão 5 vezes maior de PPAR γ (BRENNER et al., 2011).

A expressão do gene do PPAR γ , em células da medula óssea foi observada de forma significativamente aumentada em pacientes com AR, através de níveis mais altos de mRNA, quando comparados a pacientes com osteoartrite e pacientes com fratura traumática femoral (JIANG et al., 2008). Sinoviócitos humanos expressam PPAR γ , e a ativação desses receptores pelos ligantes endógeno 15d-PGJ₂ e exógeno troglitazona inibem a expressão de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) em sinoviócitos de pacientes com AR (JI et al., 2001)

A associação de metotrexato e pioglitazona foi avaliada em um estudo clínico que envolveu 49 pacientes com AR e diabetes. Destes, 28 pacientes tinham doença ativa e receberam 30mg de pioglitazona, além de metotrexato e corticosteroide ou anti-inflamatório não esteroide. Os pacientes foram avaliados em uma consulta inicial e 12 semanas depois. Os pacientes que

estavam em uso de pioglitazona apresentaram redução significativa do DAS28 e dos níveis de proteína C reativa. Os níveis glicêmicos dos pacientes tratados com pioglitazona e os não tratados não diferiram sugerindo que a melhora clínica e laboratorial destes pacientes é proveniente de mecanismo diferente do efeito antidiabético da droga, corroborando, desta forma, o efeito anti-inflamatório da pioglitazona (SHAHIN et al., 2011).

Um estudo piloto, publicado em 2012, sugeriu que a expressão do PPAR γ em monócitos/macrófagos derivados de monócitos poderia representar um indicador de atividade de doença. O trabalho avaliou 30 pacientes com AR (tratados, principalmente, com corticosteroides e metotrexato) e 15 voluntários sadios. Os monócitos/macrófagos derivados de monócitos tinham expressão significativamente aumentada em pacientes com AR (avaliada pelos níveis de proteína do PPAR ou mRNA). Pacientes com doença com menor índice de atividade (DAS28 <3,2) apresentaram níveis mais altos de proteína e baixa atividade de MMP-9 comparados a pacientes com doença mais severa (DAS28 >3,2). A avaliação *in vitro* do uso do metotrexato e metilprednisolona em células de voluntários sadios demonstrou expressão aumentada da proteína PPAR γ induzida por estes compostos (PALMA et al., 2012). O estudo sugere que parte dos efeitos das DMCDs utilizadas no tratamento da AR tem contribuição da expressão do PPAR γ .

Diante disso, apesar do PPAR γ ser considerado como um alvo molecular atrativo para o tratamento de doenças metabólicas, suas funções pleiotrópicas, como a anti-inflamatória, estão atualmente sendo exploradas. Vários ligantes sintéticos e naturais tem sido foco de extensa pesquisa e esforços como potentes agentes anti-inflamatórios em diversas doenças inflamatórias e autoimunes como a AR. O PPAR γ tem sido associado a várias vias de sinalização inflamatórias relacionadas a artrite e a populações celulares localizadas nas articulações. Levando em consideração os estudos atuais e a melhor compreensão da patogênese da AR e a importância de novas citocinas e subtipos celulares em sua fisiopatologia, os ligantes sintéticos do PPAR γ parecem representar promissores agentes terapêuticos na abordagem dessa doença.

METODOLOGIA

4. METODOLOGIA

4.1. População do estudo

Um total de 83 pacientes (80 mulheres, 3 homens, média de 53 ± 10.6 anos) foram recrutados do Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2011. Os pacientes eram provenientes do ambulatório deste mesmo serviço. A terapia medicamentosa em uso foi registrada. O diagnóstico de AR foi estabelecido pela presença de 4 ou mais critérios do American College of Rheumatology(1987)(ARNETT et al., 1988). Foram incluídos 30 voluntários sadios, sem doenças reumatológicas, como controles por idade e sexo (idade média 44 ± 10.8 anos). Amostras de sangue periférico foram obtidas de pacientes e controles. Dados clínicos e laboratoriais foram coletados de registros do prontuário ou por ficha clínica específica e, posteriormente, revisados (vide anexo). A atividade de doença de cada paciente foi quantificada usando os escores de atividade CDAI e DAS28, todos os pacientes realizaram radiografia de mãos e avaliados para a presença de erosões radiográficas. Os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para participar do estudo. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da UFPE (PROTOCOLO CEP/CCS/UFPE N° 339/10) (Apêndice 3).

4.2. Animais

Nos ensaios experimentais foram utilizados camundongos BALB/c saudáveis (machos, com cerca de 45 dias). Os animais foram provenientes do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Foram seguidas as diretrizes do Comitê de Ética para o Uso de Animais Experimentais da Universidade Federal de Pernambuco(PROTOCOLO N° 23076.046593/2012-14)(Apêndice 2).

4.3. Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs)

As PBMCs foram obtidas através da coleta de 3ml de sangue em tubos heparinizados de pacientes em tratamento com DMCDs e voluntários sadios, que não tinham tomado nenhuma medicação por pelo menos 15 dias antes da coleta. As células foram isoladas e purificadas em Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). A contagem de células foi realizada com a câmara de Neubauer, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método do Azul de Trypan. As células foram usadas apenas quando a viabilidade era maior que 98%.

4.4. Preparação e cultura de esplenócitos

Em cabine de biossegurança, os animais foram sacrificados para retirada do baço. Este foi transferido para placa de Petri para serem triturados. As células foram recuperadas, filtradas em Cell Strainer 40 μ m (BD FalconTM) e centrifugadas (300g, 10 min) para posterior tratamento de lise (1X RBC lysis buffer, eBioscience). Após ressuspensão dos esplenócitos em meio RPMI-1640 suplementado, foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer. Os esplenócitos foram distribuídos em placas de 24 poços em concentração de 1×10^6 células/ml. As células foram estimuladas com a lectina Concanavalina-A (Con A) na concentração de 5 μ g/ml e as doses testadas do TM17 foram de 1, 10 e 100 μ M e metilprednisolona 100 μ M como controle. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa úmida e 5% de CO₂.

4.5. Cultura de PBMCs

Para a cultura de PBMCs (1×10^6 células por poço) foram coletado sangue de trinta pacientes com AR, 14 controles e foram cultivadas em placas de 24 poços em meio RPMI-1640 (Gibco), e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco), HEPES 10Mm (Gibco), e penicilina/estreptomicina 200U/ml (Gibco), e incubadas a 37°C em incubadora humidificada em CO₂ 5%. As células foram estimuladas com PMA 100ng/ml (Sigma) e Ionomicina 1 μ g/ml (sigma). As doses testadas do composto foram de 1, 10 e 100 μ M e a Rosiglitazona na dose de 100 μ M foi usada como controle. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em estufa úmida e 5% de CO₂.

4.6. Quantificação dos níveis de citocinas

Citocinas nos sobrenadantes de cultura e do plasma foram quantificadas usando pelo método ELISA de acordo com as recomendações do fabricantes. (R&D Systems). Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 48 horas e os níveis de IL-22, IL-17, IL-6 e IFN γ foram mensurados. Os limites inferiores de detecção para as análises foram: 15.625 pg/mL para IL-17, 9.375 pg/mL para IL-6 e IFN- γ , e 31.25 pg/mL para IL-22.

4.7. Método MTT

Os esplenócitos de camundongos BALB-c e PBMCs de voluntários saudáveis foram incubados na presença dos compostos em duas concentrações diferentes por 48 horas (100 e 250 μ M para esplenócitos e 10 e 100 μ M para PBMCs). A citotoxicidade foi quantificada pela habilidade que as células tem em reduzir o MTT a um sal insolúvel de cor roxa. Os compostos foram testados em triplicata no mínimo em três experimentos independentes. Três horas depois os cristais de formazan foram diluídos com 100 μ L de 20% de SDS e sua absorbância medida (570nm) pela leitora de placa (BioTek EL808®). A atividade citotóxica foi quantificada como percentagem do controle de absorbância.

4.8. Quantificação da expressão gênica por RT-PCR

4.8.1 Detecção e quantificação das citocinas em PBMCs

Para a análise do mRNA, as PBMCs e esplenócitos foram cultivados em placa de 6 poços expostas as condições descritas nos itens 4.4 e 4.5, sendo então lavadas em PBS gelado. Após a retirada total do PBS, adicionou-se 0,5 mL de reagente de Trizol® (GIBCO BRL), sendo as células lisadas e retiradas por ressuspensão com uma micropipeta, depois foram transferidas para tubos de minicentrífuga, onde foram homogeneizadas por 5 min a 25°C. A seguir, adicionou-se 100 μ L de clorofórmio (Merck) a cada amostra, as quais foram

homogeneizadas por inversão por aproximadamente 15 s e incubadas a temperatura ambiente por 2 min. As amostras foram, então, centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min a 4°C e a fase aquosa (fase superior) foi transferida para tubos novos. Imediatamente após a transferência, 260 µL de álcool isopropílico (Merck) foram adicionados a cada amostra, que foram incubadas por 18 h a -20°C. Ao final desse período, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm por 10 min a 4°C, o sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado duas vezes com 500 mL de etanol 75%. Após homogeneização em vórtex, as amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 rpm por 5 min a 4°C, o *pellet* foi dissolvido em água DEPC (dietilpirocarbonato, Merck), no volume de 10 a 30 µL (dependendo do tamanho do *pellet*), e as amostras incubadas a 60°C por 10 min para permitir a completa dissolução do RNA. Finalmente, as amostras foram estocadas a -70°C até o momento de uso.

4.8.2 Purificação do RNA

A quantidade do RNA obtido foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (NanoDrop 1000, Thermo Scientific). Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems-Warrington, UK), seguindo as instruções do fabricante. Uma mistura contendo dNTPs, iniciadores randômicos (*random primers*), transcriptase reversa e inibidor de RNase (1 U/µl de *RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor* - Invitrogen Life Technologies, Califórnia, EUA) foi preparada e adicionada a um mesmo volume de RNA tratado anteriormente com *DNase I*. A reação de síntese de cDNA foi feita a 25 °C por 10 minutos seguida por 2 horas de incubação a 42 °C. Para interromper a reação, as amostras foram incubadas a 70°C por 15 min, e o cDNA sintetizado foi estocado a -20°C.

4.8.3 Ensaio de transcriptase reversa (RT-PCR)

Para a reação de qRT-PCR, foi utilizada a metodologia *TaqMan*. *Taqman* é uma sonda utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Essa sonda apresenta na

extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'→3' da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Os valores quantitativos foram obtidos no ponto no qual a fluorescência emitida ultrapassou um limiar de detecção estabelecido de 0,2 (CT: *Cycle Threshold*), ou seja, no ponto no qual a amplificação do produto foi detectada. Os dados de quantificação obtidos foram analisados pelo *software* de análise do aparelho ABI Prism 7900HT (Applied Biosystem).

4.8.4 Avaliação da expressão gênica do RNAm para as citocinas (PCR em tempo real)

A expressão diferencial do PPAR γ (gene alvo) foi determinada através do método de quantificação relativa em relação a um controle endógeno ou gene normalizador, no caso, o RNA ribossomal 18S. A reação de amplificação foi feita utilizando 1 μ l sondas TaqMan 20X (Applied Biosystem) para PPAR γ (Hs01115513_m1) e para o 18S (Hs03928990_g1). As condições de amplificação foram as seguintes: 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto à 60°C. Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001), seguindo a fórmula:

$$R = (E_{\text{alvo}})^{\Delta CT_{\text{alvo}} (\text{controle-tratado})} / (E_{\text{normalizador}})^{\Delta CT_{\text{normalizador}} (\text{controle-tratado})},$$

Onde:

E alvo: Eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o transcrito alvo;

E normalizador: Eficiência de amplificação dos *primers* específicos para o gene normalizador, no caso 18s;

Δ CT alvo: Corresponde à diferença entre o CT do gene obtido para a amostra de referência (controle) e do CT de gene obtido para a amostra em análise (tratado);

Δ CT normalizador: Corresponde à diferença entre o CT 18s obtido para a amostra de referência (controle) e do CT do 18s obtido para a amostra em análise (tratado).

As eficiências de amplificação dos *primers* foram calculadas de acordo com a equação:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})},$$

Onde o ***Slope*** corresponde à inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do CT do transcrito alvo e do normalizador em função do *log* de diferentes quantidades de cDNA.

4.9. Análise estatística

Todos os resultados foram avaliados por análise multivariada e usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. $P < 0,01$ foi considerado como associação significativa e $p < 0,05$ como sugestiva. Todos os dados quantitativos e gráficos foram elaborados usando o software GraphPad Prism versão 3.02. As variáveis que, na análise univariada apresentaram $p < 0.2$ foram submetidas a análise multivariada por regressão linear. A correlação dos níveis de citocinas e parâmetros clínicos e laboratoriais foi realizada pela análise de Pearson. Essa análise foi realizada com o software Origin 8.0724 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

RESULTADOS

5.RESULTADOS

5.1. ARTIGO I

Artigo Artigo publicado no PPAR Research, Volume 2013 (2013), Article ID 519724; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/519724>

O objetivo desse artigo foi revisar a ação dos agonistas do receptores ativados por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR γ) na imunidade adaptativa, particularmente em células T e células B assim como na expressão das citocinas implicadas nos mecanismos efetores de imunidade desses tipos celulares. Algumas doenças inflamatórias e autoimunes são causadas por distúrbios da imunidade adaptativa. Os avanços na compreensão da patogênese das doenças autoimunes tem levado a busca de novo alvos moleculares e terapêuticos. Os PPAR γ são membros da superfamília de receptores nucleares e são fatores de transcrição envolvidos no metabolismo lipídico e também na imunidade inata e adaptativa. São receptores ativados por ligantes endógenos e sintéticos. Estudos prévios demonstraram que os ligantes agonistas do PPAR regulam a sobrevivência, ativação e diferenciação de células T em seus subtipos celulares: Th1, Th2, Th17 e T regulatórias (Tregs). Apesar de terem função na defesa contra patógenos, o desequilíbrio desses fenótipos celulares está relacionado as doenças autoimunes. Os agonistas do PPAR γ diminuem a expressão de citocinas relacionadas a fenótipos de células T helper relacionados a autoimunidade como a via Th1 (IL-12, IFN γ e IL-2) e Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-21, IL-23R) e também diminui a expressão do fator de transcrição relacionado a via Th17, o ROR γ t. Esses receptores aumentam a expressão de citocinas relacionadas a subpopulações celulares Th2 (IL-10, IL-5 e IL-13) e estão associados aumento do número de células T regulatórias. Também estão relacionados à expressão dos linfócitos B aumentando a apoptose destas células e diminuindo a produção de anticorpos. Nesse sentido, os agonistas do PPAR γ parecem ser alvos terapêuticos e moleculares promissores na abordagem das doenças autoimunes e inflamatórias.

PPAR γ Agonists in Adaptive Immunity: What Do Immune Disorders and Their Models Have to Tell Us?

LAURINDO FERREIRA da ROCHA Jr, ANDRÉA TAVARES DANTAS, ÂNGELA LUZIA BRANCO PINTO DUARTE, MOACYR JESUS BARRETO DE MELO REGO, IVAN da ROCHA PITTA and MAIRA GALDINO da ROCHA PITTA

ABSTRACT.

Adaptive immunity has evolved as a very powerful and highly specialized tool of host defense. Its classical protagonists are lymphocytes of the T- and B-cell lineage. Cytokines and chemokines play a key role as effector mechanisms of the adaptive immunity. Some autoimmune and inflammatory diseases are caused by disturbance of the adaptive immune system. Recent advances in understanding the pathogenesis of autoimmune diseases have led to research on new molecular and therapeutic targets. PPAR γ are members of the nuclear receptor superfamily and are transcription factors involved in lipid metabolism as well as innate and adaptive immunity. PPAR γ is activated by synthetic and endogenous ligands. Previous studies have shown that PPAR agonists regulate T-cell survival, activation and T helper cell differentiation into effector subsets: Th1, Th2, Th17, and Tregs. PPAR γ has also been associated with B cells. The present review addresses these issues by placing PPAR γ agonists in the context of adaptive immune responses and the relation of the activation of these receptors with the expression of cytokines involved in adaptive immunity.

Adaptive immunity is a very powerful and specialized tool of host defense. The T- and B-cell lymphocytes are classically involved in the adaptive immune system. Disturbances of the adaptive immunity results in autoimmunity. Immune dysfunction associated with autoimmune diseases was known to be caused by an imbalance between Th1 and Th2 cells. Autoimmune diseases could be categorized as predominantly Th1-driven if the major events were cell mediated in nature, or predominantly Th2 driven if antibodies and/or immune

complexes served as the main mediators [1]. In the last years, a third subset named Th17 cells has been identified, and the Th1/Th2 imbalance hypothesis has shifted to an involvement of the Th1/Th2/Th17/regulatory T (Treg) lymphocytes with the same Th precursor cells [2]. B-cell activation and antibody production can be either an independent T-cell help processor B cells receiving help from follicular T cells. In autoimmune diseases, the contact with self-antigen leads to B-cell activation and, therefore, these lineage of cells are of great importance in adaptive immunity. Naïve B cells develop into antibody-producing plasma cells through the contact with antigen in combination with TLR-agonists and cytokines. Activation of B cells also results in differentiation into plasmablasts and increased cytokine production [3].

The nuclear receptor (NR) superfamily is composed of 48 members and includes receptors for steroid hormones, thyroid hormone, various lipids, and oxysterols. NRs function as ligand-dependent transcription factors and share a modular domain structure [4]. PPAR-gamma (PPAR γ) belongs to the nuclear receptor superfamily. These transcription factors function as receptors for various lipid-soluble, small molecules that are most commonly generated as hormones or in the intermediary metabolic pathways [5]. These receptors regulate gene expression upon heterodimerization with the retinoid X receptor by ligating to peroxisome proliferator response elements (PPREs) in the promoter region of target genes. These genes are regulated through ligand-dependent transcriptional activation. Several of these target genes are involved in metabolic homeostasis [6]. The PPAR γ Express two isoforms, PPAR- γ 1 and PPAR- γ 2. PPAR- γ 1 is expressed in macrophages, colonic epithelial cells, endothelial cells, and vascular smooth muscle cells. PPAR- γ 2 is mainly expressed in adipose tissue and is involved in the regulation of adipogenesis [7]. PPAR γ activation in immune cells predominantly results in another mechanism of action: transrepression of proinflammatory gene expression [8]. Transrepression does not involve binding of the nuclear receptor to its cognate DNA element, but here PPAR γ operates by antagonizing signal-dependent activation of its target genes by other classes of transcription factors, including NF- κ B and AP-1 proteins, thereby reducing inflammatory signaling pathways [9]. PPAR γ expression in the monocyte/macrophage lineage was

demonstrated by the suppression of the activation of monocyte/macrophages by PPAR γ agonists. In addition to their role in the anti-inflammatory response of innate immune cells, PPARs are involved in mediating the adaptive immune responses of T and B cells [10]. PPAR γ is activated by diverse synthetic and naturally occurring substances. Many ligands that activate and modulate PPAR functions have been identified [10]. Naïve and activated T cells express PPAR γ , and ligands for the receptor inhibit proliferation and significantly decrease cell viability [11]. Activated B cells upregulate their expression of PPAR γ [12]. In this review, we will summarize the recent progress in PPAR γ studies and the interplay of these nuclear receptors with adaptive immunity and T and B cells.

2. Th1 Lymphocytes

Th1 cells secrete interferon- (IFN-) γ , interleukin- (IL-) 2, and tumor necrosis factor (TNF) and control protection against infection with intracellular microbes. Maturation of Th1 cells is controlled by IL-12 and transcription factor T-bet. During Th1 cell differentiation, IL-12 signals via the IL-12R/STAT4 signalling pathway inducing IFN- γ expression, the secreted IFN- γ then signals through the IFN- γ R/STAT1 pathway to further increase IFN- γ levels, forming a positive autoregulatory loop reinforcing Th1 differentiation. The signal transducer and activator (STAT) proteins STAT1 and STAT4 induce the expression of the Th1-specific transcription factor T-box expressed in T cells (T-bet) [13]. Inappropriate activation of Th1 cells in response to self-antigen or innocuous antigens leads to autoimmune states as well as to hypersensitive states in which T-cell tolerance to environmental antigens fails [14].

PPAR γ agonists have been shown to decrease IL-2 production in activated T cells and thereby to enhance apoptosis. The modulation of T-cell activity is due to inhibition of IL-2 production in T-cell-receptor-stimulated Th cells and due to suppression of Th2 cell differentiation. The endogenous ligand 15-deoxy-Delta¹², 14-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), and the synthetic ligand ciglitazone inhibit IL-2 secretion by T cell clones in murine cells [6, 15]. High amounts of IL-2 and IFN- γ were detected in the supernatant of antigen stimulated splenocytes from PPAR γ ^{+/-} mice [16]. Studies demonstrated that

lymphocyte-derived IFN- γ interferes with PPAR γ ligand regulation of MAPK activation in murine macrophages *in vitro* [17]. PPAR γ ligands decreased the level of IFN γ production in splenocytes and T-cell clones isolated from SJL mice [15]. Treatment with pioglitazone changes the helper T-cell balance from Th1 to Th2 in the myocardium of rats with autoimmune myocarditis by upregulating the mRNA of Th2 cytokine IL-4 and by reducing the mRNA level of Th1 cytokine IFN- γ [18]. Pioglitazone also reduced IFN- γ production in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the inflammatory demyelinating disease model of multiple sclerosis (MS) [19]. *In vivo* treatment with the PPAR-ligand THR0921 resulted in reduced production of TNF- α , IL-1 β , and IFN- γ by spleen cells cultured for 48 h with either lipopolysaccharide (LPS) or type II collagen (CII) compared with cells from vehicle-treated collagen-induced arthritis (CIA) mice [20]. PPAR γ agonists decrease lupus-related nephritis through decreased IFN- γ and nitric oxide production in MRL/lpr mice *in vivo* [21]. Treatment of diabetic mice with rosiglitazone resulted in a significant decrease in the pancreatic level of TNF- α and IFN- γ compared to untreated diabetic mice [22].

In human cells, it has been demonstrated that nuclear factor of activated T cells (NFAT) is negatively regulated by PPAR γ activation with troglitazone and 15d-PGJ2 through blockade of NFAT DNA binding and transcriptional activity and subsequent inhibition of IL-2 production [23]. IL-2 protein expression was also downregulated by rosiglitazone [24]. The endogenous PPAR γ agonist 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) downregulated IL-2 production by human peripheral blood T lymphocytes by reducing NFAT and NF- κ B binding to the IL-2 promoter [25]. In PBMCs from patients with Hashimoto's thyroiditis (HT) and controls, rosiglitazone reduced IFN- γ expression by CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T lymphocytes in a dose-dependent manner, but the degree of inhibition was significantly greater in healthy subjects than in patients with HT. This *in vitro* resistance to immunomodulation might be due to the enhancement of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway [26]. The CXC chemokines (CXCL9, CXCL10, and CXCL11), inducible by IFN- γ , are proinflammatory molecules with chemoattractant activity for Th1 lymphocytes secreting IFN γ [27]. Rosiglitazone has recently been shown to inhibit IFN- γ and TNF induction of α -chemokine

CXCL10 release by cultured thyroid cells and orbital fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy [28]. Troglitazone has been demonstrated to modulate the level of IFN- γ production [29, 30]. The deletion of PPAR γ in CD4 $^{+}$ T cells results in enhanced antigen-specific proliferation and overproduction of IFN- γ in response to IL-12 highlighting the importance of expression of PPAR γ in CD4 $^{+}$ T cells in downregulating excessive Th1 responses [31]. 15d-PGJ2 suppressed T-cell proliferation and IFN- γ secretion *in vitro* by both Con A- and myelin basic protein (MBP) Ac1–11 peptide-stimulated lymphocytes. MBP is used to induce EAE in rodents. The ability of T cells to adoptively transfer EAE is suppressed when these cells are cultured with 15d-PGJ2 *in vitro* [32]. 15d-PGJ2 acts cooperatively with 9-*cis* retinoic acid, the ligand for the retinoid X receptor (RXR), in inhibiting microglial cell activation. Microglia participate in pathology associated with multiple sclerosis (MS) [33]. The PPAR γ ligands, 15d-PGJ2, troglitazone, and pioglitazone, can inhibit the IFN- γ -induced expression of the CXC chemokines inducing protein-10 and monokine induced by IFN- γ /IFN-inducible T-cell α chemoattractant by endothelial cells [34]. In addition, T-cell-specific PPAR γ -deficient mice are suggested to be defective in accumulating T effector cells in secondary lymphoid organs and tissues and therefore in their ability to produce IFN- γ and IL-17 in inflammatory sites [26, 35].

IL-12 plays a crucial role in the differentiation of T lymphocytes and immunity against pathogens. The development of EAE was also found to be associated with an increase in the expression of IL-12 in the central nervous system (CNS) and lymphoid organs [36, 37]. The PPAR γ agonists 15d-PGJ2 and ciglitazone inhibit EAE by blocking IL-12 production in macrophage and microglial cells, IL-12 signaling, and Th1 cell differentiation [38, 39]. The endogenous ligand 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE), a major oxidized lipid component of oxLDL, significantly inhibited IL-12 production in lipopolysaccharide- (LPS-) stimulated mouse macrophages and also suppressed NF- κ B-mediated activation in IL-12 p40 promoter [40].

The inhibition of IL-12 production by dendritic cells through ligand-activated PPAR γ , as well as the inhibition of IFN γ production by T cells, indicates that this nuclear hormone receptor might be involved in the

differentiation of naive T cells into their effector subsets. These data highlight that PPAR γ play important roles in Th1-cell survival, activation, and differentiation.

3. Th2 Cell

Th2 cells classically mediate host defense against extracellular parasites. They are also important in the induction and persistence of asthma and other allergic inflammatory diseases. Th2 cells can produce IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, and IL-25. IL-4 plays a positive feedback for Th2 cell differentiation through the transcription factor STAT-6 and expression of GATA-3 [41]. Although Th2 cells are not major effectors in the pathogenesis of most autoimmune diseases, in some instances induction of a Th2 response during ongoing autoimmune inflammation can be of therapeutic value, especially considering the potential of Th2 cells to modulate the generation of Th1 cells and their interactions with B cells. Th2 cytokines can stimulate proliferation, activation, and isotype switching of B cells and aid in the production of autoantibodies by providing help to autoreactive B cells [42, 43]. Furthermore, Th2 cytokines, like IL-5, can promote induction of Ag-specific Tregs, contributing to restore autoimmune tolerance [44].

Studies of gene expression have shown that polarized Th2 cells express greater levels of PPAR γ 2 mRNA than Th1 cells [45]. The exact interaction between PPAR γ and IL-4 is not fully understood, and it seems to depend on the context and on the ligand type involved. Treatment with pioglitazone increased expression levels of IL-4 in a model of autoimmune myocarditis, and there was an amelioration of the inflammation [18]. This report agrees with previous description of improvement of acute colitis after thiazolidine treatment (troglitazone, pioglitazone, and rosiglitazone) by decreasing TNF α and IFN γ and increasing IL-4, IL-10, and transcription factor GATA-3 expression [46, 47]. Recently, pioglitazone attenuated the neurological signs in a model of experimental autoimmune neuritis in rats by the inhibition of Th1 cytokines production (TNF α and IFN γ) and increased secretion of IL-4 [48]. In PBMC from Hashimoto's thyroiditis patients, rosiglitazone produced no inhibitory effect on IL-4 expression by CD4 $^{+}$ T lymphocytes [26].

On the other hand, significant inhibition of IL-4 production in T cells by natural and synthetic PPAR γ agonists (15d-PGJ2 and ciglitazone) was reported [7]. In this study, the inhibitory effect was explained, at least in part, by downregulation of NF-AT (nuclear factor of activated T cells) activation, another proinflammatory signal transduction pathway [7]. This finding was subsequently confirmed by other authors [49, 50]. Furthermore, it was demonstrated that a nonthiazolidinedione PPAR γ ligand (KR62980), but not rosiglitazone, decreased IL-4, IL-5, and IL-13 levels and Th2 cell differentiation *in vitro*, by reducing the expression of c-Maf, a Th2-specific transcription factor [51]. These findings suggest that PPAR γ activation could have an antiinflammatory effect on Th2-mediated diseases.

It was also demonstrated that IL-4 and IL-13 could upregulate PPAR γ gene expression in CD4⁺ T cells, peripheral monocytes, peritoneal macrophages, and airway epithelial [52–55]. These authors also showed that IL-4 induces the expression and activity of 12/15-lipoxygenase, enzyme that catalyzes the synthesis of the PPAR γ ligands 12-HETE, 15-HETE, and 13-HODE. This finding reinforces the important role of this cytokine in inflammation by coordinately inducing the expression of PPAR γ receptor and its ligands and, consequently, proinflammatory gene repression [52, 53].

IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that downregulates cellular immunity and allergic inflammation, by inhibiting activation and effector function of T cells, monocytes, and macrophages; downregulating IL-4 and IL-5 expression by T-helper type 2 cell lymphocytes and decreasing eosinophil survival and IgE synthesis [56, 57]. In a mouse model of asthma, the administration of rosiglitazone or pioglitazone increased IL-10 levels in lung tissue and decreased IL-4 and IL-5 levels, indicating a protective role for the receptor in inflammatory diseases [50]. The PPAR γ agonists effects seem to depend on dose and cell type, since low concentrations of rosiglitazone induced production of IL-10 from mature dendritic cells and activated CD4⁺ T cells, but these effects were not identified with higher doses or in immature cells. This production was mediated by PPAR γ receptors, and it was also described as a functional PPRE in the IL-10 gene promoter [58].

Some studies have suggested that PPAR γ agonists may also have some proinflammatory activity in which 15d-PGJ2 can inhibit IL-10 action by blocking STAT1 and STAT3 PPAR Research activation. This inhibition was not specific for IL-10, as STAT activation by IFN γ or IL-6 is also inhibited by the compound [59]. Thus, some PPAR γ ligands can exert their pro- or anti-inflammatory properties through a PPAR γ -independent way.

IL-33 can act directly on Th2 cells increasing the secretion of Th2 cytokines such as IL-5 and IL-13 and can also act as a chemoattractant for Th2 cells [60, 61]. It was demonstrated that treatment with PPAR γ agonists (15d-PGJ2 and rosiglitazone) could also reduce the production of IL-33, and they have been implicated in the pathogenesis of some inflammatory diseases mediated by eosinophils, like asthma [62].

In addition to downregulating Th1 proinflammatory cytokines, PPAR γ ligands can present anti-inflammatory effects by promoting the production of anti-inflammatory Th2 cytokines. Thus, PPAR γ was suggested to modulate the orientation of immune responses in favor of Th2 responses, but the studies are not uniform.

4. Th17 Pathway

Recently, a new subset of T cells has been identified named TH17 cells and characterized by the production of IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, and IL-23. Th17 cell differentiation is enhanced by the coordinated functions of distinct cytokines including TGF β , IL-6, IL-21, and IL-23, whereas IL-2, IL-4, IFN γ , and IL-27 inhibit its differentiation. The IL-17^a and IL-17F induce proinflammatory cytokines like IL-6, IL-1, TNF, and proinflammatory chemokines like CXCL1, GCP-2, and IL-8 and thus promote tissue inflammation and recruitment of neutrophils to the site of inflammation [63]. This cell population has been implicated in the development of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and inflammatory bowel disease and has been studied in mouse models of autoimmunity, such as experimental autoimmune encephalomyelitis, inflammatory bowel disease, and collagen-induced arthritis [64–67]. In several autoimmune diseases, Th17 cells are recruited to inflamed

tissues and promote inflammation by enhancing cytokine production, which can in turn activate B-cell antibody production, activate dendritic cells, and stimulate resident cells in the target tissues [57].

Pharmacological PPAR γ activation selectively impairs differentiation into Th17 cells. Under physiological conditions, the corepressor SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors) is bound to the ROR γ t promoter and inhibits its transcription. PPAR γ activation is thought to prevent removal of this corepressor complex, thus suppressing ROR γ t expression and ROR γ t-induced Th17 cell differentiation [67, 68]. In PPAR γ knockout mice (PPAR γ ^{-/-}), Th17 differentiation was strongly increased. In a model of EAE, characterized by increased infiltration of Th17 cells into the central nervous system, pioglitazone treatment alleviated the disease severity of EAE, and PPAR γ ^{-/-} mice were reported to exhibit enhanced disease severity. In CD4⁺ T cells isolated from the central nervous system (CNS) of these EAE mice, endogenous (13-HODE) and synthetic (pioglitazone) PPAR γ agonists suppressed Th17 differentiation, but not Th1, Th2, or Treg differentiation. A decreased expression of Th17 cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, and IL-23R and a selective inhibition of TGF β /IL-6-mediated expression of ROR γ t were also demonstrated [69].

IL-23 belongs to IL-12 cytokine family and represents an important cytokine implicated as being responsible for Th17 phenotype maintenance and survival [70, 71]. PPAR γ agonists (15d-PGJ2 and rosiglitazone) inhibited the induction of IL-23 protein by LPS-stimulated CNS cells [72]. In models of allergic asthma, treatment with PPAR γ agonists (15d-PGJ2 and rosiglitazone and pioglitazone) promoted the reduction of IL-17 and IL-23 [62, 73]. These studies demonstrate that PPAR γ activation can regulate the differentiation and function of Th17 cells, by suppressing Th17 cell development and decreasing Th17 cytokines.

5. T Regulatory (Treg) Cells

Treg cells suppress autoimmune responses and also other aberrant or excessive immune responses to nonself-antigens. Depletion of CD25⁺CD4⁺

Treg cells, which constitute 5%–10% of CD4⁺ T cells, produces autoimmune diseases such as inflammatory bowel disease in normal mice [74]. Expression of PPAR γ by macrophages and epithelial cells is required for protection against dextran sodium sulfate colitis [75,76]. These Treg cells express FoxP3, a transcription factor essential for their development and function [77]. PPAR γ -expressing Treg effectively reduce IFN- γ -producing CD4⁺T cells. Therefore, the loss of PPAR γ in Treg impairs their ability to control effector CD4⁺ T-cell responses preventing protection against colitis in a mouse model of intestinal inflammation suggesting that expression of PPAR γ by Tregs is required for optimal anti-inflammatory efficacy [31].

PPAR γ deficiency leads to decreased numbers of CD4⁺Foxp3⁺ T cells and increased CD4⁺IFN- γ ⁺ cells, suggesting that PPAR γ plays a role in Treg survival and regulation of effector T-cell functions. Similarly, T-cell-specific PPAR γ -deficient mice showed reduced Treg recruitment to mesenteric lymph nodes and increased expression of apoptosis-related genes [78]. In addition, ciglitazone or PGE₂ treatment of naïve CD4⁺ T cells enhanced induction of Foxp3⁺ inducible regulatory T cells, suggesting that PPAR γ may contribute to the quality and quantity of Treg functions *in vivo*. PPAR γ regulates induction of Tregs through retinoic acid-mediated dendritic cells (DCs) [79, 80].

Foxp3⁺ Treg cells are abundant in visceral adipose tissue and have a different T-cell receptor repertoire compared with Treg cells in other tissues [81]. These cells specifically express the PPAR γ and its stimulation by pioglitazone and increase Treg cell numbers in the visceral adipose tissue [82]. These findings suggest that PPAR γ -expressing Treg cells in adipose tissue might control inflammation in obesity, providing a new link between immunoregulation and metabolic disease [83].

6. B Cells

The exact role of B cells in the pathogenesis of autoimmune diseases is still matter of research. One previous hypothesis proposed that autoimmune disease develops as a result of persistence of self-reactive clones of lymphocytes that should have been deleted via normal immune tolerance, although some had suggested that this could be an epiphenomena.

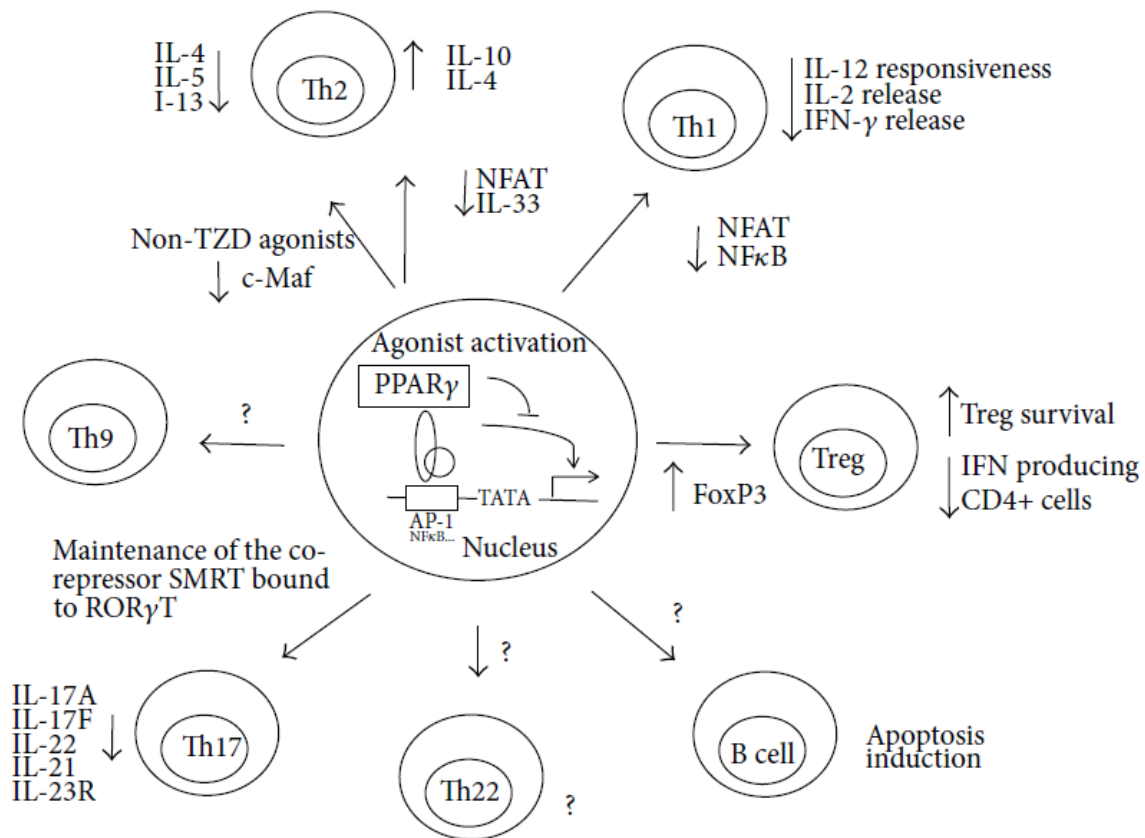


Figure 1: Effects of PPAR γ agonists on cytokine expression and on lymphocytes involved in adaptive immunity. ? Represents mechanisms that are not well elucidated.

The success of B-cell depletion therapy in autoimmune diseases, particularly in rheumatoid arthritis (RA) [84], systemic lupus erythematosus (SLE) [85], antineutrophil cytoplasmic antibody- (ANCA-) related vasculitides [86], and multiple sclerosis [87], reinforces the importance of B cells in the pathogenesis [88].

Papers discussing the role of PPAR γ agonists in B cells focus on the induced apoptosis by natural and synthetic agonists. The PPAR γ mRNA and protein expression in mouse B cells is described, and it has been suggested that PPAR γ agonists (15d PGJ2) could be involved in the induction of apoptosis in B lymphocytes [89]. The same group demonstrated the nuclear and cytoplasmic expression of PPAR γ in normal human B lymphocytes. An antiproliferative effect of natural (15d PGJ2) and synthetic PPAR γ ligands (ciglitazone) on human B cells through inducing apoptosis is also shown [90].

On the other hand, PPAR γ expression was increased in human activated B cells as compared to nonactivated cells. Using low doses of PPAR γ ligands (15-d-PGJ2 and rosiglitazone), they found an increase of B-cell proliferation and IgM and IgG antibody production. These effects were related to activation of the cells: activated B cells, which had higher PPAR γ levels, can respond to PPAR γ ligands, while nonactivated B cells, with low PPAR γ expression, were not able to activate PPAR γ upon low-dose PPAR γ ligand exposure. There was also a raise of stimulated memory B cells differentiation to plasma cells [12]. In an animal model of asthma, 15d-PGJ2 inhibited LPS-induced B cell proliferation [62], and, in peripheral blood mononuclear cells of atopic dermatitis patients, there was significant inhibition of IgE synthesis [49].

The role of PPAR γ in B cells in autoimmune diseases is less well documented. In PPAR γ heterozygote knockout mice (PPAR $\gamma^{+/-}$), in which PPAR γ expression is reduced by 50%, B-cell proliferative response was enhanced, but not T cells. Furthermore, PPAR $\gamma^{+/-}$ mice developed more severe antigen-induced arthritis, that was suggested to be due to B-cell hyperreactivity. However, the production of T-cell derived cytokines was also enhanced, since higher amounts of both IL-2 and IFN- γ were detected in the supernatant of antigen stimulated splenocytes from PPAR $\gamma^{+/-}$ mice, and it was suggested that the alteration in T-cell function caused by reduced PPAR γ expression could be responsible for the results [16].

The interaction between T and B cells and the autoantibody production are key elements in the SLE pathogenesis. Recently, some studies have suggested the PPAR γ participation in this complex disease. An increased PPAR γ expression in patients with active SLE was described [91]. PPAR γ agonist rosiglitazone was shown to reduce autoantibody production and ameliorate renal disease in a murine SLE model [92]. Ciglitazone inhibited IgE production in nonallergic and atopic dermatitis models *in vitro* and *in vivo* [49]. Indeed, these effects are not proven directly mediated by activated B lymphocytes, but rather indirectly mediated via regulatory signal pathways of other cell types. Reduction in PPAR γ expression increases T-cell proliferation and skews toward Th1 immune response, which includes increased IFN γ and IL-

12 production [16, 38]. These cytokines can directly influence B-cell function, including plasma cell formation, proliferation, and antibodies production [93–95].

7. Perspectives

In conclusion, PPAR γ agonists are important modulators of the inflammatory process and lymphocyte homeostasis. Currently, there is evidence to support that PPAR γ is involved in Th lymphocyte differentiation, B lymphocyte effector functions, and cytokine expression. Figure 1 summarizes the effects of PPAR γ agonists on cytokine expression and on T regulatory cells and B cells. PPAR γ is expressed by the main cell types of adaptive responses. Natural and synthetic PPAR γ ligands proved to be capable of inhibiting major signaling pathways of adaptive immunity, reducing or augmenting the expression of cytokines. In fact, PPAR γ ligands were shown to inhibit the production of several proinflammatory cytokines. Thus, further studies are necessary to clarify the use of PPAR γ antagonists in diseases driven by the Th imbalance such as autoimmune diseases. The actions of these compounds at the cellular levels and their proven immunomodulatory effects make it worth considering their use in clinical trials exploring the possibilities that these drugs might help in the treatment of immune diseases.

Acknowledgments

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

REFERENCES

- [1] D. O. Gor, N. R. Rose, and N. S. Greenspan, “TH1-TH2: a procrustean paradigm,” *Nature Immunology*, vol. 4, no. 6, pp. 503–505, 2003.
- [2] L. E. Harrington, R. D. Hatton, P. R. Mangan et al., “Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages,” *Nature Immunology*, vol. 6, no. 11, pp. 1123–1132, 2005.

- [3] H. U. Scherer and G. Burmester, "Adaptive immunity in rheumatic diseases-bystander or pathogenic player?" *Best Practice and Research*, vol. 25, no. 6, pp. 785–800, 2011.
- [4] T. P. Burris, S. A. Busby, and P. R. Griffin, "Targeting orphan nuclear receptors for treatment of metabolic diseases and autoimmunity," *Chemistry and Biology*, vol. 19, no. 1, pp. 51–59, 2012.
- [5] A. Szanto and L. Nagy, "The many faces of PPAR γ : antiinflammatory by any means?" *Immunobiology*, vol. 213, no. 9-10, pp. 789–803, 2008.
- [6] R. B. Clark, D. Bishop-Bailey, T. Estrada-Hernandez, T. Hla, L. Puddington, and S. J. Padula, "The nuclear receptor PPAR γ and immunoregulation: PPAR γ mediates inhibition of helper T cell responses," *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 3, pp. 1364–1371, 2000.
- [7] S. W. Chung, B. Y. Kang, and T. S. Kim, "Inhibition of Interleukin-4 Production in CD4⁺ T Cells by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ (PPAR- γ) Ligands: involvement of Physical Association between PPAR- γ and the Nuclear Factor of Activated T Cells Transcription Factor," *Molecular Pharmacology*, vol. 64, no. 5, pp. 1169–1179, 2003.
- [8] M. V. Schmidt, B. Brune, and A. Von Knethen, "The nuclear hormone receptor PPAR γ as a therapeutic target in major diseases," *The Scientific World Journal*, vol. 10, pp. 2181–2197, 2010.
- [9] B. Cariou, B. Charbonnel, and B. Staels, "Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 23, no. 5, pp. 205–215, 2012.

- [10] J. Choi and A. L. M. Bothwell, "The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases," *Molecules and Cells*, vol. 33, no. 3, pp. 217–222, 2012.
- [11] S. G. Harris and R. P. Phipps, "The nuclear receptor PPAR γ is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR γ agonists induce apoptosis," *European Journal of Immunology*, vol. 31, no. 4, pp. 1098–1105, 2001.
- [12] T. M. Garcia-Bates, C. J. Baglioni, M. P. Bernard, T. I. Murr, P. J. Simpson-Haidaris, and R. P. Phipps, "Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands enhance human B cell antibody production and differentiation," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 11, pp. 6903–6912, 2009.
- [13] H. Bowen, A. Kelly, T. Lee, and P. Lavender, "Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells," *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 38, no. 9, pp. 1422–1431, 2008.
- [14] A. Cope, G. Le Frere, J. Cardone, and C. Kemper, "The Th1 lifecycle: molecular control of IFN- γ to IL-10 switching," *Trends in Immunology*, vol. 32, no. 6, pp. 278–286, 2011.
- [15] R. Cunat, M. Ricote, D. Di Campli et al., "Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator-activated receptors," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 6, pp. 2795–2802, 2002.
- [16] K. Setoguchi, Y. Misaki, Y. Terauchi et al., "Peroxisome proliferator-activated receptor- γ haploinsufficiency enhances B cell proliferative responses and exacerbates experimentally induced arthritis," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 108, no. 11, pp. 1667–1675, 2001.
- [17] D. G. Alleva, E. B. Johnson, F. M. Lio, S. A. Boehme, P. J. Conlon, and P. D. Crowe, "Regulation of murine macrophage proinflammatory and anti-inflammatory

cytokines by ligands for peroxisomeproliferator-activated receptor- γ : counter-regulatoryactivity by IFN- γ ,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 71, no. 4,pp. 677–685, 2002.

[18] H. Hasegawa, H. Takano, Y. Zou et al., “Pioglitazone, a peroxisomeproliferator-activated receptor γ activator, amelioratesexperimental autoimmune myocarditis by modulating Th1/Th2balance,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 38,no. 2, pp. 257–265, 2005.

[19] D. L. Feinstein, E. Galea, V. Gavrilyuk et al., “Peroxisomeproliferator-activated receptor- γ agonists prevent experimentalautoimmune encephalomyelitis,” *Annals of Neurology*, vol. 51,no. 6, pp. 694–702, 2002.

[20] T.Tomita, Y. Kakiuchi, and P. S. Tsao, “THR0921, a novel peroxisomeproliferator-activated receptor gamma agonist, reducesthe severity of collagen-induced arthritis,” *Arthritis Research &Therapy*, vol. 8, no. 1, p. R7, 2006.

[21] C. M. Reilly, J. C.Oates, J. A. Cook, J.D.Morrow, P.V.Halushka,and G. S. Gilkeson, “Inhibition of mesangial cell nitric oxide inMRL/lpr mice by prostaglandin J2 and proliferator activationreceptor- γ agonists,” *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 3, pp.1498–1504, 2000.

[22] W. M. Awara, A. E. El-Sisi, M. El-Refaei, M. M. El-Naa, andK. El-Desoky, “Insulinotropic and anti-inflammatory effectsof rosiglitazone in experimental autoimmune diabetes,” *TheReview of Diabetic Studies*, vol. 2, no. 3, pp. 146–156, 2005.

[23] X. Y. Yang, L. H. Wang, T. Chen et al., “Activation of human Tlymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activatedreceptor γ (PPAR γ) agonists. PPAR γ co-association with transcriptionfactor NFAT,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275,no. 7, pp. 4541–4544, 2000.

- [24] N. Marx, B. Kehrle, K. Kohlhammer et al., "PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: PPAR Research 7 implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis," *Circulation Research*, vol. 90, no. 6, pp. 703–710, 2002.
- [25] X. Y. Yang, L. H. Wang, K. Mihalic et al., "Interleukin (IL)-4 indirectly suppresses IL-2 production by human T lymphocytes via peroxisome proliferator-activated receptor γ activated by macrophage-derived 12/15-lipoxygenase ligands," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 6, pp. 3973–3978, 2002.
- [26] O. E. Okosieme, A. B. Parkes, L. D. K. E. Premawardhana, A. W. Thomas, L. M. Evans, and J. H. Lazarus, "Peripheral cytokine expression in autoimmune thyroiditis: effects of *in vitro* modulation by rosiglitazone and dexamethasone," *Thyroid*, vol. 16, no. 10, pp. 953–960, 2006.
- [27] A. Antonelli, S. M. Ferrari, P. Fallahi et al., "Interferon- α , - β and - γ induce CXCL9 and CXCL10 secretion by human thyrocytes: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists," *Cytokine*, vol. 50, no. 3, pp. 260–267, 2010.
- [28] A. Antonelli, M. Rotondi, S. M. Ferrari et al., "Interferon- γ -inducible α -chemokine CXCL10 involvement in Graves' ophthalmopathy: modulation by peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists," *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 91, no. 2, pp. 614–620, 2006.
- [29] P. Augstein, A. Dunger, P. Heinke et al., "Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by troglitazone is associated with modulation of ICAM-1 expression on pancreatic islet cells and IFN- γ expression in splenic T cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 304, no. 2, pp. 378–384, 2003.

- [30] A. E. Giorgini, P. E. Beales, A. Mire-Sluis, D. Scott, R. Liddi, and P. Pozzilli, "Troglitazone exhibits immunomodulatory activity on the cytokine production of activated human lymphocytes," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 31, no. 1, pp. 1–4, 1999.
- [31] R. Hontecillas and J. Bassaganya-Riera, "Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required for regulatory CD4⁺ T cell-mediated protection against colitis," *Journal of Immunology*, vol. 178, no. 5, pp. 2940–2949, 2007.
- [32] A. Diab, C. Deng, J. D. Smith et al., "Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis," *Journal of Immunology*, vol. 168, no. 5, pp. 2508–2515, 2002.
- [33] A. Diab, R. Z. Hussain, A. E. Lovett-Racke, J. A. Chavis, P. D. Drew, and M. K. Racke, "Ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor- γ and the retinoid X receptor exert additive anti-inflammatory effects on experimental autoimmune encephalomyelitis," *Journal of Neuroimmunology*, vol. 148, no. 1-2, pp. 116–126, 2004.
- [34] N. Marx, F. Mach, A. Sauty et al., "Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activators inhibit IFN- γ -induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells," *Journal of Immunology*, vol. 164, no. 12, pp. 6503–6508, 2000.
- [35] W. J. Housley, C. O. Adams, A. G. Vang et al., "Peroxisome proliferator-activated receptor γ is required for CD4⁺ T cell-mediated lymphopenia-associated autoimmunity," *Journal of Immunology*, vol. 187, no. 8, pp. 4161–4169, 2011.
- [36] J. P. Leonard, K. E. Waldburger, S. J. Goldman, and H. W. Murray, "Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by

antibodies against interleukin 12,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 181, no. 1, pp. 381–386, 1995.

[37] J. P. Leonard, K. E. Waldburger, R. G. Schaub et al., “Regulation of the inflammatory response in animal models of multiple sclerosis by interleukin-12,” *Critical Reviews in Immunology*, vol. 17, no. 5-6, pp. 545–553, 1997.

[38] C. Natarajan and J. J. Bright, “Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 production, IL-12 signaling and Th1 differentiation,” *Genes and Immunity*, vol. 3, no. 2, pp. 59–70, 2002.

[39] P. D. Drew and J. A. Chavis, “The cyclopentanone prostaglandin 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J₂ represses nitric oxide, TNF- α , and IL-12 production by microglial cells,” *Journal of Neuroimmunology*, vol. 115, no. 1-2, pp. 28–35, 2001.

[40] S. W. Chung, B. Y. Kang, K. Kim et al., “Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor- γ and nuclear factor- κ B,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 42, pp. 32681–32687, 2000.

[41] J. Zhu and W. E. Paul, “CD4 T cells: fates, functions, and faults,” *Blood*, vol. 112, no. 5, pp. 1557–1569, 2008.

[42] R. R. Singh, “IL-4 and many roads to lupus-like autoimmunity,” *Clinical Immunology*, vol. 108, no. 2, pp. 73–79, 2003.

[43] S. A. Apostolidis, L. A. Lieberman, K. Kis-Toth, J. C. Crispin, and G. C. Tsokos, “The dysregulation of cytokine networks in systemic lupus erythematosus,” *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 31, no. 10, pp. 769–779, 2011.

- [44] G.T. Tran, S. J. Hodgkinson, N.M. Carter et al., "IL-5 promotes induction of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells that suppress autoimmunity," *Blood*, vol. 119, no. 19, pp. 4441–4450, 2012.
- [45] T. Chtanova, R. A. Kemp, A. P. R. Sutherland, F. Ronchese, and C. R. Mackay, "Gene microarrays reveal extensive differential gene expression in both CD4⁺ and CD8⁺ type 1 and type 2 T cells," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 6, pp. 3057–3063, 2001.
- [46] L. J. Saubermann, A. Nakajima, K. Wada et al., "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis," *Inflammatory Bowel Diseases*, vol. 8, no. 5, pp. 330–339, 2002.
- [47] K. Celinski, T. Dworzanski, R. Fornal, A. Korolczuk, A. Madro, and M. Slomka, "Comparison of the anti-inflammatory and therapeutic actions of PPAR-gamma agonists rosiglitazone and troglitazone in experimental colitis," *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 63, no. 6, pp. 631–640, 2012.
- [48] H. Ramkalawan, Y. Z. Wang, A. Hurbungs et al., "Pioglitazone, PPAR γ agonist, attenuates experimental autoimmune neuritis," *Inflammation*, vol. 35, no. 4, pp. 1338–1347, 2012.
- [49] R. Rühl, A. Dahten, F. J. Schweigert, U. Herz, and M. Worm, "Inhibition of IgE-production by peroxisome proliferator-activated receptor ligands," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 121, no. 4, pp. 757–764, 2003.
- [50] S. R. Kim, S. L. Kyung, S. P. Hee et al., "Involvement of IL-10 in peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated anti-inflammatory response in asthma," *Molecular Pharmacology*, vol. 68, no. 6, pp. 1568–1575, 2005.

- [51] H. Y. Won, H. J. Min, J. H. Ahn et al., "Anti-allergic function and regulatory mechanisms of KR62980 in allergen-induced airway inflammation," *Biochemical Pharmacology*, vol. 79, no. 6, pp. 888–896, 2010.
- [52] J. T. Huang, J. S. Welch, M. Ricote et al., "Interleukin-4-dependent production of PPAR- γ ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase," *Nature*, vol. 400, no. 6742, pp. 378–382, 1999.
- [53] M. Ricote, J. S. Welch, and C. K. Glass, "Regulation of macrophage gene expression by the peroxisome proliferator-activated receptor- γ ," *Hormone Research*, vol. 54, no. 5-6, pp. 275–280, 2000.
- [54] A. Dahten, S. Mergemeier, and M. Worm, "PPAR γ expression profile and its cytokine driven regulation in atopic dermatitis," *Allergy*, vol. 62, no. 8, pp. 926–933, 2007.
- [55] A. C. Wang, X. Dai, B. Luu, and D. J. Conrad, "Peroxisome proliferator-activated receptor- γ regulates airway epithelial cell activation," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 24, no. 6, pp. 688–693, 2001.
- [56] G. Del Prete, M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, and S. Romagnani, "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," *Journal of Immunology*, vol. 150, no. 2, pp. 353–360, 1993.
- [57] L. S. Davis, J. Hutcheson, and C. Mohan, "The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus," *Journal of Interferon and Cytokine Research*, vol. 31, no. 10, pp. 781–789, 2011.
- [58] P. W. Thompson, A. I. Bayliffe, A. P. Warren, and J. R. Lamb, "Interleukin-10 is upregulated by nanomolar rosiglitazone treatment of mature dendritic cells and human CD4⁺ T cells," *Cytokine*, vol. 39, no. 3, pp. 184–191, 2007.

- [59] J. D. Ji, H. J. Kim, Y. H. Rho et al., "Inhibition of IL-10-induced STAT3 activation by 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandinJ2," *Rheumatology*, vol. 44, no. 8, pp. 983–988, 2005.
- [60] M. Komai-Koma, D. Xu, Y. Li, A. N. J. McKenzie, I. B. McInnes, and F. Y. Liew, "IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells," *European Journal of Immunology*, vol. 37, no. 10, pp. 2779–2786, 2007.
- [61] M. Kurowska-Stolarska, P. Kewin, G. Murphy et al., "IL-33 induces antigen-specific IL-5⁺ T cells and promotes allergic induced airway inflammation independent of IL-4," *Journal of Immunology*, vol. 181, no. 7, pp. 4780–4790, 2008.
- [62] T. S. Farnesi-de-Assunção, C. F. Alves, V. Carregaro et al., "PPAR- γ agonists, mainly 15d-PGJ2, reduce eosinophil recruitment following allergen challenge," *Cellular Immunology*, vol. 273, no. 1, pp. 23–29, 2012.
- [63] E. Bettelli, T. Korn, M. Oukka, and V. K. Kuchroo, "Induction and effector functions of TH17 cells," *Nature*, vol. 453, no. 7198, pp. 1051–1057, 2008.
- [64] D. J. Cua, J. Sherlock, Y. Chen et al., "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain," *Nature*, vol. 421, no. 6924, pp. 744–748, 2003.
- [65] C. A. Murphy, C. L. Langrish, Y. Chen et al., "Divergent Pro and Anti-inflammatory Roles for IL-23 and IL-12 in Joint Autoimmune Inflammation," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 198, no. 12, pp. 1951–1957, 2003.
- [66] D. Yen, J. Cheung, H. Scheerens et al., "IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 116, no. 5, pp. 1310–1316, 2006.

- [67] L. Klotz and P. Knolle, "Nuclear receptors: TH17 cell control from within," *FEBS Letters*, vol. 585, no. 23, pp. 3764–3769, 2011.
- [68] E. S. Hwang, "Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation," *Yonsei Medical Journal*, vol. 51, no. 4, pp. 484–491, 2010.
- [69] L. Klotz, S. Burgdorf, I. Dani et al., "The nuclear receptor PPAR γ selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 10, pp. 2079–2089, 2009.
- [70] A. M. Mus, F. Cornelissen, P. S. Asmawidjaja et al., "Interleukin-23 promotes Th17 differentiation by inhibiting T-bet and FoxP3 and is required for elevation of Interleukin-22, but not Interleukin-21, in autoimmune experimental arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 62, no. 4, pp. 1043–1050, 2010.
- [71] C. J. Haines, Y. Chen, W. Blumenschein et al., "Autoimmune memory T helper 17 cell function and expansion are dependent on interleukin-23," *Cell Reports*, vol. 3, no. 5, pp. 1378–1388, 2013.
- [72] J. Xu and P. D. Drew, "Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists suppress the production of IL-12 family cytokines by activated glia," *Journal of Immunology*, vol. 178, no. 3, pp. 1904–1913, 2007.
- [73] S. J. Park, K. S. Lee, S. R. Kim et al., "Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist down-regulates IL-17 expression in a murine model of allergic airway inflammation," *Journal of Immunology*, vol. 183, no. 5, pp. 3259–3267, 2009.
- [74] K. Wing and S. Sakaguchi, "Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity," *Nature Immunology*, vol. 11, no. 1, pp. 7–13, 2010.

- [75] M. Adachi, R. Kurotani, K. Morimura et al., "Peroxisome proliferator-activated receptor γ in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease," *Gut*, vol. 55, no. 8, pp. 1104–1113, 2006.
- [76] Y. M. Shah, K. Morimura, and F. J. Gonzalez, "Expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in macrophages suppresses experimentally induced colitis," *American Journal of Physiology*, vol. 292, no. 2, pp. G657–G666, 2007.
- [77] S. Hori, T. Nomura, and S. Sakaguchi, "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3," *Science*, vol. 299, no. 5609, pp. 1057–1061, 2003.
- [78] A. J. Guri, S. K. Mohapatra, W. T. Horne II, R. Hontecillas, and J. Bassaganya-Riera, "The Role of T cell PPAR γ in mice with experimental inflammatory bowel disease," *BMJ Gastroenterology*, vol. 10, p. 60, 2010.
- [79] F. Baratelli, Y. Lin, L. Zhu et al., "Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4⁺ T cells," *Journal of Immunology*, vol. 175, no. 3, pp. 1483–1490, 2005.
- [80] E. A. Wohlfert, F. C. Nichols, E. Nevisus, and R. B. Clark, "Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and immunoregulation: enhancement of regulatory T cells through PPAR γ -dependent and -independent mechanisms," *Journal of Immunology*, vol. 178, no. 7, pp. 4129–4135, 2007.
- [81] M. Feuerer, L. Herrero, D. Ciolletta et al., "Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters," *Nature Medicine*, vol. 15, no. 8, pp. 930–939, 2009.
- [82] D. Ciolletta, M. Feuerer, A. Li et al., "PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells," *Nature*, vol. 486, no. 7404, pp. 549–553, 2012.

- [83] M.Hamaguchi and S. Sakaguchi, "Regulatory T cells expressing PPAR- γ control inflammation in obesity," *Cell Metabolism*, vol.16, no. 1, pp. 4–6, 2012.
- [84] J. C. W. Edwards, L. Szczepański, J. Szechiński et al., "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis," *New England Journal of Medicine*, vol.350, no. 25, pp. 2572–2581, 2004.
- [85] D. A. Isenberg, "Treating patients with lupus with B-cell depletion," *Lupus*, vol. 17, no. 5, pp. 400–404, 2008.
- [86] J. H. Stone, "Rituximab versus cyclophosphamide for ANCA-associated vasculitis," *The New England Journal of Medicine*, vol.363, no. 3, pp. 221–232, 2010.
- [87] K. Hawker, P. O'Connor, M. S. Freedman et al., "Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial," *Annals of Neurology*, vol. 66, no. 4, pp. 460–471, 2009.
- [88] F. McQueen, "A B cell explanation for autoimmune disease: the forbidden clone returns," *Postgraduate Medical Journal*, vol. 88, no. 1038, pp. 226–233, 2012.
- [89] J. Padilla, K. Kaur, H. J. Cao, T. J. Smith, and R. P. Phipps, "Peroxisome proliferator activator receptor- γ agonists and 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ2 induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells," *Journal of Immunology*, vol. 165, no. 12, pp.6941–6948, 2000.
- [90] J. Padilla, E. Leung, and R. P. Phipps, "Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR- γ and are killed by PPAR- γ agonists," *Clinical Immunology*, vol. 103, no. 1, pp. 22–33, 2002.

- [91] D. S. Ozer, L. C. Godoy, E. Borba et al., "PPAR γ expression is increased in systemic lupus erythematosus patients and represses CD40/CD40L signaling pathway," *Lupus*, vol. 20, no. 6, pp. 575–587, 2011.
- [92] T. Aprahamian, R. G. Bonegio, C. Richez et al., "The peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist rosiglitazone ameliorates murine lupus by induction of adiponectin," *Journal of Immunology*, vol. 182, no. 1, pp. 340–346, 2009.
- [93] L. A. Vogel, L. C. Showe, T. L. Lester, R. M. McNutt, V. H. VanCleave, and D. W. Metzger, "Direct binding of IL-12 to human and murine B lymphocytes," *Int Immunol*, vol. 8, no. 12, pp. 1955–1962, 1996.
- [94] B. Dubois, C. Massacrier, B. Vanbervliet et al., "Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes," *Journal of Immunology*, vol. 161, no. 5, pp. 2223–2231, 1998.
- [95] D. M. Estes, W. Tuo, W. C. Brown, and J. Goin, "Effects of type I/type II interferons and transforming growth factor- β on B-cell differentiation and proliferation. Definition of costimulation and cytokine requirements for immunoglobulin synthesis and expression," *Immunology*, vol. 95, no. 4, pp. 604–611, 1998.

5.2. ARTIGO II

Artigo publicado no The Journal of Rheumatology Volume 39, no. 7(2012);1320-1325 doi:10.3899/jrheum.111027

A interleucina-22 tem sido descrita na literatura como papel anti-inflamatório e pró-inflamatório dependendo do tecido que a expressa. Estudos prévios descrevem o papel inflamatório dessa citocina em doenças autoimunes, como na AR. Esse trabalho teve como objetivo analisar o papel da IL-22 na AR e foi publicado em Julho de 2012 no *Journal of Rheumatology*.

Os níveis séricos de IL-22 foram mensurados em 83 pacientes com AR e em 30 voluntários saudáveis. Variáveis clínicas, radiográficas e laboratoriais dos pacientes foram registradas. PBMCs de 30 pacientes com AR e 14 voluntários sadios foram estimuladas *in vitro* com PMA/Ionomicina. Níveis séricos e dos sobrenadantes de cultura foram mensurados por ELISA.

Esse estudo mostrou que os níveis de IL-22 estavam aumentados em pacientes com AR comparados com controles saudáveis (média 432.37 pg/ml e 67.45 pg/ml, respectivamente; $p < 0.001$). Além disso, os níveis de IL-22 correlacionaram com os valores do DAS28 e CDAI. A positividade para o Fator Reumatoide foi associada a níveis mais altos de IL-22 nos pacientes com AR (média 575.08 pg/ml; $p = 0.001$). A presença de erosões ósseas foi associada a níveis mais altos de IL-22. Os sobrenadantes das culturas de PBMC após estimulação expressaram níveis mais altos de IL-22 em pacientes com AR comparados aos controles, porém não houve significância estatística (média 584.75 pg/ml e 295.57 pg/ml; $p = 0.553$).

Os níveis elevados de IL-22 permitem a discriminação entre pacientes com diferentes parâmetros clínicos, radiográficos e laboratoriais, particularmente em pacientes com doença estabelecida por um longo período, considerando a duração média da população do estudo que foi de 10,7 anos. A associação dessa citocina com a presença de autoanticorpos necessita de melhor elucidação. Os achados apontam a IL-22 como importante biomarcador de atividade e reforçam seu papel na patogênese da doença e possível alvo terapêutico.

Increased Serum Interleukin 22 in Patients with Rheumatoid Arthritis and Correlation with Disease Activity

LAURINDO FERREIRA da ROCHA Jr, ÂNGELA LUZIA BRANCO PINTO DUARTE, ANDRÉA TAVARES DANTAS, HENRIQUE ATAÍDE MARIZ, IVAN da ROCHA PITTA, SUELY LINS GALDINO, and MAIRA GALDINO da ROCHA PITTA

ABSTRACT.

Objective. To analyze the role of interleukin 22 (IL-22) in rheumatoid arthritis (RA). **Methods.** IL-22 serum levels were measured in 83 patients with established RA under treatment with disease-modifying antirheumatic drugs and in 30 healthy controls matched for age and sex. Patients were assessed for clinical and laboratory variables. Correlations of IL-22 serum levels with disease activity measures [Clinical Disease Activity Index (CDAI) and Disease Activity Score for 28 joints (DAS28)], serological markers, bone erosions, and demographic factors were assessed. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 30 patients with RA and 14 controls were purified and stimulated *in vitro* with phorbol myristate acetate (PMA)/ionomycin. IL-22 production by PBMC and in serum was investigated by ELISA. **Results.** IL-22 levels were increased in patients with RA compared with controls (mean 432.37 pg/ml and 67.45 pg/ml, respectively; $p < 0.001$). Levels of IL-22 correlated with DAS28 and CDAI measures. Rheumatoid factor (RF) positivity was correlated with higher levels of IL-22 in patients with RA (mean 575.08 pg/ml; $p = 0.001$). The presence of bone erosions was associated with high IL-22 levels ($p = 0.0001$). PBMC stimulated with PMA/ionomycin expressed higher levels of IL-22 in patients with RA than controls but this was not significant (mean 584.75 pg/ml and 295.57 pg/ml; $p = 0.553$). **Conclusion.** IL-22 is elevated in the serum of patients with established RA. Elevated serum IL-22 allows discrimination between patients with different clinical and laboratory measures and indicates the potential of IL-22 as an additional tool for assessment of activity in RA, particularly in patients with RF antibodies and long-term disease. IL-22 is

associated with bone-destructive disease. (First Release May 15 2012; J Rheumatol 2012;39:1320–5; doi:10.3899/jrheum.111027)

Key Indexing Terms: INTERLEUKIN 22 RHEUMATOID ARTHRITIS DISEASE ACTIVITY DISEASE ACTIVITY SCORE 28 CLINICAL DISEASE ACTIVITY INDEX

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic chronic inflammatory autoimmune disease characterized by synovial proliferation and progressive damage of multiple joints. RA is a disease that mainly targets the synovial membrane, cartilage, and bone. At times, systemic manifestations may occur. It is associated with increased mortality and affects 0.4% to 1% of the population¹. More than one mechanism could contribute to the disease. Cytokines are directly implicated in the pathogenesis of RA as part of a complex regulatory network related to specific immunological processes that promote autoimmunity, chronic inflammation, and tissue destruction². T cell activation and migration are involved in these mechanisms, and these cells adopt a proinflammatory phenotype. RA has been thought to be a Th1- associated disorder³, but at present the Th17 phenotype has been identified and associated to RA^{4,5}. Th17 cells have been clearly implicated in animal models of RA, i.e., collagen-induced arthritis (CIA)⁶, the SKG mouse⁷, and gene-targeted mice deficient in interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist⁸. The functional role of these T cell subsets in human arthritis has been recently clarified⁵.

Th17 cell differentiation is regulated by the transcription factors signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ t (ROR γ t), and aryl hydrocarbon receptor, and is driven by transforming growth factor- β (TGF- β), IL-1, and IL-6; IL-23 is required to expand and stabilize the cell population. In addition to IL-17A, Th17 cells produce IL-17F, IL-21, IL-22, and IL-26, as well as chemokines such as CC chemokine ligand 20 (CCL20; also known as MIP3 α)^{9,10,11}. Recently IL-17A production and IL-22 expression have been demonstrated to occur independently of TGF- β signaling¹².

IL-22 is a member of the IL-10 cytokine family and is related to different T cell subsets. IL-22 is presumed to play a role in pathogen defense, wound

healing, and tissue reorganization, therefore IL-22 modulates tissue responses during inflammation. IL-22 is involved in the induction of an acute phase response *in vivo* and chemokines and matrix metalloproteinases *in vitro*¹³. IL-22 takes part in the adaptive response by the activation of CD4 T cells and in the innate response by the activation of lymphocytes such as natural killer cells and lymphoid tissue inducer-like cells¹⁴. IL-22 signals through a heterodimeric receptor complex consisting of the IL-10R2 and IL-22R1^{15,16}. The IL-22R1 subunit is strongly expressed in the skin, kidney, and tissues of the digestive and respiratory systems and synovial fibroblasts¹³. Binding of IL-22 to this receptor leads to activation of STAT3 signaling cascades and Akt and mitogen-activated protein kinase pathways¹⁴. The role of IL-22 as a Th17-effector cytokine has been demonstrated and it is most highly expressed by this cell subset¹⁷. Expression of this proinflammatory cytokine is induced by intradermal injection of IL-22 in mice¹³. The functional role of IL-22 is also associated with chronic inflammatory diseases such as psoriasis, inflammatory bowel disease (IBD), and RA^{13,14,18,19,20}. Both psoriasis and IBD predispose to spondyloarthritis, including axial disease, therefore examination of this cytokine was relevant in ankylosing spondylitis²¹. IL-22 has also been implicated in the pathogenesis of reactive arthritis²².

In IBD, IL-22 expression was detectable in CD4-positive T cells and was related to the expression of other inflammatory cytokines¹⁸. Increased levels of IL-22 in patients with psoriasis²³, Sjögren's syndrome²⁴, and RA^{19,20,25} have been described, suggesting that it has proinflammatory properties and is important in these autoimmune diseases¹³. In RA, IL-22 possibly induces the proliferation of synovial fibroblasts and production of chemokines¹⁹. In animal models of collagen-induced arthritis, mice deficient in IL-22 were less susceptible to pannus formation and incidence of arthritis²⁶. IL-22 levels have been associated to radiographic progression in RA²⁰. Nevertheless, there are currently no studies demonstrating a positive correlation between levels of IL-22 and disease activity. We investigated serum levels of IL-22 in patients with RA to determine its relations to disease activity and severity.

MATERIALS AND METHODS

Study population. A total of 83 patients with RA (80 women, 3 men; mean age 53 ± 10.6 yrs) were recruited from the Department of Rheumatology at Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Current medications were recorded (Table 1); 6 patients were taking biological agents (5 adalimumab and 1 etanercept). The diagnosis of RA was established by the presence of 4 or more American College of Rheumatology 1987 diagnostic criteria²⁷. About 30 healthy volunteers matched for age and sex (mean age 44 ± 10.8 yrs) were included as controls, and all were free of any rheumatologic conditions. Peripheral blood samples were obtained from patients and controls.

Demographic, clinical, and laboratory data were collected from hospital records or by questionnaire and reviewed by experienced physicians. Table 1 presents demographic and clinical findings in patients with RA.

Laboratory features of patients with RA [erythrocyte sedimentation rate (ESR), rheumatoid factor (RF) positivity] were recorded. Individual disease activity was quantified using the Disease Activity Score for 28 joints (DAS28)²⁸ and the Clinical Disease Activity Index (CDAI)²⁹. Radiographs of hands were obtained from patients with RA and evaluated for the presence of erosions by an experienced rheumatologist blinded to the clinical data. All subjects gave written consent to participate. The study was approved by the ethics committee of the UFPE.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC). PBMC were obtained from heparinized blood from healthy, nonsmoking donors who had not taken any drugs for at least 15 days before sampling, and were isolated by standard density-gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). Cells were counted in a Neubauer chamber, and cell viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were used only when viability was $> 98\%$. PBMC cultures. PBMC (1×10^6 cells/well) from 30 patients with RA and 14 controls were cultured in 24-well plates in RPMI-1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), HEPES 10 mM (Gibco), and penicillin/streptomycin 200 U/ml (Gibco), and incubated at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator. Cells were stimulated/not stimulated with phorbol myristate

acetate (PMA) 100 ng/ml (Sigma) and ionomycin 1 µg/ml (Sigma). The supernatants were collected after 48 h and IL-22 levels were quantified.

Table 1. Demographic, clinical, and laboratory presentation of the patients with rheumatoid arthritis.

Characteristic	
No. patients	83
Age, yrs, mean (range)	53 (28–77)
Female/male	80/3
Disease duration, mean (range)	10.5 years (0.1–35.2)
Rheumatoid factor (%)	
Positive	56 (67)
Negative	27 (33)
Radiological erosions (%)	
Present	67 (80.7)
Absent	16 (19.3)
Treatment (%)	
Nonsteroidal antiinflammatory drugs	5 (6)
Steroids	63 (75.9)
Methotrexate	51 (61.4)
Leflunomide	33 (39.8)
Antimalarial agents	14 (16.9)
Biologic therapy	6 (7.2)
Disease activity (%)	
Disease Activity Score 28 joints	
Clinical remission	7 (8.4)
Mild disease	6 (7.2)
Moderate disease	39 (47)
Severe disease	31 (37.3)
CDAI	
Clinical remission	8 (9.6)
Mild disease	16 (19.3)
Moderate disease	31 (37.3)
Severe disease	28 (33.7)

CDAI: Clinical Disease Activity Index.

Measurement of serum IL-22 levels. Cytokines in the supernatants of cultures and in sera were assayed with an ELISA kit according to the manufacturer's recommendation (R&D Systems). The lower limit of detection for the ELISAIL-22 kit was 15 pg/ml. *Statistical analysis.* Associations of serum IL-22 levels with clinical and laboratory measures of patients with RA were analyzed by univariate comparisons using nonparametric tests (Mann-Whitney tests). $p < 0.01$ was considered a significant association and $p < 0.05$ a suggestive association. Results are shown considering the mean value. All quantitative data were

plotted with GraphPad Prism 3.02 software. Variables with $p < 0.2$ at univariate analysis were retained for multivariate logistic regression analysis.

Correlations between serum IL-22 levels and DAS28 and CDAI were evaluated using Pearson correlation analysis. This analysis was carried out with Origin 8.0724 software (OriginLab, Northampton, MA, USA).

RESULTS

Serum IL-22 levels in RA patients and controls. In total, 83 patients with RA and 30 healthy controls were included in our analysis. Serum IL-22 levels were significantly increased in RA patients compared with controls (mean 432.37 pg/ml and 67.45 pg/ml, respectively; $p < 0.001$; Figure 1). Serum levels of IL-17 were higher in patients with RA but this finding lacked statistical significance. No correlation was detected between IL-17 levels and disease activity (data not shown). *Association of serum IL-22 levels and disease activity.* Having found that IL-22 was elevated in patients with RA, we assessed whether serum levels of IL-22 correlated with disease activity.

There was significant correlation for serum IL-22 levels among the scores for DAS28 ($r^2 = 0.041$, $p = 0.037$; Figure 2A) and CDAI ($r^2 = 0.062$, $p = 0.013$; Figure 2B). Serum from patients with RA in clinical remission had significantly lower levels of IL-22 than serum from patients with mild, moderate, and severe disease.

Correlations of serum IL-22 with RF positivity. Patients with RA who were positive for RF had significantly increased levels of IL-22 compared to seronegative patients (mean 575.08 pg/ml and 136.37 pg/ml; $p = 0.001$; Figure 3). *Correlations of serum IL-22 levels with bone erosions.* We assessed associations of IL-22 levels and presence of erosions. Serum IL-22 levels were higher in patients with bone erosions

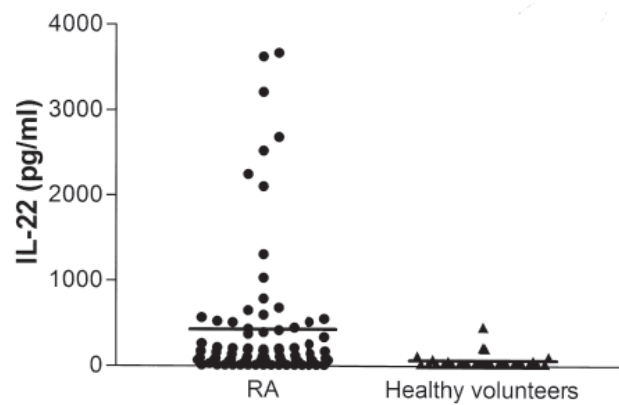


Figure 1. Serum interleukin 22 (IL-22) levels in patients with rheumatoid arthritis (RA) and controls ($p < 0.001$).

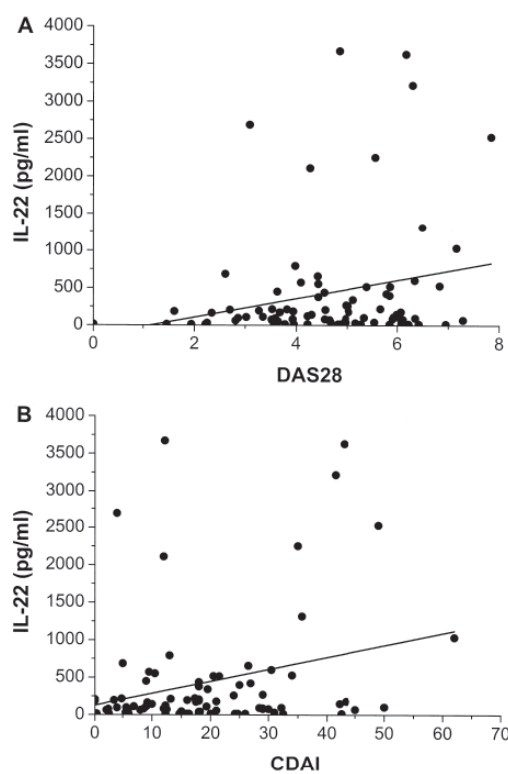


Figure 2. Correlation between serum interleukin 22 (IL-22) levels from patients with rheumatoid arthritis and Disease Activity Score for 28 joints (A; $r^2 = 0.041$, $p = 0.037$) and Clinical Disease Activity Index (B; $r^2 = 0.062$, $p = 0.013$).

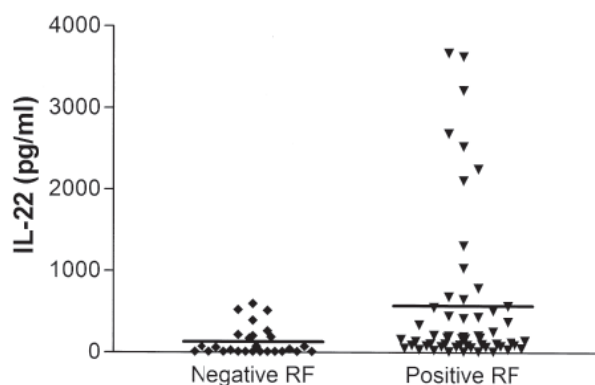


Figure 3. Correlation between rheumatoid factor (RF) positivity and levels of interleukin 22 (IL-22) in patients with rheumatoid arthritis

(mean 516.69 pg/ml) than in patients without erosions (mean 79.29 pg/ml; $p = 0.0001$; Figure 4).

The CDAI, DAS28, RF, and erosion variables were significantly associated with IL-22 by univariate analysis ($p < 0.05$). Therefore, these variables were subjected to multivariate logistic regression analysis. In the first analysis we considered DAS28, RF, and erosions; DAS28 and RF measures were independently associated with IL-22 levels ($p = 0.046$ and $p = 0.013$, respectively). Then we analyzed CDAI, RF, and erosions; CDAI and RF were also independently associated with IL-22 levels ($p = 0.028$ and $p = 0.029$, respectively). *IL-22 expression in PBMC following stimulation.* Next we analyzed the IL-22 patterns *in vitro* following stimulation with PMA and ionomycin. We observed increased levels of IL-22 in patients with RA compared to controls.

PBMC from 30 patients with RA and 14 controls were stimulated *in vitro* with PMA and ionomycin. There was low spontaneous secretion of IL-22 in both groups (mean 17.66 pg/ml in patients with RA, 63.85 pg/ml in controls). The levels of IL-22 in supernatants of PBMC from patients with RA after stimulation were higher than in control PBMC (584.75 pg/ml and 295.57 pg/ml, respectively), but this finding was not statistically significant ($p = 0.553$; Figure 5).

DISCUSSION

In our study, IL-22 levels were increased in patients with RA compared with those of healthy controls. In this series the levels of IL-22 correlated with disease activity (by DAS28 and CDAI). Of note, when samples from patients with RA were separated into RF-negative and RF-positive groups, there were significant differences in IL-22 serum levels. There was significant correlation between higher levels of IL-22 and positive RF. IL-22 levels were higher in patients with bone erosions. PBMC stimulated with PMA/ionomycin expressed higher levels of IL-22 in patients with RA than in controls, but this finding was not significant.

It has been suggested that IL-22 might play a role in RA pathophysiology^{14,20,21,25,26,30,31}. Elevated levels of IL-22 have been demonstrated in RA synovial tissues and the lining and sublining layers of rheumatoid synovium expressed higher levels of IL-22R1¹⁹. Endogenous IL-22 plays a proinflammatory role in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice, and this cytokine appears to be important for osteoclastogenesis and regulates antibody production²⁶. Our findings are in accord with these observations, and are also in agreement with a recent study that described increased plasma levels of IL-22 in 30 patients with established RA with a mean disease duration of 10.7 years, although the patients had not received immunomodulatory drugs for 2 months³⁰. In contrast, all our patients were under therapy. In our study the mean disease duration was 10.5 years and most patients had active disease, as noted. Another recent study showed levels of IL-22 were increased in almost 50% of patients with very early and active RA, and revealed no difference for disease activity measures between the groups of RA patients with high IL-22 and those with normal IL-22 levels; the patients assessed had active disease. Both groups of patients had never been treated with disease-modifying antirheumatic drugs and glucocorticoids. Elevated levels of IL-22 at baseline were significantly associated with bone erosions²⁰. We found higher IL-22 levels in patients with bone erosions of hands. This finding supports the potential role of IL-22 as a predictive marker of bone destruction in RA. However, previous data demonstrated that levels of IL-22 were elevated in patients with established disease as well as in patients with very early disease²⁵. Our data

show that patients with longterm disease have increased serum levels of IL-22, supporting the idea that this proinflammatory cytokine may take part in the chronic inflammatory process in established RA, but to a lesser degree in very early disease.

Although IL-22 has been described to have a mild proinflammatory effect in arthritis³² this is not in line with our observation that patients differ in their clinical inflammatory measurements (DAS28 and CDAI) according to serum levels of IL-22, showing a linear trend (Figure 2).

Our study is the first to associate the levels of IL-22 with severity of disease according to DAS28 and CDAI, demonstrating statistical significance in patients with established disease. However, this is not in agreement with a previous study that found no correlation between plasma levels of IL-22 and DAS28 in a similar group of 30 patients in China³⁰. Our study analyzed a higher number of patients (n = 83) and this inconsistency may arise in part from the influence of genetics in some ethnic groups on RA pathogenesis³³. Because half of patients with very early active disease may not demonstrate correlation between the levels of IL-22 and disease activity²⁰, this is important to note in this study.

On the other hand, contradictory data have been presented for correlation between IL-17 and disease activity. In line with 2 reports^{34,35} we observed that IL-17 levels did not correlate with DAS28 and CDAI findings. Higher IL-17 levels were recently associated with systemic measures of more active disease in 30 patients³⁶; the small number of patients in the latter report must be taken into consideration and thus further study is needed.

A subset of CD4 T cells related specifically to the expression of IL-22 has been described that is distinct from Th17, Th1, and Th2 cells, and are termed Th22 cells. These cells express chemokine (CCR6) and skin-homing receptors (CCR4 and CCR10) and do not express interferon- γ (IFN- γ), IL-17A, or transcription factor related to the Th1 and Th17 T cell subsets^{37,38}. The Th22 subset is induced by epidermal Langerhans cells and by plasmacytoid dendritic cells, and the inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α and IL-6 are related to its expression^{37,39}. Th22 cells might be important for skin homeostasis and in inflammation, because patients with psoriasis demonstrate increased Th22 cell

populations⁴⁰. Although the roles of Th22 cells in RA remain unclear, this subset of cells has been associated to RA and correlated with increased plasma levels of IL-22 in patients with RA³⁰. Our analyses show that levels of IL-22 were significantly higher in our cohort of patients with RA, but not other cytokines expressed by other cell populations (Th1 and Th17) such as IFN- γ and IL-17 (data not shown). These observations indicate a possible pathogenic role of Th22 cells in RA. Rheumatoid factor (RF) is the term for autoantibodies directed to the Fc γ chains of IgG molecules. IgM-RF can be detected in 60% to 80% of RA patients with established disease and can precede the onset of disease by several years. The physiologic role of RF is to enhance immune complex clearance. Immune complexes are also present in the joint. Therefore, RF may contribute to the activity and chronicity of RA through complement-mediated pathways. Further, the RF-producing B cells in synovial tissue of patients with RA may act as antigen-presenting cells and present (foreign or self) antigens to T cells through uptake of immune complexes. Thus, RF in serum and RF-producing B cells contribute to the pathophysiology of RA⁴¹. Our findings demonstrate a correlation between high levels of IL-22 and positive RF. In some animal models of RA, immune complex formation at joint tissues is a major element. In collagen-induced arthritis, IL-22 may regulate antibody production²⁶, although B lymphocytes do not express IL-22R¹³. Increased levels of IL-22 have been associated to RF in Sjögren's syndrome²⁴. Mature naive B cells become activated on meeting their cognate antigen and then participate in germinal center reactions, leading to a number of effector mechanisms including generation of plasmacells that secrete antibody⁴¹. The importance of Th17 cells in the mechanism by which IL-17 drives autoimmune responses by promoting the formation of spontaneous germinal centers in mice has been reported⁴². IL-17 is also associated with the survival and proliferation of human B cells and their differentiation into immunoglobulin-secreting cells⁴³. Further, the importance of B lymphocytes in the regulation of Th17 response has recently been demonstrated. B lymphocyte depletion with rituximab, a monoclonal antibody directed toward the CD20 antigen on B lymphocytes, led to a reduction in the number of Th17 cells as well as decreased levels of IL-17A, IL-21, and IL-22 in patients with RA⁴⁴. The association of autoantibodies

and IL-22 requires further investigation. It is a limitation of our study that we did not investigate RF titers, CRP levels, extraarticular symptoms, and presence of anticyclic citrullinated peptides. It is widely accepted that there is an association of high-titer RF with more severe disease, thus we found significant correlation between high scores of DAS28 and CDAI and increased IL-22 levels. Most of our patients had long-term disease despite treatment, which may also indicate a more severe course of RA.

Although the findings were not statistically significant ($p > 0.05$), our *in vitro* results revealed a tendency to increased levels of IL-22 expressed by PBMC from patients with RA following stimulation. The results indicate a possible pathophysiological role of IL-22 in RA. The association of increased levels of this cytokine with disease activity in patients with established disease suggests the potential of IL-22 as an additional tool for assessment of activity in RA, particularly in patients with RF antibodies and long-term disease (mean 10.5 years). Taking into consideration that levels of IL-22 have been associated with bone erosions, this interleukin might be helpful in identifying patients with more destructive disease. Further studies are needed to clarify the role of IL-22 in RA.

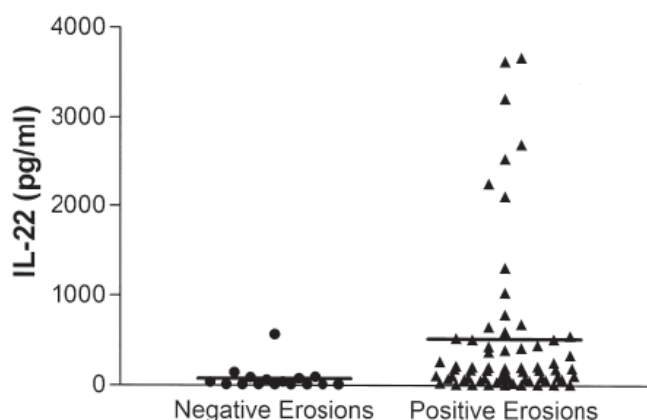


Figure 4. Serum interleukin 22 (IL-22) levels in patients with rheumatoid arthritis and bone erosions ($p < 0.0001$).

REFERENCES

1. Liao KP, Karlson EW. Classification and epidemiology of rheumatoid arthritis. In: Hochberg MC, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, eds. Rheumatology. 5th ed. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier; 2011:823-7.
2. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Nat Rev Immunol 2007;7:429-42.
3. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 2003;423:356-61.
4. Lubberts E. IL-17/Th17 targeting: On the road to prevent chronic destructive arthritis? Cytokine 2008;41:84-91.
5. Gaston JS. Cytokines in arthritis — The 'big numbers' move centre stage. Rheumatology 2008;47:8-12.

6. Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2003;198:1951-7.
7. Hirota K, Hashimoto M, Yoshitomi H, Tanaka S, Nomura T, Yamaguchi T, et al. T cell self-reactivity forms a cytokine milieu for spontaneous development of IL-17⁺ Th cells that cause autoimmune arthritis. *J Exp Med* 2007;204:41-7.
8. Cho ML, Kang JW, Moon YM, Nam HJ, Jhun JY, Heo SB, et al. STAT3 and NF-kappa B signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol* 2006;176:5652-61.
9. Manel N, Unutmaz D, Littman DR. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR gamma-t. *Nat Immunol* 2008;9:641-9.
10. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupe P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008;9:650-7.
11. Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol* 2009;9:556-67.
12. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* 2010;467:967-71.
13. Wolk K, Sabat R. Interleukin-22: A novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17:367-80.
14. Zenewicz LA, Flavell RA. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol* 2011;23:159-63.

15. Xie MH, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, et al. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J Biol Chem* 2000;275:31335-9.
16. Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, et al. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: The IL-10R2 chain (IL-10R-beta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem* 2001;276:2725-32.
17. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006;203:2271-9.
18. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, Fujino S, Deguchi Y, Araki Y, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005;129:969-84.
19. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: Potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 2005;52:1037-46.
20. Leipe J, Schramm MA, Grunke M, Baeuerle M, Dechant C, Nigg AP, et al. Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1453-7.
21. Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2009;60:1647-56.

22. Shen H, Goodall JC, Gaston JS. Frequency and phenotype of T helper 17 cells in peripheral blood and synovial fluid of patients with reactive arthritis. *J Rheumatol*;37:2096-9.
23. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*2004;21:241-54.
24. Lavoie TN, Stewart CM, Berg KM, Li Y, Nguyen CQ. Expression of interleukin-22 in Sjogren's syndrome: Significant correlation with disease parameters. *Scand J Immunol* 2011;74:377-82.
25. Cascao R, Moura RA, Perpetuo I, Canhao H, Vieira-Sousa E, Mourao AF, et al. Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R196.
26. Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renauld JC, et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum* 2009;60:390-5.
27. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
28. Prevoo ML, van 't Hof MA, Kuper HH, van Leeuwen MA, van de Putte LB, van Riel PL. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995;38:44-8.
29. Aletaha D, Nell VP, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: Validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R796-806.

30. Zhang L, Li JM, Liu XG, Ma DX, Hu NW, Li YG, et al. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 2011;31:606-14.
31. Zhang N, Pan HF, Ye DQ. Th22 in inflammatory and autoimmune disease: Prospects for therapeutic intervention. *Mol Cell Biochem* 2011;353:41-6.
32. Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, Schmidt-Weber C. IL-17 and IL-22: Siblings, not twins. *Trends Immunol* 2010;31:354-61.
33. Kochi Y, Suzuki A, Yamada R, Yamamoto K. Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis — Implications for pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:290-5.
34. Melis L, Vandooren B, Kruithof E, Jacques P, De Vos M, Mielants H, et al. Systemic levels of IL-23 are strongly associated with disease activity in rheumatoid arthritis but not spondyloarthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:618-23.
35. Yamada H, Nakashima Y, Okazaki K, Mawatari T, Fukushima JI, Kaibara N, et al. Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1299-304.
36. Metawi SA, Abbas D, Kamal MM, Ibrahim MK. Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. *Clin Rheumatol* 2011;30:1201-7.
37. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009;10:857-63.
38. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 2009;10:864-71.

39. Fujita H, Nogales KE, Kikuchi T, Gonzalez J, Carucci JA, Krueger JG. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4⁺ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:21795-800.
40. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010;130:1373-83.
41. Dass S, Vital EM, Emery P. Rituximab. In: Hochberg MC, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, eds. *Rheumatology*. 5th ed. Vol. 1. Philadelphia: Elsevier; 2011:563-95.
42. Hsu HC, Yang P, Wang J, Wu Q, Myers R, Chen J, et al. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat Immunol* 2008;9:166-75.
43. Doreau A, Belot A, Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, et al. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunol* 2009;10:778-85.
44. van de Veerdonk FL, Lauwerys B, Marijnissen RJ, Timmermans K, Di Padova F, Koenders MI, et al. The anti-CD20 antibody rituximab reduces the Th17 cell response. *Arthritis Rheum* 2011;63:1507-16.

5.3. ARTIGO III

Artigo publicado no The Journal of Rheumatology Volume 39, no. 11 (2012); 39:11; doi:10.3899/jrheum.120876

Esse artigo foi publicado na edição de novembro de 2012 do *Journal of Rheumatology* no formato de *Letter*. Foi elaborado a pedido dos Editores do mesmo periódico como resposta a outro artigo publicado também como carta por um grupo Chinês que reforçaram a importância de nosso trabalho e ressaltaram novos achados sobre o papel da IL-22 na AR.

Interessantemente, novo estudo descreveu uma melhor associação da IL-22 com a osteoclastogênese ao demonstrar a regulação positiva dessa citocina com o RANKL, citocina relacionada a ativação de osteoclastos na doença. Isso em parte poderia justificar a associação que encontramos dessa citocina com erosões radiográficas.

Mais uma vez a relação de IL-22 com autoanticorpos foi destacada visto que, o rituximabe, depletor de células produtoras de autoanticorpos (células B), mostrou reduzir a expressão dessa citocina.

Ressaltamos o papel no tratamento da AR do inibidor da Janus quinase, tofacitinib, cujo lançamento está previsto para este ano, que demonstrou diminuir a expressão da IL-22 também.

Ao destacarmos novos alvos terapêuticos, relatamos a suspensão de um estudo clínico em fase II, que utilizou um anticorpo monoclonal anti-IL22 na AR, o fezakinumabe. O motivo da suspensão não foi publicado, porém chamamos a atenção para o papel protetor que a IL-22 tem na imunidade contra alguns patógenos.

Por fim, estudos genéticos e novas abordagens terapêuticas como os agonistas do PPAR γ foram sugeridos como perspectivas futuras.

The Journal of Rheumatology Volume 39, no. 11**L.F. da Rocha Jr, et al/ reply**

LAURINDO FERREIRA da ROCHA, Jr, ÂNGELA LUZIA BRANCO PINTO DUARTE, ANDRÉA TAVARES DANTAS, HENRIQUE ATAÍDE MARIZ, IVAN da ROCHA PITTA, SUELY LINS GALDINO and MAIRA GALDINO da ROCHA PITTA

J Rheumatol 2012;39:11; doi:10.3899/jrheum.120876<http://www.jrheum.org/content/39/11/2221.1>**L.F. da Rocha Jr, et al/ reply***To the Editor:*

We thank Xie and colleagues for their comments¹ on our article² and for applying expertise to this question of interleukin 22 (IL-22) as a possible therapeutic target in rheumatoid arthritis (RA) and as a promising candidate biomarker. Novel cytokines have emerged recently as contributing to the pathogenesis of autoimmune diseases. Knowledge about the role of IL-22 in autoimmune diseases is increasing and may reveal new therapeutic options for modulation of this cytokine. The role of IL-22 has been investigated in other inflammatory autoimmune diseases, such as psoriasis³ and psoriatic arthritis⁴, systemic sclerosis⁵, and systemic lupus erythematosus⁶.

In RA, IL-22 is also a promising candidate biomarker as a predictor of disease activity. We demonstrated that higher serum levels of this cytokine are associated with more severe disease². The association of IL-22 with bone erosions supports the idea that this cytokine may play a role in destructive bone disease. IL-22 may also be associated with pannus formation⁴. Th17 and Th22 subsets are major sources of IL-22. These cell lineages were significantly increased in the peripheral blood of patients with inflammatory arthritis, such as ankylosing spondylitis and RA^{7,8}. Although we did not investigate these cell subsets, we were able to show that IL-22 levels are high in patients with RA,

indicating a role of this cytokine within the complex and heterogeneous pathogenesis of RA.

New strategies for RA treatment focusing on IL-22 may reveal alternative therapies for those patients who remain refractory to current therapeutic modalities. Antibodies to this cytokine might become available in the future. The monoclonal antibody fezakinumab, which modulates expression of IL-22, has been studied in a Phase II trial, but the study was discontinued⁹. The role of IL-22 in protection against bacterial infection should be kept in mind¹⁰. The nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists currently under study may also represent a molecular target in autoimmune diseases such as RA, as they were found to suppress the expression of IL-22¹¹. The benefit of rituximab, a monoclonal antibody directed to CD20 antigen on B cells, is recognized in the treatment of RA. In a recent study of 12 patients with active RA disease who were resistant to TNF blockade, lower mRNA levels of IL-22 in synovial tissue were described after rituximab treatment¹². Thus, IL-22 suppression is probably one of the mechanisms involved in rituximab therapy. The Janus kinase inhibitor tofacitinib has been shown to be an inhibitor of IL-22 expression, and may represent a strategy in the treatment of RA¹³. Finally, genetic studies would be helpful in clarifying the role of IL-22 in RA as a biomarker or as a potential therapeutic target.

REFERENCES

1. Xie Q, Wang S-C, Li J. Interleukin 22, a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis [letter]. *J Rheumatol* 2012;39:xxxxx.
2. Da Rocha LF Jr, Duarte AL, Dantas AT, Mariz HA, Pitta ID, Galdino SL, et al. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *J Rheumatol* 2012;39:1320-5.
3. Kagami S, Rizzo HL, Lee JJ, Koguchi Y, Blauvelt A. Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2010;130:1373-83.

4. Mitra A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R65.
5. Mathian A, Parizot C, Dorgham K, Trad S, Arnaud L, Larsen M, et al. Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1227-34.
6. Qin WZ, Chen LL, Pan HF, Leng RX, Zhai ZM, Wang C, et al. Expressions of IL-22 in circulating CD4+/CD8+ T cells and their correlation with disease activity in SLE patients. *Clin Exp Med* 2011;11:245-50.
7. Zhang L, Li JM, Liu XG, Ma DX, Hu NW, Li YG, et al. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 2011;31:606-14.
8. Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2012;7:e31000.
9. Pfizer Pipeline – Our medicines in development. Pfizer Inc.; May 10, 2012. [Internet. Accessed July 27, 2012.] Available from: <http://www.pfizer.com/pipeline>
10. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008;14:282-9.
11. Klotz L, Burgdorf S, Dani I, Saijo K, Flossdorf J, Hucke S, et al. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med* 2009;206:2079-89.

12. van de Veerdonk FL, Lauwerys B, Marijnissen RJ, Timmermans K, Di Padova F, Koenders MI, et al. The anti-CD20 antibody rituximab reduces the Th17 cell response. *Arthritis Rheum* 2011;63:1507-16.

13. Migita K, Miyashita T, Izumi Y, Koga T, Komori A, Maeda Y, et al. Inhibitory effects of the JAK inhibitor CP690,550 on human CD4(+) T lymphocyte cytokine production. *BMC Immunol* 2011;12:51.

LAURINDO FERREIRA da ROCHA Jr, MS Student, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas and Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE; ÂNGELA LUZIA BRANCO PINTO DUARTE, PhD, Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE; ANDRÉA TAVARES DANTAS, PhD Student; HENRIQUE ATAÍDE MARIZ, PhD Student, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas and Serviço de Reumatologia do Hospital das Clínicas da UFPE; IVAN da ROCHA PITTA, PhD; SUELY LINS GALDINO, PhD, Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE; MAIRA GALDINO da ROCHA PITTA, PhD, Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas da UFPE, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil. Address correspondence to Dr. M.G.R. Pitta, UFPE, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife PE, 50670-901, Brazil. E-mail: mgrpitta@gmail.com

5.4. ARTIGO IV

Artigo publicado noBioMed Research International Volume 2013 (2013), Article ID 926060; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/926060>

Esse artigo teve como objetivo descrever a síntese e avaliar a ação imunomoduladora, na AR, de um composto sintetizado no LPSF da UFPE, o TM17. Esse composto é um derivado tiazolidínico agonista do PPAR γ e, recentemente, os derivados tiazolidínicos ou tiazolidinedionas (TZDs) tem chamado a atenção por apresentarem importante atividade anti-inflamatória e imunomoduladora.

Após caracterização de sua estrutura química e determinação de dose atóxica, o composto foi submetido a ensaios laboratoriais por ELISA para avaliação de sua ação imunomoduladora através da inibição das citocinas relacionadas a via Th17, como IL-6, IL-17 e IL-22 e também do IFN γ . Para isso utilizamos esplenócitos de camundongos BALB/c e PBMCs de pacientes com AR. O TM17 diminuiu de forma significativa a expressão de IL-6 em esplenócitos de camundongos nas doses de 1,10 e 100 μ M e diminuiu a expressão de IL-17A, IL-22 e IFN γ em PBMCs de pacientes com AR na dose de 100 μ M ($p < 0,05$). Houve uma tendência a inibição da expressão de IL-6 em PBMCs de pacientes com AR ($p = 0,07$). A expressão do PPAR γ foi documentada pela detecção de mRNA desses receptores pela técnica de RT-PCR.

Os achados encontrados, sugerem que a atividade anti-inflamatória do TM17 está relacionada, em parte, a sua habilidade de aumentar a expressão transcricional do PPAR γ . As citocinas avaliadas (IL-6, IL-17A, IL-22 e IFN γ) tem papel bem documentado na fisiopatologia da AR e a redução da expressão destas pelo TM17 sugerem que sua atividade imunomoduladora seria uma abordagem molecular promissora em pacientes com doenças autoimunes, particularmente na AR.

Synthesis of a Novel Thiazolidinedione and Evaluation of Its Modulatory Effect on IFN- γ , IL-6, IL-17A, and IL-22 Production in PBMCs from Rheumatoid Arthritis Patients

LAURINDO FERREIRA da ROCHA Jr, MOACYR JESUS BARRETO de MELO RÊGO, MARIANA BRAYNER CAVALCANTI, MICHELLY CRISTINY PEREIRA, MARINA GALDINO da ROCHA PITTA, PRISCILLA STELA SANTANA de OLIVEIRA, SAYONARA MARIA CALADO GONÇALVES, ANGELA LUZIA BRANCO PINTO DUARTE, MARIA do CARMO ALVES de LIMA, IVAN da ROCHA PITTA, and MAIRA GALDINO DA ROCHA PITTA

ABSTRACT.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease frequently characterized by chronic synovitis of multiple joints. The pathogenesis of RA is complex and involves many proinflammatory cytokines as Th17 related ones. PPAR γ is a nuclear receptor activator that represses proinflammatory gene expression. Thus, this work aimed to synthesize a new thiazolidinedione (TZD) analogue based on a well-known anti-inflammatory and PPAR γ agonist activity of this ring and evaluate its anti-inflammatory activity. After chemical structure confirmation, the compound named 5-(5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(2-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione TM17 was submitted to cytokine releasing inhibition and PPAR γ genetic modulation assays. The new compound showed no toxicity on human and murine cells, decreasing IL-6 secretion by murine splenocytes and reducing IL-17A, IL-22, and IFN- γ expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with RA. TM17 was more efficient in modulating the mRNA expression of PPAR γ than its well-used TZD agonist rosiglitazone. Surprisingly, TM17 was efficient on IL-17A and IFN- γ reduction, like the positive control methylprednisolone, and presented a better effect on IL-22 levels. In conclusion, PBMCs obtained from RA patients under TM17 treatment present a significant reduction in IL-17A, IL-22, and IFN- γ levels, but not IL-6 when compared with nontreated cells, as well as increase PPAR γ mRNA expression in absence of stimulus addressing it as a promising molecule in RA treatment.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease that is associated with systemic complications and early death [1–3]. RA is characterized by synovial inflammation, autoantibody production, cartilage and bone destruction, and extraarticular features. The disease leads to deformity and the inflammatory burden is associated with cardiovascular, pulmonary, psychological, and skeletal disorders [1, 2]. The pathogenesis of RA is complex and involves T cells, B cells, and the interaction of many proinflammatory cytokines mainly of Th1 and Th17 pathways [3–6].

Previous studies have demonstrated the anti-inflammatory properties of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) agonists, in experimental models of arthritis and in various inflammatory cells [7, 8]. The PPAR γ is a nuclear receptor that plays key roles in the regulation of metabolic homeostasis and inflammation [9]. Its activation in immune cells predominantly results in repression of proinflammatory gene expression like TNF, IL-1 β , and IL-6 [10–15].

Many ligands that activate and modulate PPAR functions have been identified [16]. The thiazolidinediones (TZDs), a class of antidiabetic drugs, function as high-affinity PPAR γ ligands. The thiazolidines-2,4-diones (TZDs) have been extensively researched due to their deep involvement in regulation of different physiological processes like cell proliferation, angiogenesis, inflammation, and glucose metabolism [17] as well as a strong association with the inhibition of T cell activation and inflammatory disease [18]. Thus, these classes of drugs are of growing importance as a therapeutic approach in inflammatory and autoimmune diseases such as RA. This work aimed to evaluate the immunomodulatory activity of a new TZD analogue called TM17 in RA patients cells.

2. Materials and Methods

2.1. Anti-Inflammatory Assay

2.1.1. Animals. Experimental assays utilized BALB/c mice (male, 45 days old). The animals ($n = 6$) were raised and maintained at the animal facilities of the Laboratory of Immunopathologia Keizo Asami (LIKA) (Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil). All mice were killed and treated in accordance with

the guidelines of the Ethical Committee for the Use of Experimental Animals of the Universidade Federal de Pernambuco. For splenocytes obtention the spleen was extracted aseptically and placed in a Petri dish containing RPMI-1640 (Gibco). In a vertical flow, each spleen was transferred to another Petri dish where they were submerged. The cell suspension obtained from each spleen was filtered in a cell sytrainer 40 μ m nylon (BD FalconTM) and then transferred to Falcon tubes. The spleen concentrates were then centrifuged twice for 10 minutes. Subsequently the cells were lysed with RBC lysis buffer 1X (eBiosciences) and resuspended at in RPMI-1640 (Sigma) medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 10mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco), and 200U/mL penicillin/streptomycin (Gibco). The cell viability was determined by trypan blue 0.4% (Sigma-Aldrich, USA) exclusion at 1 : 4 dilution (1 part of cells : 4 parts of dye). The samples were only used when viability was >98%.

2.1.2. AR Patients and Health Volunteers. Patients with RA ($n = 9$) were recruited from Rheumatology Division at Hospital das Clinicas-Universidade Federal de Pernambuco. Demographic, clinical, current medication, and laboratorial data were collected from all patients by questionnaire and from hospital records (Table 1). Patients were included after fulfilling at least four or more of the American College of Rheumatology (ACR) 1987 classification criteria for RA [19]. After exclusion of any rheumatic disease healthy volunteers were recruited as a control group ($n = 9$). Peripheral blood samples were obtained from patients and healthy volunteers. Informed written consent was obtained from all patients and controls in agreement with the norms of the Health Science Center Ethical Committee. The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood of health donors and patients with RA by centrifugation on Ficoll PaqueTM Plus (density 1.077 g/mL -GE Healthcare Bio-Sciences). Then, the PBMCs were resuspended in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with L-glutamine, 10% fetal serum bovino (Gibco), 10mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) and 200U/mL penicillin/streptomycin (Gibco). The cell viability was determined by trypan blue 0.4% (Sigma-Aldrich, USA) exclusion at 1 : 4 dilution (1 part of cells : 4 parts of dye). The samples were only used when viability was >98%.

TABLE 1: Demographic, clinical, and laboratory presentation of the patients with RA.

Number of patients	9
<i>Age (years)</i>	
Mean (range)	52.6 (30–69)
<i>Sex</i>	
Female/male	9/0
<i>Disease duration (years)</i>	
Mean (range)	6 years (0.1–16.2)
<i>Rheumatoid factor</i>	
Positive/negative	8/1
<i>Treatment</i>	
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs	1
Steroids	8
Methotrexate	4
Leflunomide	2
Antimalarial agents	1
Biologic therapy	—
<i>Disease activity</i>	
DAS28	
Clinical remission	—
Mild disease	4
Moderate disease	2
Severe disease	3
CDAI	
Clinical remission	—
Mild disease	—
Moderate disease	5
Severe disease	4

2.1.3. MTT Assay. The splenocytes from BALB/c mice and PBMCs from health donors were incubated in the presence of two different concentrations (100 and 250 μ M for splenocytes and 10 and 100 μ M for PBMCs) of the compounds for 48 hours. Then cytotoxicity was quantified by the ability of living cells to reduce MTT to a purple compound. The compounds were tested in three independent assays, and at the end of incubation wells were centrifuged, and the medium was replaced by medium without compound (150 μ L) containing MTT (0.5mg/mL). Three hours later the MTT formazan was diluted with 100mL of 0% SDS, and its absorbance was measured (570 nm) by the apparatus (BioTek EL808). The cytotoxic activity was quantitated as the percentage of control absorbance. In this sense, the absorbance of the TM17 treated group was obtained in relation to vehicle treated control group. In all analyzed experiments, the vehicle (DMSO 0.1%) treated group presented viability >97% compared to cells control without vehicle.

2.1.4. PBMCs and Splenocytes Cultures. PBMCs (1×10^6 cell/mL) and splenocytes (2×10^6 cell/mL) were cultured in RPMI-1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco), HEPES 10mM (Gibco), and penicillin (10.000 U/mL)/(streptomycin 10.000 μ g/mL) (Gibco). Cells were stimulated with PMA (Sigma) + ionomycin (Sigma) for PBMCs or with Conocavalia-A (ConA) for splenocyte, in the presence or absence of TM-17 at concentrations of 1, 10, and 100 μ M. Methyprednisolone 100 μ M (Pfizer) was used as a positive control. Cells were incubated for 48 hours at 37°C in humidified 5% CO₂ incubator.

2.1.5. Cytokine Titration. Cytokines of cultures supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's instructions. In culture supernatants from PBMCs, IL-6 (BD Biosciences), IFN- γ (BD Bioscience), IL-17A (R&D Systems) and IL-22 (eBiosciences) were determined. The lower limits of detection for the ELISA analyses were as follows: 15.625 pg/mL for human IL-17, 9.375 pg/mL for human IL-6 and IFN- γ , and 31.25 pg/mL for human IL-22.

2.1.6. Quantitative RT-PCR. Total RNA from cells was extracted using trizol (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. Next, cDNA synthesis was obtained from 3-4 μ g of total RNA using the High Capacity Archive kit (Applied Biosystems). PPAR γ mRNA levels were measured by real time PCR using 18S ribosomal gene as the internal standard. Standard TaqMan probes were Hs01115513 m1 for PPAR γ and Hs03928990 g1 for 18S amplification. Realtime PCR reactions were performed on ABI Prism 7900HT sequence detection PCR machine (Applied Biosystem) according to the manufacturer's protocol. The relative gene expression was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.1.7. Statistical Analysis. All experiments were performed at least three independent times before statistical analysis, and the results in this were analyzed by univariate comparisons using nonparametric tests (Wilcoxon matched pairs test) with $P < 0.05$ being considered as a significant

difference. All quantitative data were plotted with GraphPad Prism 3.02 software and in all graphs; bars represent mean value $\pm$ standard deviation.

3. Results and Discussion

3.1. Chemical Synthesis. The 5-(5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(2-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione TM17 (4) was prepared by a nucleophilic Michael addition of the benzyl-thiazolidine-2,4-dione (2) and the substituted cyanoacrylate (3) to obtain the benzylidene-thiazolidine-2,4-dione TM17 (4) as described in Figure 1. The thiazolidine-2,4-dione (1) was N-(3)-alkylated with the 2-nitro-benzyl chloride in the presence of sodium hydroxide in hot ethanol leading to formation of the intermediate 3-(2-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (2). The 3-(5-bromo-2-methoxyphenyl)-2-cyano-acrylic acid ethyl ester (3) was prepared by Knoevenagel condensation of ethyl cyanoacetic Ester and 5-bromo-2-methoxy-benzaldehyde in the presence of triethylamine. The published chemical data on 3-(5-bromo-2-methoxy-phenyl)-2-cyano-acrylic acid ethyl ester [20] are not reported here. The benzylidene-thiazolidine-2,4-dione TM17 (4) was isolated in a single isomeric form, which was verified by TLC and NMR analysis. X-ray crystallographic studies and ^{13}C NMR have demonstrated a preference for the *Z* configuration for 5-benzylidene-thiazolidinones [21–23]. The melting point was measured in a capillary tube on Quimis 340.23 apparatus. Thin layer chromatography was performed on silica gel plates (Merck 60F254). Infrared spectra of 1% KBr pellets were recorded on a Bruker IFS66 spectrometer. ^1H NMR spectra were recorded on a Varian Unity Plus 300MHz spectrophotometer in DMSO- d_6 as the solvent, with tetramethylsilane as the internal standard. Mass spectra were recorded on an LCMS-IT-TOF Shimadzu Liquid Chromatograph mass spectrometer in positive polarity. (5*Z*)-5-(5-Bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(2-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione TM17: an equimolar (0.83mMol) mixture of 3-(2-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (2) and 3-(5-bromo-2-methoxy-phenyl)-2-cyanoacrylic acid ethyl ester (3) dissolved in ethanol (10 mL) with morpholine (250 μL) was heated at 50°C for 3h. After cooling, the precipitated product was purified by flash column chromatography on silica with *n*-hexane/ethyl acetate, 8 : 2 as the eluent. $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_5\text{S}$. Yield 30,58%. Mp 164°C. TLC (benzene : ethyl acetate, 9,5 :

0,5) Rf 0,72. ¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) 3.91 (3H, s, OCH₃), 5.17 (2H, s, NCH₂), 7.16 (1H, d, *J* = 9Hz, PhBrOCH₃), 7.42 (1H, dd, *J* = 7.8, 1,2Hz, PhNO₂), 7.58 (1H, d, *J* = 2.09Hz, PhBrOCH₃), 7.58–7.63 (1H, m, PhNO₂), 7.67–7.71 (1H, d, 8,7Hz, PhBrOCH₃), 7.71–7.76 (1H, m, PhNO₂), 7.98 (1H, s, HC=), 8.12 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.2Hz, PhNO₂). IR: 1733 and 1678 (C=O), 1598 (HC=). MS, ESI+ *m/z* 448, [M + Na]⁺ 471, [M+ Na + 2]⁺ 472.96.

3.2. Cytotoxicity. For all conditions tested, cells presented a viability greater than 80%. On the highest dose tested, (100 μM) TM17 showed a viability of 97.99 (±17.65) in splenocytes and 86.52 (±9.23) for PBMCs. The compound was also tested at 10 μM in PBMCs and 250 μM in splenocytes. The first showed 94,81 (±16,39) of viability and the second 84,3 (±2,9). This result confirms that TM17 is a nontoxic compound, even in high doses.

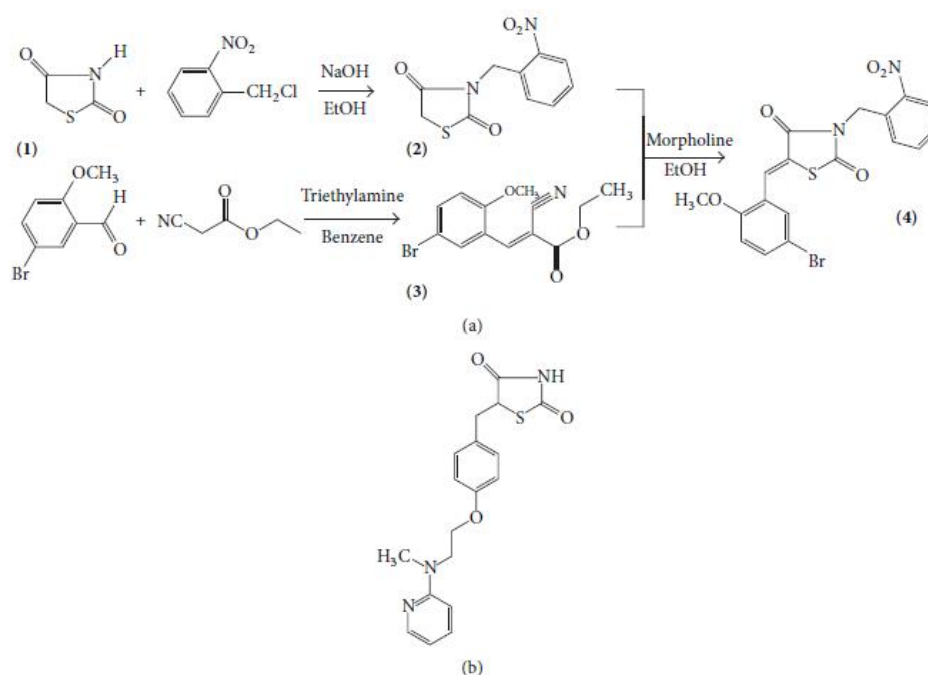


FIGURE 1: (a) Synthetic route for Z-5-(5-bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(2-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (TM17). (b) Rosiglitazone chemical structure.

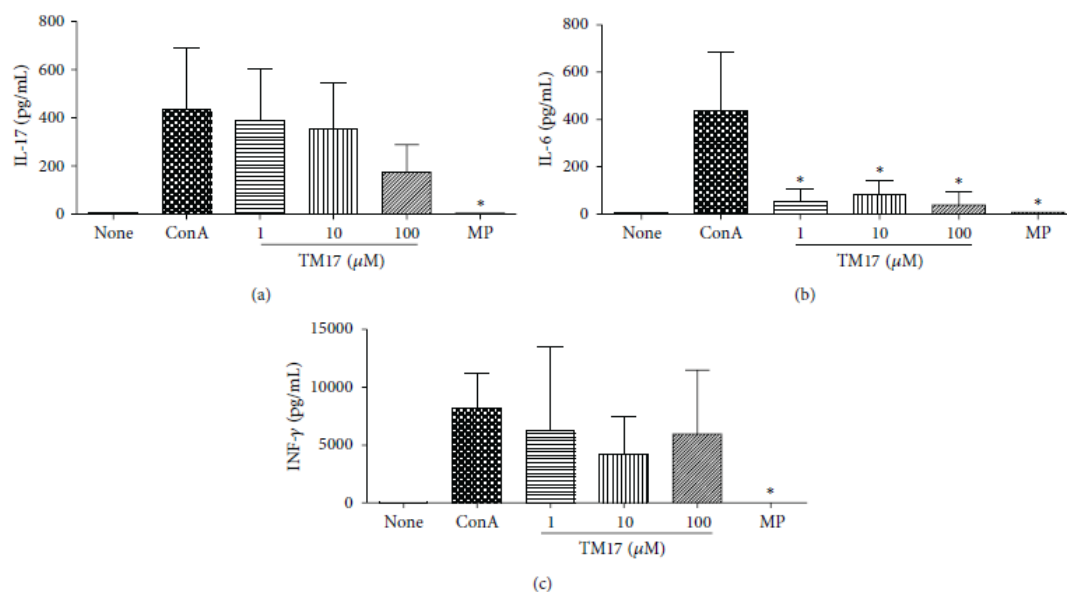


FIGURE 2: Evaluation of proinflammatory cytokines release inhibition by TM17 compound in splenocytes culture. (a) TM17 inhibits the release of IL17A in a dose-dependent manner. (b) IL6 was significantly inhibited by TM17 in all tested doses. (c) TM17 decreases INF γ release mainly in 10 μ M. * $P < 0.05$.

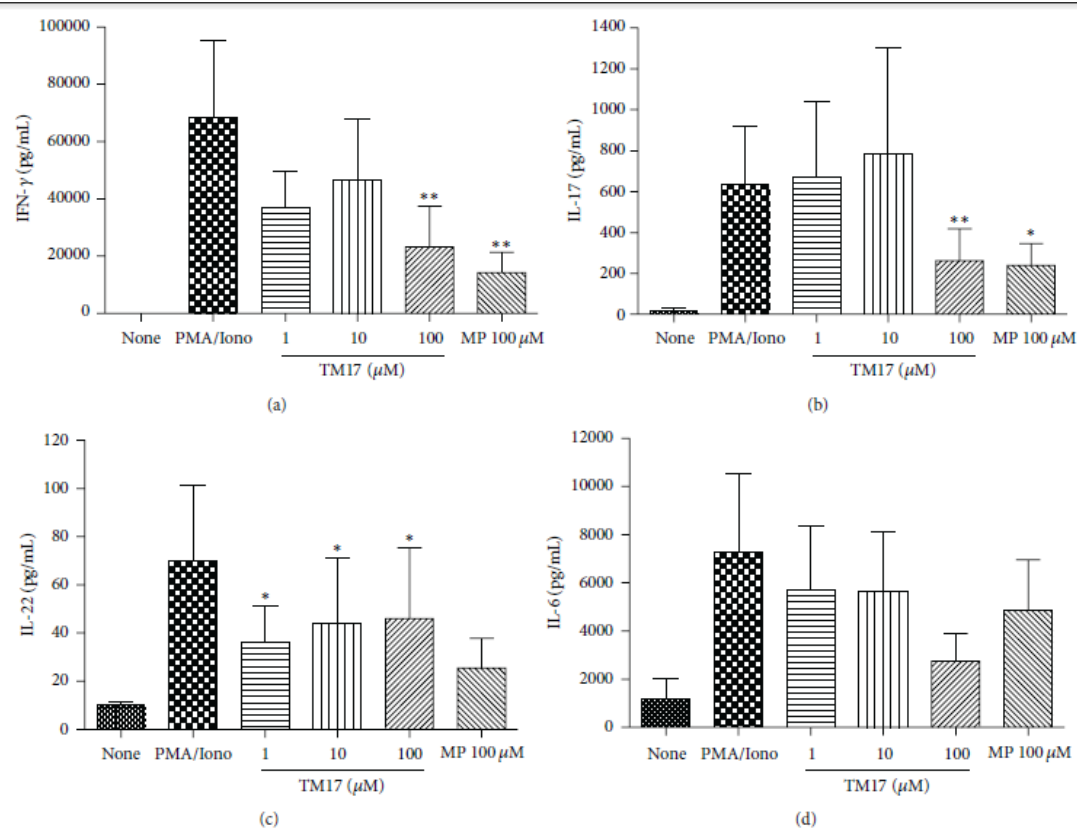


FIGURE 3: Evaluation of cytokines release inhibition by TM17 compound in PBMC culture from RA patients. (a) TM17 in 100 μ M as well as positive control (methylprednisolone) was able to decrease significantly INF γ levels. The same pattern was observed for IL17A (b). (c) IL22 was significantly inhibited in all tested concentrations. (d) IL-6 was not significantly inhibited either by TM17 or by methylprednisolone. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3.3. The Role of TM17 in BALB/c Splenocytes. In order to investigate whether TM17 treatment could modulate cytokines expression we first utilized BALB/c

splenocytes. A dose-dependent reduction was observed in IL-17A level although the differences were not significant (Figure 2(a)). Regarding to IL-6 expression in all TM17 tested concentrations compared with ConA treated cells, there was a significant reduction in the production of this cytokine ($P < 0.02$) (Figure 2(b)). As for IL-17, there was a decrease in IFN- γ release in splenocytes treated with TM17 in a nonsignificative way (Figure 2(c)). IL-22 was also tested, but the levels were not detected in any tested condition. These results suggest that TM17 reduce IL-17A secretion that could be produced primarily by Th17 and $\gamma\delta$ T cells [24] and INF- γ , secreted primarily by Th1 and NKT cells [25], thus acting on different immune cells. Another very interesting TM17 result is the reduction of IL-6 which participates in the Th17 phenotype polarization [26], suggesting that IL-6 secretion inhibition by TM17 could be associated with IL-17A reduced levels.

3.4. The TM-17 Role in Peripheral Blood Mononuclear Cells from RA Patients and Healthily Donors. To investigate the effect of TM17 treatment in IL-17A, IL-22, and IFN- γ releasing RA patients, supernatants were collected and assayed for these cytokines by ELISA. As shown in Figure 3, TM17 caused a reduction in a non-dose-dependent manner of IFN- γ ($P = 0.0039$) and IL-17A ($P = 0.0078$) but significant at 100 μ M when compared to PMA/IONO stimulated cells alone (Figures 3(a) and 3(b)). We also observed a significant IL-22 reduction after TM17 treatment at 100 μ M ($P = 0.035$), 10 μ M ($P = 0.022$), and 1 μ M ($P = 0.022$) differing from MP at 100 μ M ($P = 0.058$) when compared with PMA/IONO stimulated cells (Figure 3(c)). Although the findings were not statistically significant ($P = 0.07$), they show a tendency to decreased IL-6 levels secreted by PBMCs from patients with RA following TM17 at 100 μ M (Figure 3(d)). Tests with PBMCs from healthy donors were also conducted. However in these experiments the IL-22 levels were not detected in any condition analyzed. IFN- γ (Figure 4(a)) and IL-6 (Figure 4(b)) levels were twice lower, on average, than levels from RA patients PBMCs cultures; nevertheless the TM17 at 100 μ M retained its ability to inhibit both cytokines ($P < 0.05$). For IL17 (Figure 4(c)), the compound only retains the ability to significantly reduce the levels of this cytokine at 100 μ M ($P = 0.031$), suggesting that the compound preferentially

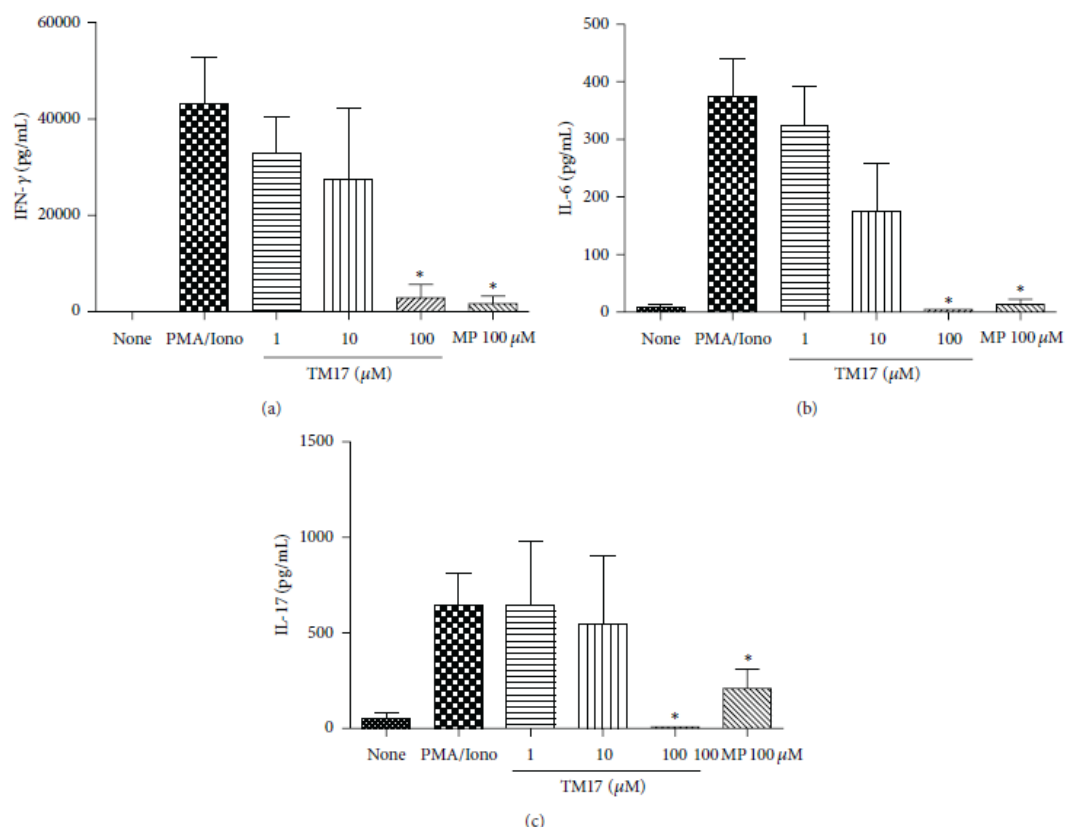


FIGURE 4: Evaluation of cytokines release inhibition by TM17 compound in PBMC culture from healthy donor. (a) TM17 in 100 μ M as well as positive control (methylprednisolone) was able to decrease significantly INF- γ levels. The same pattern was observed for IL-6 (b) and IL-17A (c). * $P < 0.05$.

inhibits the high levels of IL-17 secreted by RA patients cells. Ma and colleagues (2010) showed that besides the well-characterized anti-inflammatory activity of thiazolidinedione ring, the group methoxybenzylidene is also important in this activity [27]. Using a murine model of arthritis, they proved that the compound (Z)-5-(4-methoxybenzylidene) thiazolidine-2,4-dione inhibits the migration of macrophages and decreases the expression of proinflammatory cytokines such as TNF, IL1- β , and IL-6. In a recent study by our group [28] the compound 5-(4-benzylidene-methanesulfonyl)-3-(4-nitrobenzyl)-thiazolidine-2,4-dione also showed an antioxidant and anti-inflammatory activity, so these data together show that the methoxybenzylidene and nitrobenzyl groups could contribute with thiazolidine effect.

3.5. TM17 Modulate PPAR γ mRNA Expression. RA is a systemic inflammatory disease of joints characterized by monocytes/macrophages infiltration, B and T cell activation, autoantibody formation, and production of several cytokines and

matrix metalloproteinases (MMP)s, causing persistent inflammation [3]. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR γ) plays a relevant antiinflammatory role in various diseases, including AR [7]. Accordingly, in order to access PPAR γ modulation by TM17 since this compound is a TZD derivative, we evaluate PPAR γ mRNA expression in PBMCs from healthy individuals exposed six hours to TM17. The already known PPAR γ agonist rosiglitazone was used as positive control. As shown in Figure 5(a), both drugs at 100 μ M induce PPAR γ expression in PBMCs, but TM17 increases PPAR γ expression more expressively. Palma and coworkers (2012) also demonstrated that the PPAR γ agonists 15d-PGJ, methotrexate, and methylprednisolone increase expression of the receptor in cells isolated from healthy donors [8]. Furthermore, the same study showed that patients with rheumatoid arthritis have increased

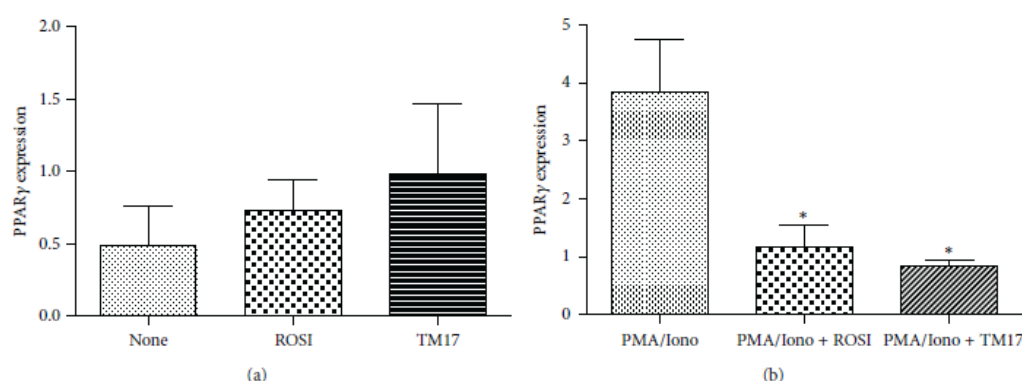


FIGURE 5: PPAR γ expression in PBMCs from healthy individuals. (a) PPAR γ mRNA fold increase in cells treated with rosiglitazone and TM17 compound at 100 μ M concentration. (b) Iono and PMA enhance PPAR γ expression, and TM17 and rosiglitazone reduce significantly PPAR γ mRNA in this condition. * $P < 0.05$.

PPAR γ expression compared to healthy subjects and receptor expression may be associated with a better prognosis. Although the results suggest that TM17 act as PPAR γ modulator, further studies should be conducted to confirm possible role of this new compound as PPAR γ agonist and also other mechanisms of action independent of PPAR γ .

We also analyzed *in vitro* the ability of PMA/IONO (used as standard stimulus) to affect directly PPAR γ expression, in the absence or presence of PPAR γ agonists. As shown in Figure 5(b), PMA/IONO, a strong inflammatory stimulus, increased PPAR γ expression ($P = 0.035$). On the opposite, when rosiglitazone or TM17 was added in the system, these compounds inhibit inflammation and consequently reduce PPAR γ mRNA levels. TM17 significantly

reduced PPAR γ expression in PBMCs stimulated with PMA/IONO ($P = 0.021$). Interestingly, this decrease was higher compared to the positive control rosiglitazone ($P = 0.04$). Our results are in agreement with Klotz and coworkers findings [29].

Their studies study showed that in the experimental model of multiple sclerosis, PPAR γ -mediated T-cell-intrinsic molecular mechanism selectively controls Th17 differentiation by inhibition of TGF- β /IL-6-induced expression of ROR γ t in T cells. The authors also concluded that PPAR γ represents a promising molecular target for specific immunointervention in Th17-mediated autoimmune diseases.

4. Conclusion

This work shows that PBMCs from RA patients under TM17 treatment present a significant reduction in IL-17A, IL-22, and IFN- γ expression but not IL-6, unlike spleenocytes where the compound significantly inhibited IL-6 but not IL-17A and IFN- γ . The compound also enhanced PPAR γ mRNA expression indicating this new compound as a promisor in inflammatory and autoimmune diseases treatment, mainly by reducing IL-17A levels in RA cells.

5. Conflict of Interests

The authors have declared that no conflict of interest exists.

6. Acknowledgments

This study was supported by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Instituto de Ciência e tecnologia-Inovação Farmacêutica (INCT If), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- [1] F. Wolfe, D. M. Mitchell, J. T. Sibley et al., "The mortality of rheumatoid arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 37, no. 4, pp. 481–494, 1994.

- [2] D. R. Brasington Jr., "Clinical features of rheumatoid arthritis," in *Rheumatology*, M. C. Hochberg, J. S. Smolen, M. E. Weinblatt, and M. H. Weisman, Eds., vol. 1, pp. 829–837, Elsevier, Philadelphia, Pa, USA, 5th edition, 2011.
- [3] I. B. McInnes and G. Schett, "The pathogenesis of rheumatoid arthritis," *The New England Journal of Medicine*, vol. 365, no. 23, pp. 2205–2219, 2011.
- [4] I. B. McInnes and G. Schett, "Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis," *Nature Reviews Immunology*, vol. 7, no. 6, pp. 429–442, 2007.
- [5] M. Chabaud, F. Fossiez, J. Taupin, and P. Miossec, "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," *Journal of Immunology*, vol. 161, no. 1, pp. 409–414, 1998.
- [6] P. Miossec, T. Korn, and V. K. Kuchroo, "Interleukin-17 and type 17 helper T cells," *The New England Journal of Medicine*, vol. 361, no. 9, pp. 848–898, 2009.
- [7] C. Giaginis, A. Giagini, and S. Theocharis, "Peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) ligands as potential therapeutic agents to treat arthritis," *Pharmacological Research*, vol. 60, no. 3, pp. 160–169, 2009.
- [8] A. Palma, P. P. Sainaghi, A. Amoruso et al., "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in monocytes/macrophages from rheumatoid arthritis patients: relation to disease activity and therapy efficacy—a pilot study," *Rheumatology*, vol. 51, no. 11, pp. 1942–1952, 2012.
- [9] M. V. Schmidt, B. Brüne, and A. von Knethen, "The nuclear hormone receptor PPAR γ as a therapeutic target in major diseases," *The Scientific World Journal*, vol. 10, pp. 2181–2197, 2010.
- [10] G. Pascual and C. K. Glass, "Nuclear receptors versus inflammation: mechanisms of transrepression," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 17, no. 8, pp. 321–327, 2006.

- [11] D. S. Straus and C. K. Glass, "Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms," *Trends in Immunology*, vol. 28, no. 12, pp. 551–558, 2007.
- [12] S. R. Farmer, "Transcriptional control of adipocyte formation," *Cell Metabolism*, vol. 4, no. 4, pp. 263–273, 2006.
- [13] T. M. Willson, M. H. Lambert, and S. A. Kliewer, "Peroxisome proliferator-activated receptor γ and metabolic disease," *Annual Review of Biochemistry*, vol. 70, pp. 341–367, 2001.
- [14] M. Lehrke and M. A. Lazar, "The many faces of PPAR γ ," *Cell*, vol. 123, no. 6, pp. 993–999, 2005.
- [15] L. Széles, D. Törőcsik, and L. Nagy, "PPAR γ in immunity and inflammation: cell types and diseases," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1771, no. 8, pp. 1014–1030, 2007.
- [16] J. Choi and A. L. M. Bothwell, "The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases," *Molecules and Cells*, vol. 33, no. 3, pp. 217–222, 2012.
- [17] B. Cariou, B. Charbonnel, and B. Staels, "Thiazolidinediones and PPAR γ agonists: time for a reassessment," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 23, no. 5, pp. 205–215, 2012.
- [18] P. Desreumaux, L. Dubuquoy, S. Nutten et al., "Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) heterodimer: a basis for new therapeutic strategies," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 193, no. 7, pp. 827–838, 2001.
- [19] F. C. Arnett, S. M. Edworthy, D. A. Bloch et al., "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 31, no. 3, pp. 315–324, 1988.
- [20] C. D. Barros, A. A. Amato, T. B. D. Oliveira et al., "Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ

ligands,” *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 18, no. 11, pp. 3805–3811, 2010.

[21] S. F. Tan, K. P. Ang, and Y. F. Fong, “(2)- and (C)-5-arylmethylenehydantoins: spectroscopic properties and configuration assignment,” *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, vol. 2, p. 1941, 1986.

[22] J. F. C. Albuquerque, A. Albuquerque, C. C. Azevedo et al., “Substituted thiazolidinediones and thio-imidazolidinones: synthesis, structural study and pharmacological activity,” *Pharmazie*, vol. 50, no. 6, pp. 387–389, 1995.

[23] V. L. M. Guarda, M. A. Pereira, C. A. De Simone et al., “Synthesis and structural study of arylidene thiazolidine and benzothiazine compounds,” *Sulfur Letters*, vol. 26, no. 1, pp. 17–27, 2003.

[24] K. Hirota, J. H. Duarte, M. Veldhoen et al., “Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses,” *Nature Immunology*, vol. 12, no. 3, pp. 255–263, 2011.

[25] K. Schroder, P. J. Hertzog, T. Ravasi, and D. A. Hume, “Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 75, no. 2, pp. 163–189, 2004.

[26] P. C. Heinrich, I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. M. Müller-Newen, and F. Schaper, “Principles of interleukin(IL)-6-type cytokine signalling and its regulation,” *Biochemical Journal*, vol. 374, no. 1, pp. 1–20, 2003.

[27] Y. Ma, X. Wang, X. Wu et al., “(Z)-5-(4-methoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione ameliorates the adjuvant-induced arthritis via inhibiting the migration of macrophage and downregulating the cytokine mRNA expression,” *International Immunopharmacology*, vol. 10, no. 11, pp. 1456–1462, 2010.

[28] L. A. Faine, M. Rudnicki, F. A. C. Cesar et al., “Anti-inflammatory and antioxidant properties of a new arylidene-thiazolidinedione in macrophages,” *Current Medicinal Chemistry*, vol. 18, no. 22, pp. 3351–3360, 2011.

[29] L. Klotz, S. Burgdorf, I. Dani et al., “The nuclear receptor PPAR γ selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, no. 10, pp. 2079–2089, 2009.

7. Figure legends

Figure 01. Synthetic route for Z-5-(5-Bromo-2-methoxy-benzylidene)-3-(2-nitro-benzyl)-thiazolidine-2,4-dione (LPSF/TM-17).

Figure 02: Evaluation of pro-inflammatory cytokines release inhibition by TM17 compound in splenocytes culture. A) TM17 inhibits the release of IL17A in a dose dependent manner. B) IL6 was significantly inhibited by TM17 in all tested doses. C) TM17 decreases IFN γ release mainly in 10 μ M. * $p < 0.05$

Figure 03: Evaluation of cytokines release inhibition by TM17 compound in PBMC culture from RA patients. A) TM17 in 100 μ M as well as positive control (Methylprednisolone) were able to decrease significantly IFN γ levels. The same pattern was observed for IL17A (B). C) IL-6 was not significantly inhibited either by TM17 or by Methylprednisolone D) IL22 was significantly inhibited in all tested concentration. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Figure 04: PPAR γ expression in PBMCs from healthy individuals. A) PPAR γ mRNA fold increase in cells treated with Rosiglitazone and TM17 compound at 100 μ M concentration. B) Iono and PMA enhance PPAR γ expression and TM17 and rosiglitazone reduce significantly PPAR γ mRNA in this condition. * $p < 0.05$

8. Figures

Figure 01

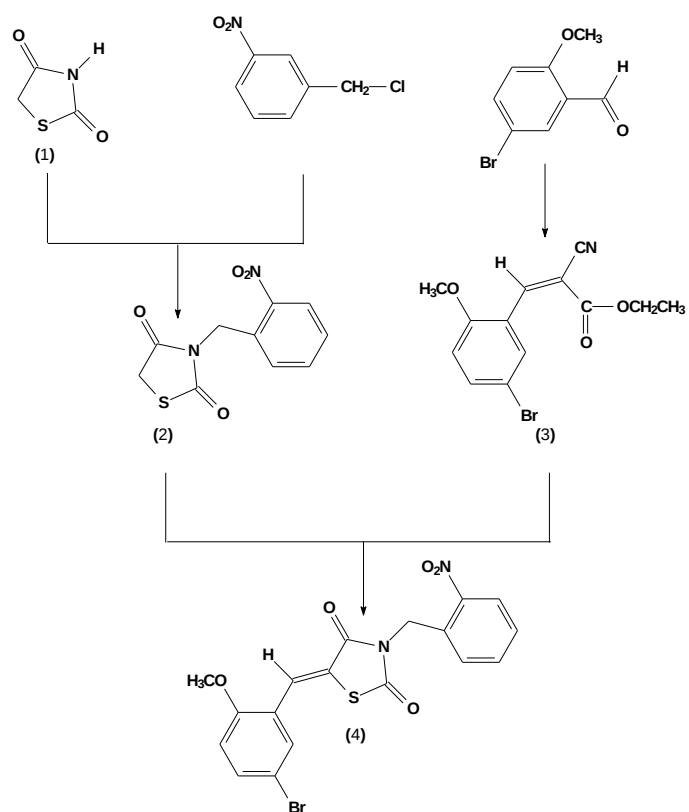
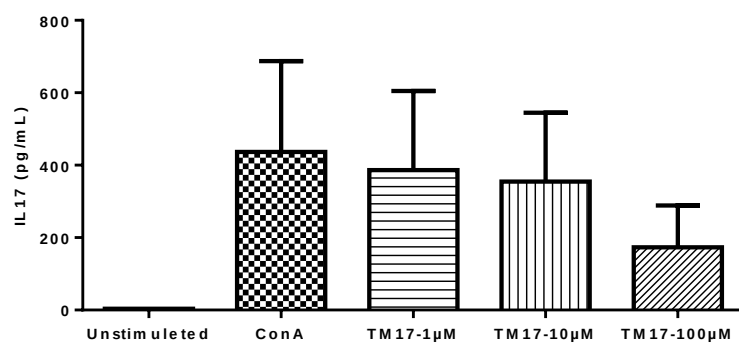


Figure 02

A



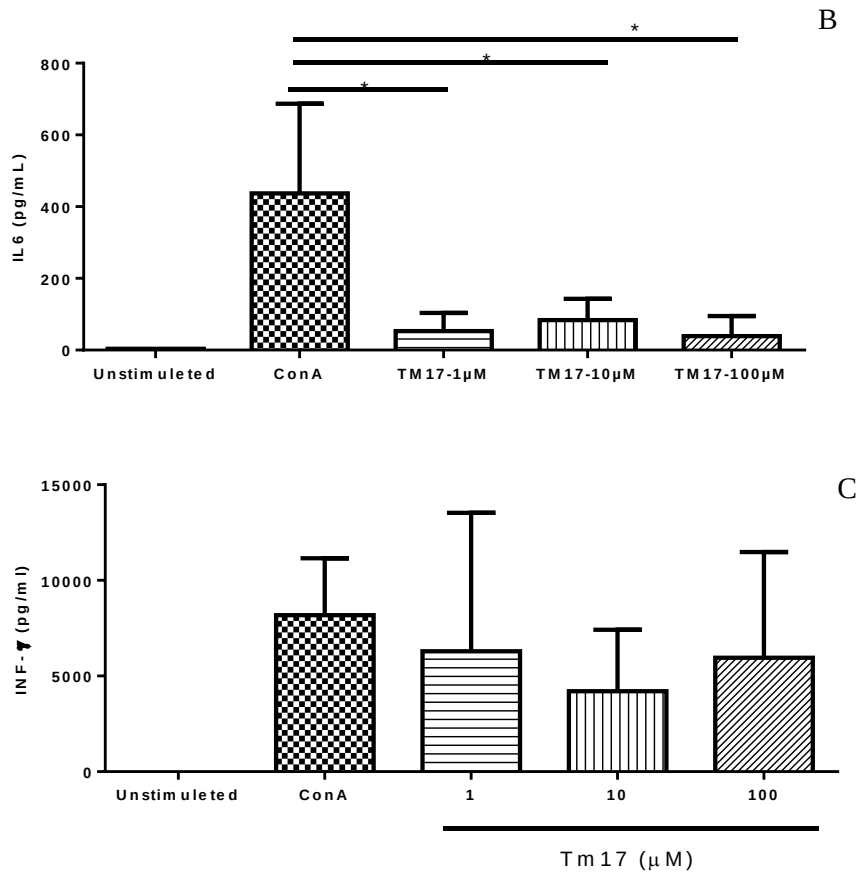
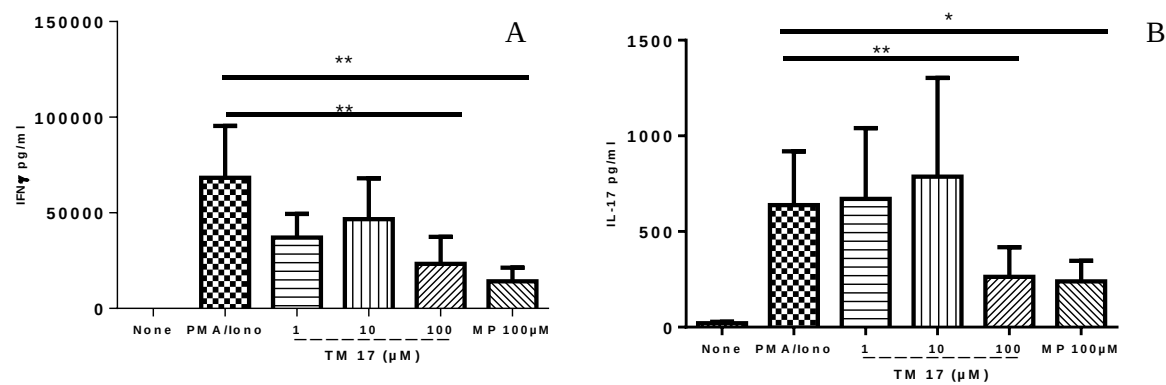


Figure 03



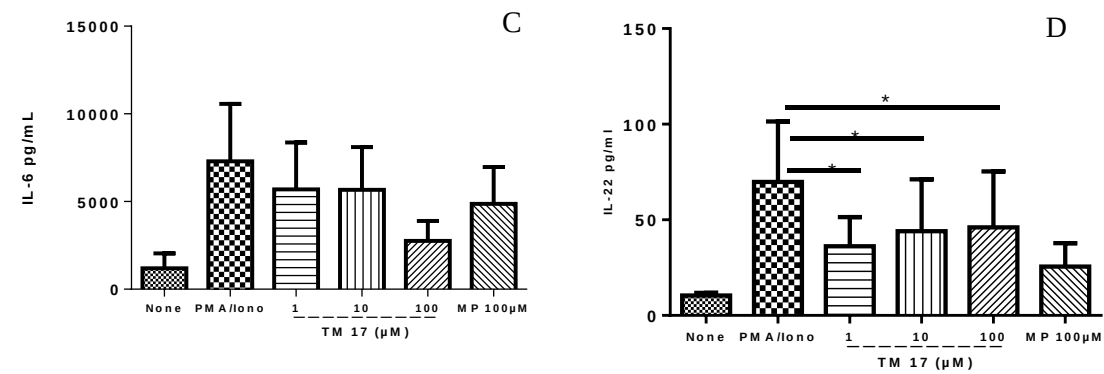


Figure 04

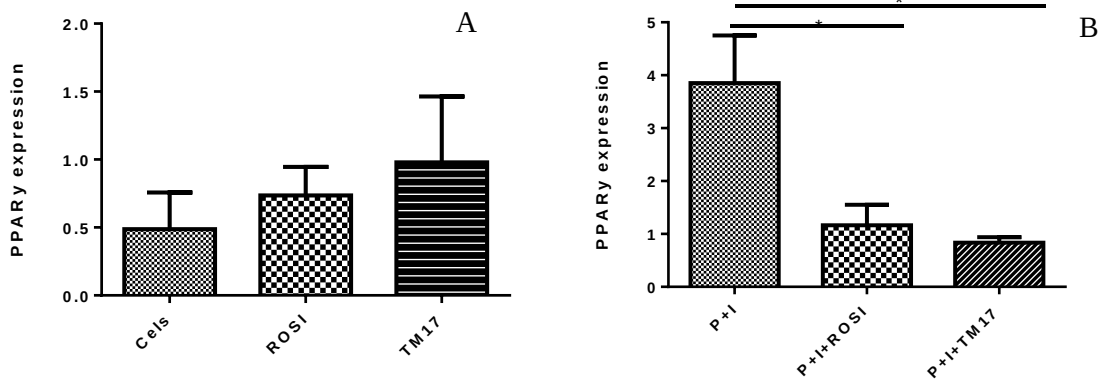


Table 1. Demographic, clinical and laboratory presentation of the patients with RA

Table 1. Demographic, clinical and laboratory presentation of the patients with RA	
Number of patients	9
Age (years) Mean (range)	52,6(30-69)
Sex Female/Male	9/0
Disease duration (years) Mean (range)	6 years (0.1-16.2)
Rheumatoid factor Positive/Negative	8/1
Treatment Non-steroidal anti-inflammatory drugs Steroids Methotrexate Leflunomide Antimalarial agents Biologic Therapy	1 8 4 2 1 -
Disease activity DAS28 Clinical remission Mild disease Moderate disease Severe disease CDAI Clinical remission Mild disease Moderate disease Severe disease	- 4 2 3 - - 5 4

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A AR é uma das mais comuns doenças inflamatórias da articulação e tem uma ampla distribuição mundial. Apesar de muitos esforços em pesquisa, a fisiopatogenia dessa doença ainda não está totalmente estabelecida. Muitas citocinas participam da patogênese da doença e contribuem de forma diversa para a inflamação e progressão do dano articular (MCINNES & SCHETT, 2011; CHOY & BOTHWELL, 2012).

Os resultados da presente dissertação sugerem que a IL-22 pode contribuir de forma importante para a fisiopatologia da doença. Em nosso artigo publicado no *Journal of Rheumatology*, em 2012, os Níveis de IL-22 mostraram-se aumentados em pacientes com AR comparados a controles saudáveis e correlacionaram-se com os índices de atividade de doença CDAI e DAS28. Diversos estudos recentes demonstraram a importância da IL-22 na AR (ZHANG et al., 2011; ZENEWICS & FLAVELL, 2011; LEIPE et al., 2011; SHEN, GOODALL & HILL GASTON, 2009; CASCAO et al., 2010) e o papel da IL-22 na fisiopatologia da AR tem sido amplamente sugerido (ZENEWICS & FLAVELL, 2011; LEIPE et al., 2011; SHEN, GOODALL & GASTON, 2009). Esses achados estão de acordo com um recente estudo que descreveu níveis plasmáticos de IL-22 aumentados em 30 pacientes com AR estabelecida com uma duração média de doença de 10,7 anos, embora nesse estudo os pacientes não tinham recebido nenhuma terapia com drogas imunomoduladoras por pelo menos 2 meses (ZHANG et al., 2011). Todos os pacientes de nosso estudo estavam sob terapia farmacológica, a duração média da doença foi de 10,5 anos e a maioria dos pacientes tinham doença ativa. Outro estudo recente mostrou que níveis de IL-22 estavam aumentados em quase 50% dos pacientes com doença em estágio muito inicial e ativa. Neste estudo, não houve diferença em medidas de atividade de doença entre os grupos de pacientes com AR e níveis de IL-22 altos e os pacientes com níveis de IL-22 normais. Os pacientes desse estudo não tinham sido tratados com nenhuma terapia modificadora de doença ou corticosteroides. Os níveis iniciais de IL-22 foram significativamente associados com erosões radiográficas das mãos (LEIPE et al., 2011). Nós encontramos níveis mais altos de IL-22 em pacientes

com erosão óssea. Tais achados reforçam a importância da IL-22 como um possível marcador preditivo de destruição óssea na AR. Entretanto, dados anteriores demonstraram que níveis de IL-22 estavam elevados em pacientes com doença estabelecida assim como pacientes com doença em estágio inicial (CASCAO et al., 2010). A população de nosso estudo foi predominantemente de pacientes com doença estabelecida, ressaltando a importância dessa citocina pró-inflamatória na participação do processo inflamatório crônico da doença.

Nosso trabalho descreveu que os níveis de IL-22 diferem em níveis diversos de medidas de atividade da doença (DAS28 e CDAI), mostrando uma tendência linear de que quanto maiores os níveis de IL-22, maiores os índices de atividade da doença. Nosso estudo foi pioneiro em associar os níveis de IL-22 com severidade de doença usando o DAS28 e o CDAI e dessa forma revelando significância estatística em pacientes com doença estabelecida. Entretanto, estudo prévio não encontrou correlação dos níveis de IL-22 e DAS28 em um grupo similar de pacientes na China (ZHANG et al., 2011). Todavia, nossa população foi maior (n=83) e deve-se levar em consideração a influência de fatores genéticos em alguns grupos étnicos na fisiopatogênese da doença (KOCHI et al., 2010).

O fenótipo celular Th22, recentemente descrito, não expressa IFN γ ou IL-17 assim como também os fatores de transcrição relacionados as vias Th1 e Th17. (DUHEN et al., 2009 & TRIFARI et al., 2009). As células Th22 são induzidas por células epidérmicas de Langerhans e por células dendríticas plasmocitoides, e as citocinas TNF- α e IL-6 estão relacionadas a sua expressão (ZHANG et al., 2011). Embora o papel da via Th22 permaneça incerto na AR, esse subtipo celular tem sido associado a doença e correlacionou com níveis plasmáticos de IL-22 em pacientes com AR (ZHANG et al., 2011). Nossa análise mostrou que níveis de IL-22 estavam significativamente mais altos em nossos pacientes, mas não das outras citocinas expressas por outras subpopulações celulares IFN- γ e IL-17 (dados não publicados). Sugere-se aqui um possível papel patogênico do fenótipo Th22 na AR.

Interessantemente, quando os pacientes foram divididos em dois grupos relacionados à positividade para o FR (grupo FR positivo e grupo FR negativo) houveram diferenças significativas dos níveis de IL-22 entre os dois grupos. Houve importante associação de níveis mais altos de IL-22 com positividade para o fator reumatoide. O FR sérico e células B produtoras de FR contribuem para os mecanismos fisiopatogênicos da AR (DASS & WEISMAN, 2011). Em alguns modelos animais de AR, a formação de imunocomplexos mediada por autoanticorpos é um mecanismo importante. Na artrite induzida por colágeno, a IL-22 foi associada a regulação da produção de anticorpos (GEBOES et al., 2009), embora estudo prévio demonstrou que linfócitos B não expressam o receptor para IL-22 (IL-22R1) (WOLK & SABAT., 2006). Níveis mais altos de IL-22 foram associados a presença do FR na Síndrome de Sjögren (LAVOIE et al., 2011).

De outra forma, dados contraditórios tem sido reportados para correlação de níveis de IL-17 e atividade da doença. De forma similar a dois estudos prévios, não encontramos correlação dos níveis de IL-17 com o DAS28 e CDAI (dados não publicados) (MELIS et al., 2010 & YAMADA et al., 2008). Outro estudo recente evidenciou que níveis mais altos de IL-17 estavam associadas com medidas sistêmicas de doença mais ativa em 30 pacientes (METAWI et al., 2011), porém o menor número de pacientes da amostra desse trabalho deve ser levado em consideração e estudos adicionais são necessários.

A importância das células Th17 no mecanismo pelo qual IL-17 induz respostas autoimunes promovendo a formação de centros germinativos em camundongos tem sido descrita (HSU et al., 2008). A IL-17 está também associada com a sobrevivência e proliferação de células B e em sua diferenciação em células secretoras de imunoglobulina (DOREAU et al., 2009). Além disso, a importância dos linfócitos B na regulação da resposta Th17 foi recentemente demonstrada. A depleção de linfócitos B com rituximabe levou a uma redução do número de células Th17 assim como também níveis diminuídos de IL-17A, IL-21 e IL-22 em pacientes com AR (VAN DE VEERDONK et al., 2011). A associação de IL-22 com autoanticorpos requer investigação adicional. Uma limitação de nosso estudo é que não foram

mensurados os títulos de FR, níveis de proteína C reativa, sintomas extra-articulares e a presença de anti-CCP. Já é amplamente descrito a associação de níveis mais altos de autoanticorpos com doença mais severa, e dessa forma foi possível identificar clinicamente significativa associação dos níveis de IL-22 com parâmetros de doença mais severa mensurados pelos níveis de DAS28 e CDAI. A maioria de nossos pacientes tinham longo tempo de doença apesar do tratamento, o que também sugere um curso mais severo da AR nesses pacientes.

Os níveis de IL-22 foram maiores em pacientes com erosões ósseas. Um modelo experimental de artrite (IL-1Ra^{-/-}) apresentou artrite erosiva progressiva caracterizada pela regulação positiva de IL-22 na sinóvia severamente inflamada. O tratamento desses camundongos com anticorpo anti-IL22 reduziu significativamente a inflamação e as erosões ósseas (MARIJINISSEN et al., 2011). Estudo *in vitro*, mostrou que a IL-22 promove osteoclastogênese, um processo que pode contribuir para sua ação pró-inflamatória na artrite induzida por colágeno (GEBOES et al., 2009). Outro estudo evidenciou que a IL-22 regula de forma positiva a expressão do RANKL em fibroblastos sinoviais de pacientes com AR e induz osteoclastogênese e dessa forma pode piorar a sinovite e a destruição óssea da doença (KIM et al., 2012).

Os achados descritos ressaltam a importância da descoberta e contribuição de novas citocinas para a patogênese de doenças autoimunes, como a AR. Um melhor conhecimento sobre o papel da IL-22 tem destacado o papel dessa citocina na doença e como um biomarcador de severidade, além de colocar a imunomodulação da IL-22 como potencial alvo terapêutico.

A ação pró-inflamatória do IFN γ foi descrita associado a AR inicial, enquanto como inibidor do processo inflamatório em uma fase tardia da doença (BOISSIER et al., 1995). Esse mesmo estudo evidenciou que tratamento com anticorpo anti-IFN γ diminuiu os níveis de anticorpo anticolágeno e reduziu a severidade da artrite induzida. Entretanto, tratamento em fase tardia da doença com o mesmo anticorpo agravou a artrite, e esse efeito foi neutralizado com tratamento com IFN γ , indicando que essa citocina pode ter efeito imunossupressor em estágios mais tardios da doença (BOISSIER et al., 1995).

A administração de IFN γ na fase inicial da artrite induzida por colágeno (CIA) acelerou o desenvolvimento da doença e aumentou sua incidência em camundongos (COOPER, SRIRAM & RANGES, 1988). Camundongos *knockout* para IFN γ e seu receptor são resistentes a desenvolver CIA. Por outro lado, camundongos *knockout* para os genes do IFN γ e de seu receptor apresentaram maior susceptibilidade de desenvolver CIA. (CHU et al., 2003). Camundongos *knockout* para o receptor do IFN γ apresentavam CIA mais severa que camundongos selvagens (VERMEIRE et al., 1997). O efeito inibidor do IFN γ foi demonstrado ser causado por seus efeitos antiproliferativos e antiapoptóticos em células T ativadas. Deficiência em receptores de IFN γ diminuem a indução de células T regulatórias CD4+CD25+; e estas são capazes de inibir a ativação de células T efectoras (CHEN & LIU, 2009).

O uso do IFN γ em ensaio clínicos com AR tem levado a resultados conflitantes. Um estudo demonstrou que IFN γ recombinante não teve melhor efeito que placebo (VEYS, MENKES & EMERY, 1997). Entretanto outro estudo mostrou que IFN γ aliviou sintomas relacionados a AR de forma importante incluindo rigidez matinal, melhora de força e de edema articular (MACHOLD, NEUMANN & SMOLEN, 1992). Também há relato que anticorpo anti-IFN γ produziu efeito importante no tratamento de pacientes com AR (SKURKOVICH & SKURKOVICH, 2006). Uma melhor compreensão da relação do IFN γ e células T efectoras e células T regulatórias é necessário para melhor compreensão de sua imunomodulação no tratamento da AR.

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pleotrópica secretada por linfócitos T e macrófagos e tem impacto significativo na regulação imune, hematopoese e inflamação. Suas ações estão relacionadas a sua ligação com o receptor IL-6R. Na prática clínica a IL-6 é melhor descrita por seus potentes efeitos pró-inflamatórios. Está relacionada a indução de febre, fadiga e muitas manifestações clínicas associadas a inflamação sistêmica. Sua ação no fígado está associada a um aumento na produção de um amplo espectro de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa, proteína amiloide sérica A (SAA, do inglês serum amyloid protein), haptoglobina, fibrinogênio e hepcidina enquanto reduz albumina, transferrina e fibronectina. Na medula óssea sua ação está associada a leucocitose e trombocitose. Tem ação descrita na diferenciação de

células B em células B produtoras de anticorpos e indução da secreção de imunoglobulina e produção de autoanticorpos. A ação da IL-6 nas células T consiste em promover a diferenciação das células T helper em células T helper produtoras de IL-17 assim como na diferenciação de células T CD8+ na ativação de células citotóxicas (KALY & ROSNER, 2012).

Aspectos adicionais da IL-6 relacionados a patogênese da artrite reumatoide são hipervascularização do tecido sinovial induzida pela IL-6 devido a produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*) e ativação e diferenciação de osteoclastos relacionados a erosões e reabsorção ósseas (KOTAKE et al., 1996; NAKAHARA et al., 2003). Atualmente, encontra-se disponível para o tratamento da AR o anticorpo monoclonal anti receptor de IL-6, tocilizumabe.

A IL-17 é a principal citocina produzida pelo fenótipo Th17. Em camundongos deficientes para IL-17 a CIA mostrou-se marcadamente suprimida (NAKAE et al., 2003). A expressão do receptor de IL-17 (IL-17R) em fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e neutrófilos indicam que essa citocina tem potencial de influenciar em várias vias e células efectoras envolvidas na AR (KOLLS & LINDEN, 2004). Na AR a IL-17 também está associada ao recrutamento de monócitos e neutrófilos pelo aumento de produção local de quimiocinas, facilitação da infiltração e ativação de células T, amplificação de resposta imune induzindo a produção de outras citocinas, aumento da liberação de citocinas e metaloproteinases por fibroblastos sinoviais[20], osteoclastogênese (MCINNIS & SCHETT, 2007) e dano articular (KOENDERS et al., 2005). Além disso, tem ação sinérgica com IL-1 β , TNF α e IFN γ (NALBANDIAN, CRISPIN & TSOKOS, 2009; BETELLI et al. 2008). Estudos clínicos com anticorpos com ação bloqueadora de IL-17 estão em andamento (GENOVESE et al., 2012).

Estratégias inovadoras na abordagem terapêutica da AR com enfoque em modular citocinas tem mostrado ser alternativas promissoras para o tratamento dessa patologia, principalmente para os pacientes que permanecem refratários a modalidades terapêuticas estabelecidas.

Diante disso, avaliamos a atividade imunomoduladora do novo derivado tiazolidínico LPSF/TM17 agonista do PPAR γ na AR. O LPSF/TM17 inibiu

expressão das citocinas inflamatórias IFN γ , IL-6, IL-22 e IL-17 em células mononucleares periféricas de pacientes com AR.

Os PPARs são receptores hormonais nucleares, inicialmente descritos como alvos moleculares para compostos que induzem proliferação peroxissomal (DESVERGNE & WAHLI, 1999; BERGER&WAGNER, 2002). Atualmente três diferentes subtipos de PPAR foram identificados: PPAR- α , - β/δ e - γ . O PPAR γ é o subtipo mais estudado entre os três subtipos descritos. Está principalmente expresso em tecido adiposo e, em menor extensão, em outros tecidos e células do corpo e desempenham papel central no processo de diferenciação de adipócitos, utilização de glicose periférica e sensibilização a insulina (GIAGINIS, GIAGINI & THEOCHARIS, 2009). Sua ação, já descrita no corpo desta dissertação, é dada por um grupo amplo de ligantes seletivos naturais e sintéticos. As TZDs constituem os ligantes sintéticos mais bem conhecidos e representam uma classe promissora de agentes anti-diabéticos orais para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2 (LEHMANN et al., 1995; HENKE et al., 1998). Vários estudos revelaram outras ações desses agentes que estão além da abordagem de doenças metabólicas, incluindo propriedades anti-neoplásicas e anti-inflamatórias (THEOCHARIS et al., 2004; GIAGINIS, MARGELI & THEOCHARIS, 2007).

PPAR γ participa em diferentes doenças inflamatórias e autoimunes, como a AR. Há evidências de que a ativação do PPAR γ pode inibir vias importantes de sinalização da inflamação e reduzir a síntese de cartilagem e fatores catabólicos responsáveis pela degradação articular na AR (GIAGINIS, GIAGINI & THEOCHARIS, 2009).

É documentando, de forma substancial, na literatura que os ligantes do PPAR γ podem inibir a produção de diversas citocinas relacionadas as células T, incluindo a citocina chave da via Th1, o IFN γ . Em PBMCs de pacientes com tireoidite de Hashimoto e controles saudáveis a rosiglitazona reduziu a expressão de IFN γ por células CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ de uma maneira dose-dependente. (OKOSIEME et al., 2006) Camundongos deficientes em PPAR γ são ineficazes em acumular células T efectoras em órgãos linfóides secundários e tecidos e dessa forma comprometem a habilidade dessas células em produzir

IFN γ e IL-17 em sítios inflamatórios (HOUSLEY et al., 2011; OKOSIEME et al., 2006). Troglitazona demonstrou modular os níveis de produção de IFN γ de linfócitos humanos ativados de pessoas saudáveis *in vitro* (GIORGINI et al., 1999). Ligantes do PPAR γ reduziram a produção de IFN γ em esplenócitos e clones de células T de camundongos SJL (CUNARD et al., 2002). O tratamento com pioglitazona em ratos com o modelo experimental de miocardite autoimune modificou o desequilíbrio das células Th1/Th2 regulando de forma positiva o mRNA da citocina da via Th2 IL-4 e reduzindo os níveis de mRNA de IFN γ (HASEGAWA et al., 2005). O tratamento de camundongos diabéticos com rosiglitazona resultou em significativa diminuição dos níveis pancreáticos de TNF- α e IFN γ comparados com camundongos diabéticos não tratados (AWARA et al., 2005).

Os estudos que relacionam o IFN γ com ligantes de PPAR γ na artrite são bastante escassos. Um único estudo publicado em 2006 demonstrou que o tratamento *in vivo* de camundongos com artrite induzida por colágeno com o novo ligante sintético do PPAR THR0921 resultou em produção diminuída de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ em células esplênicas desses animais (TOMITA, KAKIUCHI & TSAO, 2006).

Há evidências importantes da associação do PPAR γ com a via Th17. A ativação farmacológica do PPAR γ seletivamente interfere na diferenciação das células T em células Th17. Sob condições fisiológicas, o co-repressor SMRT (do inglês, *silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors*) está ligado ao promotor ROR γ t e inibe sua transcrição. A ativação do PPAR γ parece impedir a remoção desse complexo co-repressor, e desta forma inibe a expressão de ROR γ t e a diferenciação de células Th17 induzidas pelo ROR γ t (HWANG, 2010; KLOTZ & KNOELLE 2011). Em camundongos *knockout* PPAR γ $-/-$, a diferenciação em células Th17 está fortemente aumentada. Em um modelo de encefalite experimental autoimune – EAE (do inglês, *experimental autoimmune encephalomyelitis*), caracterizado por uma infiltração aumentada de células Th17 no sistema nervosa central, o tratamento com pioglitazona aliviou a severidade da doença e camundongos PPAR γ $-/-$ exibiram maior gravidade da doença. Em células T CD4 $^{+}$ T isoladas do sistema nervoso central desse modelo experimental (EAE), os ligantes endógeno (13-

HODE) e sintético (pioglitazona) agonistas do PPAR γ suprimiram a diferenciação em células Th17, mas não a diferenciação dos subtipos Th1, Th2 ou Treg. Também foi demonstrada uma expressão diminuída das citocinas da via Th17: IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 e IL-23R. Além disso houve uma inibição seletiva da expressão do ROR γ t mediada por TGF β /IL-6 (KLOTZ et al., 2009). Os agonistas do PPAR γ 15d-PGJ2 e rosiglitazona inibiram a indução da proteína da IL-23 pelas células do sistema nervoso central estimuladas por LPS (XU & DREW, 2007). Em modelos de asma alérgica, o tratamento com 15d-PGJ2, rosiglitazona e pioglitazona promoveu uma redução da IL-17 e IL-23 (FARNESI DE ASSUNÇÃO et al., 2012). Esses estudos demonstram que a ativação do PPAR γ pode regular a diferenciação e função de células Th17, suprimindo o desenvolvimento dessas células e diminuindo a expressão de citocinas relacionadas a esse fenótipo celular.

Curiosamente, a observação de que células T CD4⁺ de mulheres estão intrinsicamente orientadas a proliferar e produzir níveis mais altos de IFN γ e níveis mais baixos de IL-17A comparadas com células T de homens foi documentada recentemente. Tal alteração relacionada ao sexo também foi aparente em camundongos SJL (do inglês, *Swiss/Jackson Laboratory*) no mesmo estudo. Os autores concluem demonstrando que a expressão do PPAR γ 1 estava aumentada em células T de mulheres. O estudo relata que seus resultados estão de acordo com estudos anteriores nos quais se sabe que mulheres estão mais propensas a desenvolverem doenças autoimunes por terem uma resposta Th1 mais expressiva. Porém, atualmente, sabe-se que as doenças autoimunes tem predomínio do fenótipo Th17. Além disso, os camundongos machos nesse trabalho não estavam protegidos de desenvolver EAE quando induzidos (ZHANG et al., 2012). De certo, estudos adicionais são necessários para elucidar melhor a diferença das células T do gênero masculino e do gênero feminino e sua relação com o PPAR γ .

Um único estudo relacionou uma regulação positiva da expressão da IL-22 com PPAR γ em um modelo experimental de doença inflamatória intestinal em camundongos deficientes em macrófagos com PPAR γ . Outras citocinas e quimiocinas também tiveram regulação positiva nesse mesmo estudo IFN- γ , CXCL9, CXCL10, IL1RL1, CCR1. Novamente o papel dos agonistas do

PPAR γ , como potencial alvo terapêutico nas doenças inflamatórias e a importância na doença inflamatória intestinal foi reportado e revisado nesse trabalho (HONTECILLAS et al., 2011).

O papel dos agonistas do PPAR γ em doenças inflamatórias e autoimunes ainda não está totalmente elucidado. Estudos recentes destacam a importância desses receptores e seus agonistas em doenças inflamatórias e autoimunes como Esclerose Múltipla (HWANG, 2010), doença inflamatória intestinal (ANNESE et al., 2012), artrite psoriásica (BONGARTZ et al., 2005), esclerose sistêmica (WEI et al., 2012) e lúpus eritematoso sistêmico (Arahamian et al., 2009). Nesse sentido, estudos adicionais são necessários para elucidar melhor a relação destes receptores e sua ativação com a AR. A busca por novos alvos terapêuticos e biomarcadores na AR é constante. Essa dissertação demonstrou a importância da IL-22 na patogênese da doença e como potencial biomarcador de severidade da doença. Os resultados indicam um possível papel patofisiológico da IL-22 na AR e sugerem que essa citocina pode servir de ferramenta adicional para avaliar atividade e severidade da doença, particularmente em pacientes com FR positivo e com doença estabelecida. O derivado tiazolidínico demonstrou reduzir a expressão de citocinas inflamatórias com IFN γ , IL-17, IL-6 e IL-22. Os dados reportados nesse trabalho tem demonstrado que o PPAR γ participa no controle da inflamação, especialmente modulando a produção de seus mediadores. Novos ligantes do PPAR γ podem ser potencialmente úteis para o tratamento da AR.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Níveis de IL-22 encontraram-se aumentados comparados com controles saudáveis e correlacionaram-se com atividade de doença, presença de fator reumatoide e presença de erosões ósseas a radiografia de mãos.
- O LPSF/TM17 inibiu a expressão das citocinas IFN γ , IL-17, IL-6 e IL-22, em PBMCs de controles saudáveis e pacientes com AR sugerindo que este composto tem potencial terapêutico promissor no tratamento de pacientes com AR.

PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

- Elucidar novos mecanismos fisiopatogênicos através da avaliação de citocinas das vias TH17 e TH22 na AR, assim como determinar sua associação com dados clínicos, laboratoriais e severidade da doença;
- Determinar o perfil de citocinas das vias Th17 e Th22 no líquido sinovial de pacientes portadores de AR e associar seus níveis com parâmetros clínicos e laboratoriais;
- Avaliar o efeito do LPSF/TM17 em PBMCs e nas células presentes no líquido sinovial de pacientes portadores de AR após estimulação com anti-CD3+anti-CD28 e PMA+Ionomicina;
- Avaliar a expressão de genes das vias Th17 e Th22 no líquido sinovial e nas PBMCs após exposição ao LPSF/TM17;
- Imunofenotipar as células Th17 e Th22 presentes no líquido sinovial e nas PBMCs;
- Avaliar atividade imunomoduladora de outros derivados tiazolidínicos sintetizados no LPSF da UFPE.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

Aletaha, D., et al.; Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis. Res. Ther.* 2005; 7:4, 796-806

Aletaha, D., et al.; 2010 Rheumatoid Arthritis, Classification Criteria: an American College of Rheumatology/European. League against Rheumatism Collaborative Initiative. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010; 69, 1580–1588

Alamanos, Y., Voulgari, P. V., Drosos, A. A.; Incidence and prevalence of rheumatoid arthritis, based on the 1987 American College of Rheumatology criteria: a systematic review. *Semin. Arthritis. Rheum.* 2006; 36, 182-188.

Amoruso, A., et al.; Quantification of PPAR- γ protein in monocyte/macrophages from healthy smokers and non-smokers: a possible direct effect of nicotine. *Life Sci.* 2007, 81:11, 906-915.

Annese, V., et al.; PPAR γ in Inflammatory Bowel Disease. *PPAR Res.* 2012, 2012, 620839

Aprahamian, T., et al.; The peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist rosiglitazone ameliorates murine lupus by induction of adiponectin. *J. Immunol.* 2009, 182:1, 340-346

A randomized trial of hydroxychloroquine in early rheumatoid arthritis: the HERA Study. *Am. J. Med.* 1995, 98:2, 156-168

Arnett, F. C., et al.; The American Rheumatism Association 1987 Revised Criteria for the Classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988, 31, 315-324.

Awara, W. M., et al.; Insulinotropic and anti-inflammatory effects of rosiglitazone in experimental autoimmune diabetes. *Rev. Diabet. Stud.* 2005, 2:3, 146-156

Azevedo, A. B., Ferraz, M. B.; Ciconelli, R. M.; Indirect Costs of Rheumatoid Arthritis in Brazil. *Value Health.* 2008, 11:5, p. 869-877

Behrens, F., et al.; Imbalance in Distribution of Functional Autologous Regulatory T Cells in Rheumatoid Arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2007, 66:9, 1151-1156.

Bettelli, E., et al.; Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008. 453, 1051–1057.

Berger, J., Moller, D. E.; The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med.* 2002, 53, 409-435

Berger, J., Wagner, J. A.; Physiological and therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptors. *Diabetes Technol. Ther.* 2002, 4:2, 163-174

Boers, M., et al; World Health Organization and International League of Associations for Rheumatology core end points for symptom modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis clinical trials. *J. Rheumatol.* 1994; 41, 86-89.

Boissier, M. C., et al.; Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25, 1184-1190

Bordji, K., et al.; Evidence for the presence of peroxisome proliferatoractivated receptor (PPAR) and and retinoid Z receptor in cartilage: PPAR activation modulates the effects of interleukin-1 on rat chondrocytes. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 12243-122450

Bowen H, Kelly A, Lee T, Lavender P. Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells. *Clin Exp Allergy.* 2008 Sep;38(9):1422-31.

Brenner M, Linge CP, Li W, Gulko PS. Increased synovial expression of nuclear receptors correlates with protection in pristane-induced arthritis: a possible novel genetically regulated homeostatic mechanism. *Arthritis Rheum.* 2011 63:10, 2918-2929.

Bouaziz, J. D., et al.; Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4 β T cell activation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104:52, 20878-20883

Brasington Jr., R., et al.; Clinical features of rheumatoid arthritis. *Rheumatology.* v.1. Philadelphia: Elsevier; 829-837, 2011

Brenner, M., et al.; Increased synovial expression of nuclear receptors correlates with protection in pristane-induced arthritis: a possible novel genetically regulated homeostatic mechanism. *Arthritis Rheum.* 2011, 63:10, 2918-2929

Bongartz, T., et al.; Treatment of active psoriatic arthritis with the PPARgamma ligand pioglitazone: an open-label pilot study. *Rheumatology (Oxford).* 2005, 44:1, 126-129

- Bush, K. A., et al.; Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum.* 2002, 46, 802-805
- Campbell, L., et al.; Risk of adverse events including serious infections in rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab: a systematic literature review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Rheumatology (Oxford)*. 2011, 50:3, 552-562
- Cariou, B., Charbonnel, B., Staels, B.; Thiazolidinediones and PPAR- γ agonists: time for a reassessment. *Trends Endocrinol. Metab.* 2012, 23:5, 205-215.
- Cascao, R., et al.; Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2010, 12, R196
- Chabaud, M., et al.; The phenotype of circulating follicular-helper T cells in patients with rheumatoid arthritis defines CD200 as a potential therapeutic target. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 948218
- Chakera, A., et al.; The phenotype of circulating follicular-helper T cells in patients with rheumatoid arthritis defines CD200 as a potential therapeutic target. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:948218.
- Cho, M. L.; et al.; Effector function of type II collagen–stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: cross-talk between T cells and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, 2004, 50, 776-784.

Choy, E.; Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheum. (Oxf.)*. 2012, 51:Suppl 5, 3-11

Choi, J. M., Bothwell, A. L.; The nuclear receptor PPARs as important regulators of T-cell functions and autoimmune diseases. *Mol. Cells*. 2012, 33:3, 217-22.

Chabaud, M., et al.; 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*. 1998, 161:1, 409-414

Chabaud, M., et al.; Human interleukin-17: a T cell-derived pro inflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 1999, 42, 963-970

Chen, J., Liu, X.; The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications. *Cell. Immunol*. 2009, 254:2, 85-90

Chu, C. Q., et al.; IFN-gamma deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor Vbeta6 and Vbeta8 in arthritic joints, *Ann. Rheum. Dis*. 2003, 62, 983-990

Chung, S. W., Kang, B. Y., Kim, T. S.; Inhibition of interleukin-4 production in CD4+ T cells by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands: involvement of physical association between PPAR-gamma and the nuclear factor of activated T cells transcription factor. *Mol. Pharmacol*. 2003, 64:5, 1169-1179

- Clark, P., et al.; Hydroxychloroquine compared with placebo in rheumatoid arthritis. A randomized controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 1993, 119:11, 1067-1071
- Clark, R. B., et al.; The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J. Immunol.* 2000, 164:3, 1364-1371
- Cohen, S. B., et al.; Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. *Arthritis Rheum.* 2006, 54:9, 2793-2806
- Consoli, A., Devangelio, E.; Thiazolidinediones and inflammation. *Lupus.* 2005, 14:9, 794-797
- Cooper, S. M., Sriram, S., Ranges, G. E.; Suppression of murine collagen-induced arthritis with monoclonal anti-Ia antibodies and augmentation with IFN-gamma. *J. Immunol.* 1988, 141, 1958-1962
- Cunard, R., et al.; Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *J. Immunol.* 2002, 168, 2795-2802.
- Curtis, J. R., et al.; Risk of serious bacterial infections among rheumatoid arthritis patients exposed to tumor necrosis factor alpha antagonists. *Arthritis Rheum.* 2007, 54:6, 1125-1133
- Cuzzocrea, S., et al.; Reduction in the evolution of murine type II collagen-induced arthritis by treatment with rosiglitazone, a ligand of the peroxisome

proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis. Rheum.* 2003, 48:12, 3544-3556.

Da Mota, L. M., et al.; Brazilian Society of Rheumatology. 2011 Consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. *Rev. Bras. Reumatol.* 2011, 51:3, 199-219.

Da Mota, L. M. et al.; 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rev. Bras. Reumatol.* 2012, 52:2, 152-174

Da Rocha, L. F. Jr, et al.; Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *J. Rheumatol.* 2012, 39:7, 1320-1325

Dass, S., Weisman, M. H.; *Rheumatology*. 5th ed. v.1. Philadelphia: Elsevier; 2011, 563-595.

Davis, L. S., Hutcheson, J., Mohan. C.; The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus. *J. Interferon. Cytokine Res.* 2011, 31:10, 781-789

De Almeida, D. E., Ling, S., Pi, X.; Hartmann Hartmann-Scruggs AM, Pumpens P, Holoshitz J. Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope. *J. Immunol.* 2010, 185, 1927-1934

DeMaria, A. N.; Relative risk of cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis; *Amer. J. Card.*, 2002, 89:6; 33D-38D

Desvergne, B., Wahli, W.; Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999, 20:5, 649-688.

Dixon, W. G., et al.; Serious infection following anti-tumor necrosis factor alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis: lessons from interpreting data from observational studies. *Arthritis Rheum.* 2007, 56:9, 2896-2904.

Drexler, S. K., et al.; Cell signalling in macrophages, the principal innate immune effector cells of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2008, 10:5, 216

Doreau, A., et al.; Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat. Immunol.* 2009, 10, 778-785

Dörner, T., Jacobi, A. M., Lipsky, P. E.; B cells in autoimmunity. *Arthritis. Res. Ther.* 2009,11:5, 247

Duhen, T., et al.; Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 2009, 10, 857-863

Edwards, S. W., Hallett, M. B.; Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunol. Today.* 1997, 18, 320-324

Edwards, J. C., Cambridge, G.; Rheumatoid arthritis: the predictable effect of small immune complexes in which antibody is also antigen. *Br. J. Rheumatol.* 1998; 37, 126-130.

Emery, P., et al.; Efficacy and safety of different doses and retreatment of rituximab: a randomized, placebo-controlled trial in patients who are biological naive with active rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate (Study Evaluating Rituximab's Efficacy in MTX inadequater Esponders (SERENE)). *Ann. Rheum. Dis.*, 2010; 69:9, 1629-1635

Eyerich, S., et al.; IL-17 and IL-22: Siblings, not twins. *Trends Immunol.* 2010, 31, 354-361

Eyerich, S.; et al.; Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal. 2009, 119:12, 3573-3585

Fahmi, H., et al.; Peroxisome proliferator-activated receptor γ activators inhibit interleukin-1 induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2001, 44, 595-607

Fahmi, H., et al.; Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts likely by reducing the binding of the activator protein 1. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002, 10, 100-108.

Farmer, S. R.; Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell. Metab.* 2006 4:4, 263-273

Farnesi de Assunção, T. S. et al.; PPAR- γ agonists, mainly 15d-PGJ(2), reduce eosinophil recruitment following allergen challenge. *Cell Immunol.* 2012, 273:1, 23-29

Feldmann, M., Brennan, F. M., Maini, R. N.; Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann. Rev. Immunol.*1996, 14, 397-440

Felson, D. T., et al.; The American College of Rheumatology preliminary core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. The Committee on Outcome Measures in Rheumatoid Arthritis Clinical Trials. *Arthritis Rheum.*1993, 36, 729-740

Finnegan, A., Ashaye, S., Hamel, K. M.; B effector cells in rheumatoid arthritis and experimental arthritis. *Autoimmunity.* 2012, 45:5, 353-363

Firestein, G. S.; Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature.* 2003, 423:6937, 356-361

Furst, D. E., et al.; Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases 2011. *Ann. Rheum. Dis.* 2012; 71:Suppl 2, i2-45

Gaffen, S. L.; Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9:8, 556-567

Gierut, A., Perlman, H., Pope, R. M.; Innate immunity and rheumatoid arthritis. *Rheum. Dis. Clin. North. Am.* 2010, 36:2, 271-296

Geboes, L., et al.; Proinflammatory role of the Th17 cytokineinterleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum.* 2009; 60, 390-395

Genovese, M. C., et al.; LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: a phase I randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis Rheum.* 2010, 62, 929-939.

Getts, M. T., Miller, S. D.; 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: triggering of autoimmune diseases by infections. *Clin. Exp. Immunol.* 2010, 160, 15-21

Giaginis, C., Giagini, A., Theocharis, S.; Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) ligands as potential therapeutic agents to treat arthritis. *Pharmacol. Res.* 2009, 60:3, 160-169

Giaginis, C., Margeli, A., Theocharis, S.; Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands as investigational modulators of angiogenesis. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 2007, 16:10, 1561-1572

Giorgini, A. E., et al.; Troglitazone exhibits immunomodulatory activity on the cytokine production of activated human lymphocytes. *Horm. Metab. Res.* 1999, 31:1, 1-4

Goeldner, I. et al.; Association of anticyclic citrullinated peptide antibodies with extra-articular manifestations, gender, and tabagism in rheumatoid arthritis patients from southern Brazil. *Clin. Rheumatol.* 2011, 30:7, 975-980

Gonzalez, A., et al.; The widening mortality gap between rheumatoid arthritis patients and the general population. *Arthritis Rheum.* 2007, 56:11, 3583-3587

Hamel, K., et al.; Suppression of proteoglycan-induced arthritis by anti-CD20 B Cell depletion therapy is mediated by reduction in autoantibodies and CD4⁺ T cell reactivity. *J. Immunol.* 2008, 180:7, 4994-5003

Harris, S. G., Phipps, R. P.; The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 2001, 31, 1098-1105

Hasegawa, H., et al.; Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma activator, ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th1/Th2 balance. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005, 38:2, 257-265

Henke, B. R., et al.; Immunoregulatory mechanisms of macrophage PPAR- γ in mice with experimental inflammatory bowel disease. *Mucosal. Immunol.* 2011, 4:3, 304-313

Henke, B. R., et al.; N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *J. Med. Chem.* 1998, 41:25, 5020-5036

Hill, J. A., et al.; Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *Journal of Experimental Medicine* 2008, 205:4, 967-979

Hochberg, M. C.; Johnston, S. S.; John, A. K.; The incidence and prevalence of extra-articular and systemic manifestations in a cohort of newly-diagnosed patients with rheumatoid arthritis between 1999 and 2006. *Curr. Med. Res. Opin.*, 2008, 24, 469:480

Hontecillas, R., et al.; Immunoregulatory mechanisms of macrophage PPAR- γ in mice with experimental inflammatory bowel disease. *Mucosal. Immunol.* 2011, 4:3, 304-313

Housley, W. J., et al; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required for CD4+ T cell-mediated lymphopenia-associated autoimmunity. *J. Immunol.* 2011, 187:8, 4161-4169

Hoyer, B. F., et al.; Long-lived plasma cells and their contribution to autoimmunity. *Ann. NY Acad. Sci.* 2005, 1050, 124-133

Hsu, H. C., et al.; Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat. Immunol.* 2008, 9, 166-175

Hwang, E. S.; Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation. *Yonsei Med. J.* 2010, 51:4, 484-491

Humby, F., et al.; Ectopic lymphoid structures support ongoing production of class-switched autoantibodies in rheumatoid synovium. *PLoS Medicine* 2009, 6:1, e1

Ikeuchi, H., et al.; Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: Potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* 2005, 52, 1037-1046

Iwata, Y., et al.; Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 2011, 117:2, 530-541

Janeway, C. A. Jr.; How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.* 2001, 3:13, 1167-1171.

Ji, J. D., et al.; Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *J. Autoimmunity.* 2001, 17:3, 215-221.

Jiang, G. C., Ting, A. T., Seed, B.; PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998, 391:6662, 82-86.

Jiang, Y., et al.; Gene expression analysis of major lineage-defining factors in human bone marrow cells: effects of aging, gender and age-related disorders. *J. Orthop. Res.* 2008, 26, 910-917.

Jones, G., et al.; Comparison of tocilizumab monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: the AMBITION study. *Ann. Rheum. Dis.* 2010, 69:1, 88-96

Joosten, L. A., et al.; Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1 β and tumor necrosis factor α in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003, 48, 339-347

Kagami, S., et al.; Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 2010, 130:5, 1373-1383

Kaly, L., Rosner, I.; Tocilizumab - a novel therapy for non-organ-specific autoimmune diseases. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2012, 26:1, 157-165

Katchamart, W., et al.; Methotrexate monotherapy versus methotrexate combination therapy with non-biologic disease modifying anti-rheumatic drugs for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2010, 14:4

Kawahito, Y., et al.; 15-deoxy-delta (12,14)-PGJ2 induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J. Clin. Invest.* 2000, 106:2, 189-197.

Keystone, E., et al.; Rituximab inhibits structural joint damage in patients with rheumatoid arthritis with an inadequate response to tumour necrosis factor inhibitor therapies. *Ann. Rheum; Dis.* 2009, 68:2, 216-221.

Kim, K. W., et al.; Interleukin-22 promotes osteoclast genesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2012, 64, 1015-1023

Kinloch, A, et al.; Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2008, 58:8, 2287-2295

Kirkham, B. W.; et al.; Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum.* 2006, 54, 1122-1131

Klareskog, L., Padyukov, L., Alfredsson, L.; Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* 2007, 19, 49-54

Klareskog, L.; et al.; A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. *Arthritis Rheum.* 2006, 54, 38-46.

Klotz, L., et al.; The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J. Exp. Med.* 2009, 206:10, 2079-2089

Klotz, L., Knolle, P.; Nuclear receptors: TH17 cell control from within. *FEBS Lett.* 2011, 585:23, 3764-3769

Kochi, Y., et al.; Ethnogenetic heterogeneity of rheumatoid arthritis - Implications for pathogenesis. *Nat Rev. Rheumatol.* 2010, 6, 290-295

Koenders, M. I., et al.; Induction of cartilage damage by overexpression of T cellinterleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient ininterleukin-1. *Arthritis Rheum.* 2005, 52, 975-983

Kolls, J. K., Lindén, A.; Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004, 21:4, 467-476

Kolly, L., et al.; Expression and function of the NALP3 inflammasome in rheumatoid synovium. *Immunology.* 2010, 129:2, 178-185

Koufany, M., et al.; Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone resorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2008, 10:1, R6

Kramer, H. R., Giles, J. T.; Cardiovascular disease risk in rheumatoid arthritis: progress, debate, and opportunity. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 2011, 63:4, 484-499

Kuligowska, M., Odrowaz-Sypniewska, G.; Role of interleukin-17 in cartilage and bone destruction in rheumatoid arthritis. *Ortop. Traumatol. Rehabil.* 2004, 6, 235-241

Kuhn, K. A., et al.; Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 2006, 116:4, 961-973

Lavoie, T. N., et al.; Expression of interleukin-22 in Sjogren's syndrome: Significant correlation with disease parameters. *Scand. J. Immunol.* 2011, 74, 377-382

Lebre, M. C., et al.; Rheumatoid arthritis synovium contains two subsets of CD83-DC-LAMP- dendritic cells with distinct cytokine profiles. *Am. J. Pathol.* 2008, 172, 940-950

Lehmann, J. M., et al.; Na antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J. Biol. Chem.* 1995, 270:22, 12953-12956

Leipe, J., et al.; Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2011; 70, 1453-1457

Li, M., Pascual, G., Glass, C. K.; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20:13, 4699-4707

Liao, K. P., Karlson, E. W.; Classification and epidemiology of rheumatoid arthritis. In: Hochberg, M. C., et al.; *Rheumatology*. 5th ed. v. 1. Philadelphia: Elsevier; 2011, 823-827.

Louzada-Junior, P., et al.; Análise Descritiva das Características Demográficas e Clínicas de Pacientes com Artrite Reumatóide no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Reumatol.* 2007, 47:2, 84-90

Lubberts, E.; IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine*. 2008, 41, 84–91

Lundy, S. K., et al.; Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis. Res. Ther.* 2007, 9:1, 202

MacGregor, A. J., et al.; Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* 2000, 43, 30-37.

Machold, K. P., Neumann, K., Smolen, J. S.; Recombinant human interferon gamma in the treatment of rheumatoid arthritis: double blind placebo controlled study. *Ann. Rheum. Dis.* 1992, 51, 1039-1043

Manel, N., Unutmaz, D., Littman, D. R.; The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat. *Nat. Immunol.* 2008, 9:6, 641-649

Manoury-Schwartz, B., et al.; High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN-gamma receptors. *J. Immunol.* 1997, 158, 5501-5506

Marijnissen, R. J., et al.; Increased expression of interleukin-22 by synovial Th17 cells during late stages of murine experimental arthritis is controlled by interleukin-1 and enhances bone degradation. *Arthritis Rheum.* 2011, 63, 2939-2948

Mathian, A., et al.; Activated and resting regulatory T cell exhaustion concurs with high levels of interleukin-22 expression in systemic sclerosis lesions. *Ann. Rheum. Dis.* 2012, 71, 1227-1234

Mauritz, N.J. et al. Treatment with gamma-interferon triggers the onset of collagen arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 1988, 31, 1297-1304

McInnes, I. B., Schett, G.; Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, 7:6, 429-442.

McInnes, I. B., Schett, G.; The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365:23, 2205-2219.

Melis, L., et al.; Systemic levels of IL-23 are strongly associated with disease activity in rheumatoid arthritis but not spondyloarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2010, 69, 618-623

Metawi, S. A., et al.; Serum and synovial fluid levels of interleukin-17 in correlation with disease activity in patients with RA. Clin. Rheumatol. 2011, 30, 1201-1207

Miossec, P., Korn, T.; Kuchroo, V. K., Interleukin-17 and type 17 helper T cells. N. Engl. J. Med.; 2009; 361, 888-898

Mitra, A., Raychaudhuri, S. K., Raychaudhuri, S. P.; Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis. Arthritis Res. Ther. 2012;14:2, R65

Moura, R. A., et al. Cytokine pattern in very early rheumatoid arthritis favours B-cell activation and survival. Rheumatology (Oxford) 2011, 50:2, 278-282

Nakajima, K., et al.; Expression of BAFF and BAFF-R in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. Scand. J. Rheumatol. 2007, 36:5, 365-372

Nakae, S., et al.; /Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. J. Immunol. 2003, 171, 6173-6177

Nakahara, H., et al.; Anti-interleukin 6 receptor antibody therapy reduces vascular endothelial growth factor production in RA. Arthritis & Rheumatism. 2003, 48, 1521-1529

Nadkarni, S., Mauri, C., Ehrenstein, M. R.; Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. J. Exp. Med. 2007, 204:1, :33-39

Nakae, S., et al.; IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003, 100:10, 5986-5990

Nalbandian, A.; Crispin, J. C.; Tsokos, G. C.; Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clin. Exp. Immunol.* 2009, 157, 209-215.

Nam, J. L., et al.; Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010; 69:6, 976-986

Nogralles, K. E.; et al. IL-22-producing “T22” T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing T(H)17 T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2009, 123, 1244.e2-1252.e2

Okosieme, O. E., et al.; Peripheral cytokine expression in autoimmune thyroiditis: effects of in vitro modulation by rosiglitazone and dexamethasone. *Thyroid.* 2006, 16:10, 953-960

O'Neill, S. K., et al.; Antigen-specific B cells are required as APCs and autoantibody-producing cells for induction of severe autoimmune arthritis. *J. Immunol.* 2005, 174:6, 3781-3788

Osiri, M., et al.; Leflunomide for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2003, 1, CD002047.

Palma, A., et al.; Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in monocytes/macrophages from rheumatoid arthritis patients: relation to disease activity and therapy efficacy--a pilot study. *Rheum. (Oxf.)*. 2012, 51:11, 1942-1952

Panayi, G. S., et al.; Even though T-cell-directed trials have been of limited success, is there reason for optimism? *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2006; 2, 58-59

Pène, J.; et al.; Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol.* 2008 Jun 1;180(11):7423-30.

Pers, J. O., et al.; BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2005, 1050, 34-39

Pereira, I. A., et al.; Brazilian Society of Rheumatology. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus on the management of comorbidities in patients with rheumatoid arthritis. *Rev. Bras. Reumatol.* 2012, 52:4, 474-495

Plenge, R. M.; Rheumatoid arthritis genetics: 2009 update. *Curr. Rheumatol. Rep.* 2009, 11, 351-356

Popa, C., et al.; Repeated B lymphocyte depletion with rituximab in rheumatoid arthritis over 7 years. *Rheumatology (Oxford)*. 2007, 46:4, 626-630

Prevoo, M. L., et al.; Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis. Rheum.* 1995, 38:1, 44-48.

Rantapaa-Dahlqvist, S., et al: Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003, 48, 2741-2749

Rosengren, S., et al.; Expression and regulation of cryopyrin and related proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Ann. Rheum. Dis.* 2005, 64:5, 708-714

Ren, J., et al.; Natural killer-22 cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis are an innate source of interleukin 22 and tumor necrosis factor- α . *J. Rheumatol.* 2011, 38, 2112-2118

Ren, X., Hu, B., Colletti, L. M.; IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2010, 298, G74

Riel, P. V.; The work of the EULAR Standing Committee on International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Br. J. Rheumatol.* 1992, 31, 219-220

Ricote, M., et al.; The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nat.* 1998, 391:6662, 79-82

Rocha Jr, L. F., et al. L.F. da Rocha Jr, et al reply. *J Rheumatol.* 2012,39, 2221-2221.

- Rubbert-Roth, A.; Assessing the safety of biologic agents in patients with rheumatoid arthritis. *Rheum.* 2012, 51:Suppl 5, 38-47
- Samuels, J., et al.; Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* 2005, 201:10, 1659–1667
- Seyler, T. M., et al.; BLYS and APRIL in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 2005, 115:11, 3083-3092
- Shen, H., Goodall, J. C., Hill Gaston, J. S.; Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009, 60, 1647-1656
- Skurkovich, B., Skurkovich, S.; Inhibition of IFN-gamma as a method of treatment of various autoimmune diseases, including skin diseases. *Ernst. Schering. Res. Found. Workshop.* 2006, 56, 1-27
- Symmons, D. P., Chakravarty, K.; Can immunisation trigger rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.* 1993, 52:12, 843-844
- Symmons, D. P., et al.; Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum.* 1997, 40, 1955-1961
- Scherer, H. U., Burmester, G. R.; Adaptive immunity in rheumatic diseases: bystander or pathogenic player? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2011, 25:6, 785-800

Schulze-Koops, H., Kalden, J. R.; The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2001, 15, 677-691

Sabatini, M., et al.; Effects of agonists of peroxisome proliferator-activated receptor α on proteoglycan degradation and matrix metalloproteinase production in rat cartilage in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002, 10, 673-679.

Sarmiento-Monroy, J. C., et al.; Cardiovascular disease in rheumatoid arthritis: asystematic literature review in latin america. *Arthritis.* 2012, 2012, 371909

Sarzi-Puttini, P., et al.; Cardiac involvement in systemic rheumatic diseases: An update. *Autoimmun. Rev.* 2010, 9:12, 849-852

Scher, J. U.; et al.;Characteristic oral and intestinal microbiota in rheumatoid arthritis (RA): a trigger for autoimmunity? *Arthritis Rheum.* 2010, 62, Suppl1390

Schmidt, M. V., Brüne, B., von Knethen, A.; The nuclear hormone receptor PPAR γ as a therapeutic target in major diseases. *ScientificWorldJournal.* 2010, 10, 2181-2197

Schroder, A. E., et al.; Differentiation of B cells in the cells in the nonlymphoid tissue of the synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996, 93, 221-225

Schulze-Koops, H., Kalden, J. R.; The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2001, 15, 677-691

Scott, D. L.; Wolfe, F.; Huizinga, T. W.; Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2010; 376:9746, 1094-1108

Scherer, H. U.; Burmester, G. R.; Adaptive immunity in rheumatic diseases: by stander or pathogenic player? *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2011, 25:6, 785-800

Senna, E. R., et al.; Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J. Rheumatol.* 2004, 31:3, 594-597

Shahin, D., et al.; Shaheen D. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist (pioglitazone) and methotrexate on disease activity in rheumatoid arthritis (experimental and clinical study). *Clin. Med. Insights. Arthritis Musculoskelet Disord.* 2011, 4, 1-10

Shahrara, S., et al.; RM. TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2008, 10, R93

Shiojiri, T., et al.; PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2002, 448:2-3, 231-238

Simonin, M. A., et al.; PPAR-gamma ligands modulate effects of LPS in stimulated rat synovial fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2002, 282:1, C125-133

Singh, J. A., Beg, S., Lopez-Olivo, M. A.; Tocilizumab for rheumatoid arthritis: a Cochrane systematic review. *J. Rheumatol.* 2011a, 38:1, 10-20

Singh, J. A., et al.; Adverse effects of biologics: a network meta-analysis and Cochrane overview. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2011b, 2, CD008794

Singh, J. A., et al.; 2012 update of the 2008 American College of Rheumatology recommendations for the use of disease-modifying antirheumatic drugs and biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2012, 64:5, 625-639

Smolen, J. S., et al.; A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology*, 2003, 42, 244-257

Smolen, J. S.; et al.; EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, 69:6, 964-675

Smolenjs: The work of the EULAR Standing Committee on International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Br. J. Rheumatol.*1992, 31, 219-220

Straus, D. S., Glass, C. K.; Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2007, 28:12, 551-558

Subbaramaiah, K., et al.; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. Evidence for involvement of activator protein-1 and CREB-binding protein/p300. *J. Biol. Chem.*2001, 276:15, 12440-12448

Suarez-Almazor, M. E., et al.; Sulfasalazine for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst. Ver.* 2000, 2, CD000958

Szanto, A., Nagy, L.; The many faces of PPARgamma: anti-inflammatory by any means? *Immunobiology*. 2008, 213:9-10, 789-803

Szekanecz, Z.; et al.; Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2009; 1:44-51.

Széles, L., Torocsik, D., Nagy, L.; PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1771:8, 1014-1030

Tak, P. P., Kalden, J. R.; Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Res Ther*. 2011, 13, Suppl 1, Suppl5

Theocharis, S., et al.; Peroxisomeproliferator-activated receptor-gamma ligands as cell-cycle modulators. *CancerTreat. Rev*. 2004, 30:6, 545-554

Trifari, S.; et al.; Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol*. 2009, 10, 864-871

Tomita, T., Kakiuchi, Y., Tsao, P. S.; THR0921, a novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the severity of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther*. 2006, 8:1, R7

Turesson, C., et al.; Incidence and predictors of severe extra-articular disease manifestations in an early rheumatoid arthritis inception cohort. *Ann. Rheum. Dis*. 2007a, 66:11, 1543-1544

Turesson, C., et al.; Rheumatoid factor and antibodies to cyclic citrullinated peptides are associated with severe extra-articular manifestations in rheumatoid arthritis. *Annals. of the Rheumatic. Diseases* 2007b,;66:1, 59-64

Uysal, H., et al. Structure and pathogenicity of antibodies specific for citrullinated collagen type II in experimental arthritis. *Journal of Experimental Medicine* 2009, 206:2, 449-462

Van de Veerdonk, F. L., et al.; The anti-CD20 antibody rituximab reduces the Th17 cell response. *Arthritis Rheum.* 2011, 63, 1507-1516

Van der Heijde, D. M., et al.; Development of a disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists. *J. Rheumatol.* 1993, 20, 579-581

Van der Heijde, D. M., et al.; Sulphasalazine versus hydroxychloroquine in rheumatoid arthritis: 3-year follow-up. *Lancet.* 1990, 335:8688, 539-553

Van der Heijde, D. M., et al.; Judging disease activity in clinical practice in rheumatoid arthritis: first step in the development of a disease activity score. *Ann. Rheum. Dis.* 1990, 49:11, 916-920

Vermeire, K., et al.; Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice, *J. Immunol.* 1997, 158, 5507-5513

Veys, E. M., Menkes, C. J., Emery, P.; A randomized double-blind study comparing twenty-four-week treatment with recombinant interferon-gamma versus placebo in the treatment of rheumatoid arthritis, *Arthritis Rheum.* 1997, 40, 62-68

Volpe, E., et al.; A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat. Immunol.* 2008, 9:6, 650-657

Von-Knethen, A., et al.; PPARgamma1 attenuates cytosol to membrane translocation of PKCalpha to desensitize monocytes/macrophages. *J. Cell. Biol.* 2007, 26, 176:5, 681-694

Wegner, N., et al.; Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010, 62, 2662-2672

Wei, J., et al; Regulation of Matrix Remodeling by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ : A Novel Link Between Metabolism and Fibrogenesis. *Open Rheumatol. J.* 2012, 6, 103-115

Weyand, C. M., Goronzy, J. J.; Disease-associated human histocompatibility leukocyte antigen determinants in patients with seropositive rheumatoid arthritis: functional role in antigen-specific and allogeneic T cell recognition. *J. Clin. Invest.* 1990, 85, 1051-1057

Willson, T. M., Lambert, M. H., Kliewer, S. A.; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and metabolic disease. *Annu. Rev. Biochem.* 2001, 70, 341-367

Wilson, M. S., et al. Redundant and pathogenic roles for IL-22 in mycobacterial, protozoan, and helminth infections. *J. Immunol.* 2010, 184, 4378

Witte, E., et al.; Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. Cytokine Growth Factor Rev. 2010, 21:5, 365-379

Wolk, K., Sabat, R.; Interleukin-22: A novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. Cytokine Growth Factor Rev. 2006, 17, 367-380

Wolk, K., et al.; IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. J. Mol. Med. 2009, 87, 523

Woolf, A. D.; How to assess musculoskeletal conditions. History and physical examination. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 2003, 17:3, 381-402

Woolley, D. E.; The mast cell in inflammatory arthritis. N. Engl. J. Med. 2003, 348, 1709-1711

Xie, Q., Wang, S. C., Li, J.; Interleukin 22, a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. J. Rheumatol. 2012, 39:11, 2220, author reply 2221

Xu, J., Drew, P. D.; Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress the production of IL-12 family cytokines by activated glia. J Immunol. 2007, 178:3, 1904-1913

Yamada, H., et al.; Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. Ann. Rheum. Dis. 2008, 67, 1299-1304

Yue, C., et al.; The effects of adalimumab and methotrexate treatment on peripheral Th17 cells and IL-17/IL-6 secretion in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol. Int.* 2010, 30:12, 1553-1557

Yeo, L., et al. Cytokine Mrna profiling identifies B cells as a major source of RANKL in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2011, 70:11. 2022–2028.

Zenewicz, L. A., Flavell, R. A.; Recent advances in IL-22 biology. *Int. Immunol.* 2011, 23, 159-163

Zenewicz, L. A., et al.; Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007, 27, 647

Zhang, N., Pan, H. F., Ye, D. Q.; Th22 in inflammatory and autoimmune disease: Prospects for therapeutic intervention. *Mol. Cell. Biochem.* 2011a, 353, 41-46

Zhang, L., et al.; Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Immunol.* 2011b, 31:4, 606-614.

Zhang, L., et al.; Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PloS One.* 2012a, 7, e31000

Zhang, M. A., et al.; Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and γ regulate IFN γ and IL-17A production by human T cells in a sex-specific way. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012b, 109:24, 9505-9510

Zheng, Y., et al.; Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007, 445, 648

Ziolkowska, M., et al.; High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol.* 2000, 164:5, 2832-2

APÊNDICE

INICIAIS:_____ NO._____ DATA____/____/____

CHECK LIST

TEM CRITÉRIOS PARA ARTRITE REUMATÓIDE?

() **SIM** () **NÃO –SE NÃO EXCLUIR**

REALIZOU COLETA DE SANGUE?

() SIM () NÃO

REALIZOU COLETA DE LÍQUIDO SINOVIAL?

() SIM () NÃO

ASSINOU TCLE?

() SIM () NÃO

EXAMES LABORATORIAIS?

() SIM () NÃO

RADIOGRAFIA DE MÃOS ?

() SIM () NÃO

PENDÊNCIAS (COLOCAR DIA DO RETORNO):

PESQUISADOR:_____

DATA:

DADOS GERAIS

NOME DO PACIENTE: _____

INICIAIS/Nº DE IDENTIFICAÇÃO: _____ SEXO: M (1) F (2)

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____ IDADE: _____

REGISTRO: _____

TELEFONE: _____

ENDEREÇO: _____

CEP: _____

RAÇA: BRANCA (1) NEGRA (2) PARDA (3) INDÍGENA (4) AMARELA (5)

Presença de parentes com doenças auto-imunes reumatológicas
CONFIRMADAS?

Primeiro grau:

☐ Sim; Quantos? _____ Qual? _____ ☐ Não

Segundo grau:

☐ Sim; Quantos? _____ Qual? _____ ☐ Não

- Tem diagnóstico de doença auto-imune não reumatológica?

☐ Sim; Qual (is)? _____ ☐ Não

- Comorbidade? ☐ SIM _____ ☐ NÃO

- Hipertensão arterial Sistêmica? ☐ SIM; ☐ NÃO

Se a resposta for SIM:

Faz uso de medicação anti-hipertensiva? ☐ SIM ☐ NÃO

- História prévia de Doença cardiovascular?

☐ **Sim (1), Qual e idade?** _____

☐ **Não**

- História prévia de Doença cardiovascular na família?

Primeiro grau:

☐ Sim; Quantos? _____ Qual e idade? _____

☐ Não

Segundo grau:

- ☐ Sim; Quantos?_____ Qual e idade?_____
- ☐ Não

TABAGISMO?

- ☐ Sim; Cigarros/dia _____ ☐ Não
- ☐ Ex Cigarros/dia _____ Tempo:_____anos Inativo:_____ anos

- PRATICA ATIVIDADE FÍSICA ATUALMENTE?

- ☐ Sim; Com que frequência? _____/semana
Que tipo de atividade (s) física?_____
- ☐ Não

HISTÓRIA DA DOENÇA

Data de início dos sintomas: ____/____/____

Data do diagnóstico:____/____/____

Critérios Classificatórios do ACR 1987 (marcar quais os presentes)

1. Rigidez matinal
2. Artrite de 3 ou mais articulações
3. Artrite de mãos
4. Artrite simétrica
5. Nódulo reumatóide
6. Fator reumatóide positivo
7. Alterações Radiográficas

Já teve alguma manifestação extra-articular da AR ?

- ☐ Sim Qual (is)? ☐ Não

(1) Nódulos reumatóides

(2) Anemia

(3) Vasculites

(4) Olho; Qual?_____

(5) Cardíaco; Qual? _____

(6) Respiratório;Qual? _____

(7) Outras_____

DADOS CLÍNICOS ATUAIS

MEDICAMENTOS EM USO **ATUAL** OU **ANTERIOR** (Olhar também o prontuário)

OBS.: (Marcar com **X** na última coluna da direita aqueles utilizados no dia da coleta)

DROGA	DOSE ATUAL	TEMPO (MESES)	
1. Prednisona			
2. Metotrexato			
3. Difosfato de Cloroquina			
4. Hidroxicloroquina			
5. Leflunomida			
6. Infliximabe			
7. Adalimumabe			
8. Etanercepte			
9. Rituximabe			
10. Abatacepte			
11. Tocilizumabe			
12. Carbonato de cálcio			
13. Vitamina D			
14. Estatinas			
15. Anti-hipertensivos			
16. Outras			

QUEIXAS CLÍNICAS ATUAIS:

EXAME FÍSICO:

Exame físico geral: () Normal () Anormal

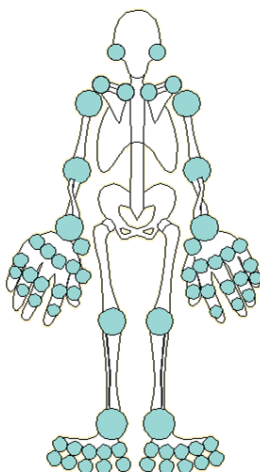
Peso:**Altura:****IMC:**

Circunferência cintura: _____ cm

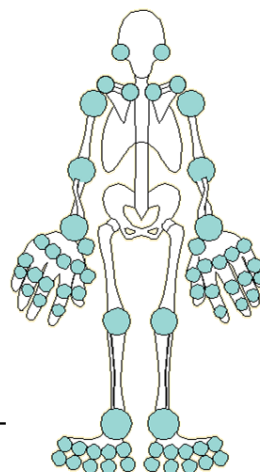
Circunferência do quadril: _____ cm

Relação Cintura/Quadril

PA: _____**Alterações:** _____

_____CONTAGEM
ARTICULAR

DOLOROSAS: _____



EDEMACIADAS: _____

VSH =

PCR =

EVAp = mm

DAS28 =

EVAm = mm

CDAI =

Classe Funcional	Definição
I	Capacidade completa para realizar atividades comuns da vida diária (cuidado pessoal, trabalho, lazer)
II	Capacidade para realizar cuidados pessoais e trabalho, mas limitação para atividades de lazer e esportes
III	Capacidade para realizar cuidados pessoais, mas limitação para trabalho e lazer
IV	Limitação para todas as atividades usuais, inclusive cuidados pessoais e alimentação

IDENTIFICAÇÃO: _____

Escala visual analógica

EVA de avaliação global do paciente:
Considerando todas as formas como a artrite afeta sua vida, indique como você está se sentindo neste momento:

Muito bem

Muito mal

Score:

EVA de dor do paciente:
Em média, quanta dor sentiu na última semana devido à sua doença?

Sem dor

A pior dor possível

Score:

EVA de fadiga do paciente:
Em média, quanto cansaço sentiu na última semana?

Nenhum cansaço

Cansaço extremo

Score:

EVA de avaliação da atividade da doença do médico:
Como avalia a atividade da artrite do seu paciente?

Sem atividade

Atividade intensa

Score:

CONDUTA:

EXAMES LABORATORIAIS

Hemograma:

Hb/Ht =

Leuc =

Linf =

Plaquetas =

LDL =

VLDL =

HDL =

Triglicerídeos =

Glicemia de Jejum =

Colesterol total =

Uréia/creatinina =	VSH (do dia do exame) =
Anti-CCP =	Fator Reumatóide =
TGO/TGP=	Albumina=

EXAMES RADIOLÓGICOS

Rx de mãos:

Normal: ☐ Sim ☐ Não

Erosões:

☐ Sim ☐ Não

HAQ (Health Assessment Questionary)

Atividade	Sem dificuldade 0	Pouca dificuldade 1	Muita dificuldade 2	Não consegue 3	Maior valor
1. Vestir-se, inclusive amarrar os cordões dos sapatos e abotoar as roupas					
2. Lavar sua cabeça e seus cabelos					
3. Levantar-se de maneira ereta de uma cadeira de encosto reto e sem braços					
4. Deitar-se e levantar-se da cama					
5. Cortar pedaços de carne					
6. Levar à boca um copo ou xícara cheio de café, leite ou água					
7. Abrir um saco (caixa) de leite comum					
8. Caminhar em lugares planos					
9. Subir 5 degraus					
10. Lavar e secar seu corpo após o banho					
11. Tomar banho de chuveiro					
12. Sentar-se e levantar-se de um vaso sanitário					
13. Levantar os braços e pegar um objeto de aproximadamente 2,5 quilos que está posicionado pouco acima da cabeça					
14. Curvar-se para pegar roupas no chão					
15. Segurar-se em pé no ônibus ou metrô					
16. Abrir potes ou vidros de conservas que tenham sido previamente abertos					
17. Abrir e fechar torneiras					
18. Fazer compras nas redondezas onde mora					
19. Entrar e sair de um ônibus					
20. Realizar tarefas tais como usar vassoura para varrer e ou rodo para a água					
SOMATÓRIO					
SOMATÓRIO DIVIDIDO POR 8 (RESULTADO DO HAQ)					

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 19 de dezembro de 2012.

Ofício nº 535/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Maira Galdino da Rocha Pitta**
Departamento de Bioquímica- UFPE
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.046593/2012-14

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Avaliação da atividade anti-inflamatória e antitumoral in vitro de novas Tiazocridinas"**.

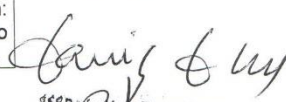
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Laboratório de Imunopatologia
Keizo Asami-LIKA-UFPE; Animais: Camundongos; Linhagem:
BALB/c; Sexo: Machos e fêmeas; Número de animais previsto
no protocolo: 100 camundongos; Peso: 20-25g; Idade: 35 dias.

Atenciosamente,


 Prof. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N.º 003/2011 - CEP/CCS

Recife, 14 de janeiro de 2011

Registro do SISNEP FR - 370323
CAAE - 0339.0.172.000-10
Registro CEP/CCS/UFPE N.º 339/10
Título: Avaliação do perfil imunológico de pacientes portadores de artrite reumatoide.
Pesquisador Responsável: Maira Galdino da Rocha Pitta

Senhor(a) Pesquisador(a):

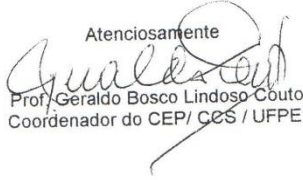
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 13 de janeiro de 2011.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

A
Prof.ª Maira Galdino da Rocha Pitta
Departamento de Bioquímica- CCB/UFPE

Av. Prof. Moraes Rego s/n, 1.º Andar, Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588; cepccs@ufpe.br

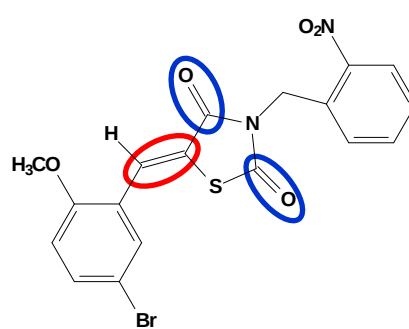
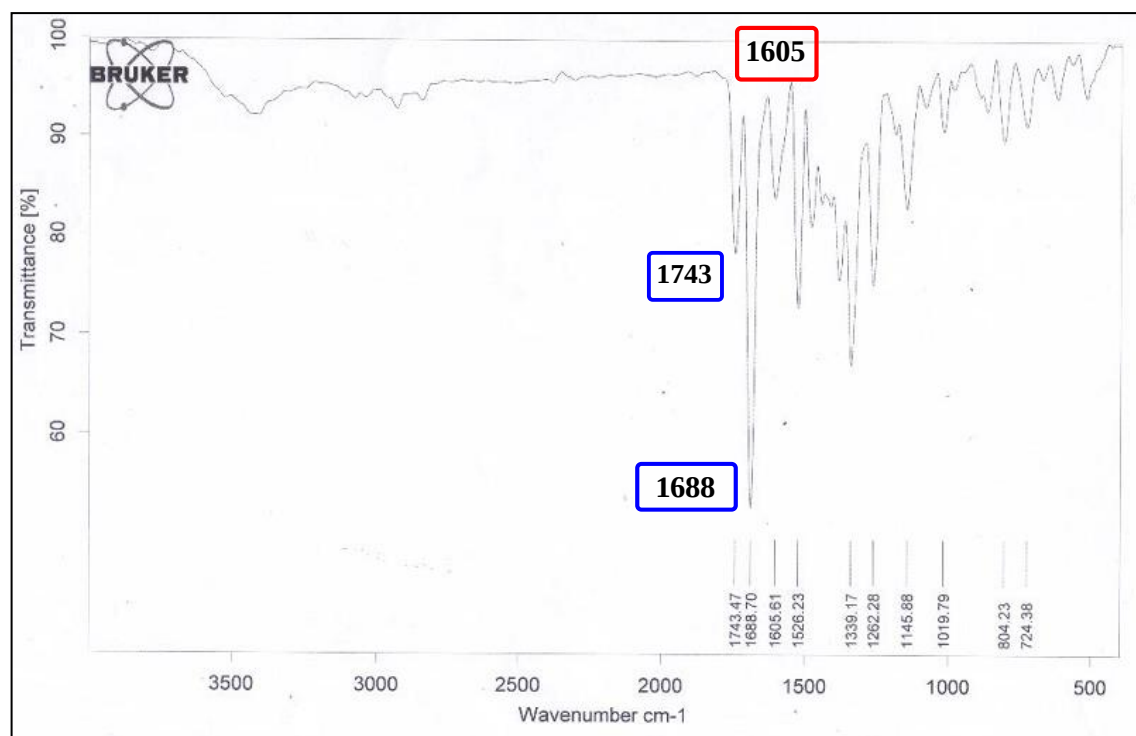


FIGURA 8: Espectro de infravermelho do derivado LPSF/TM17

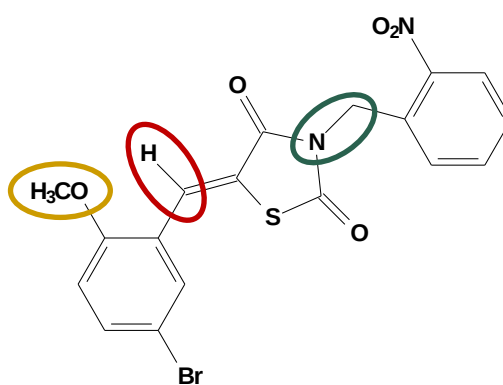
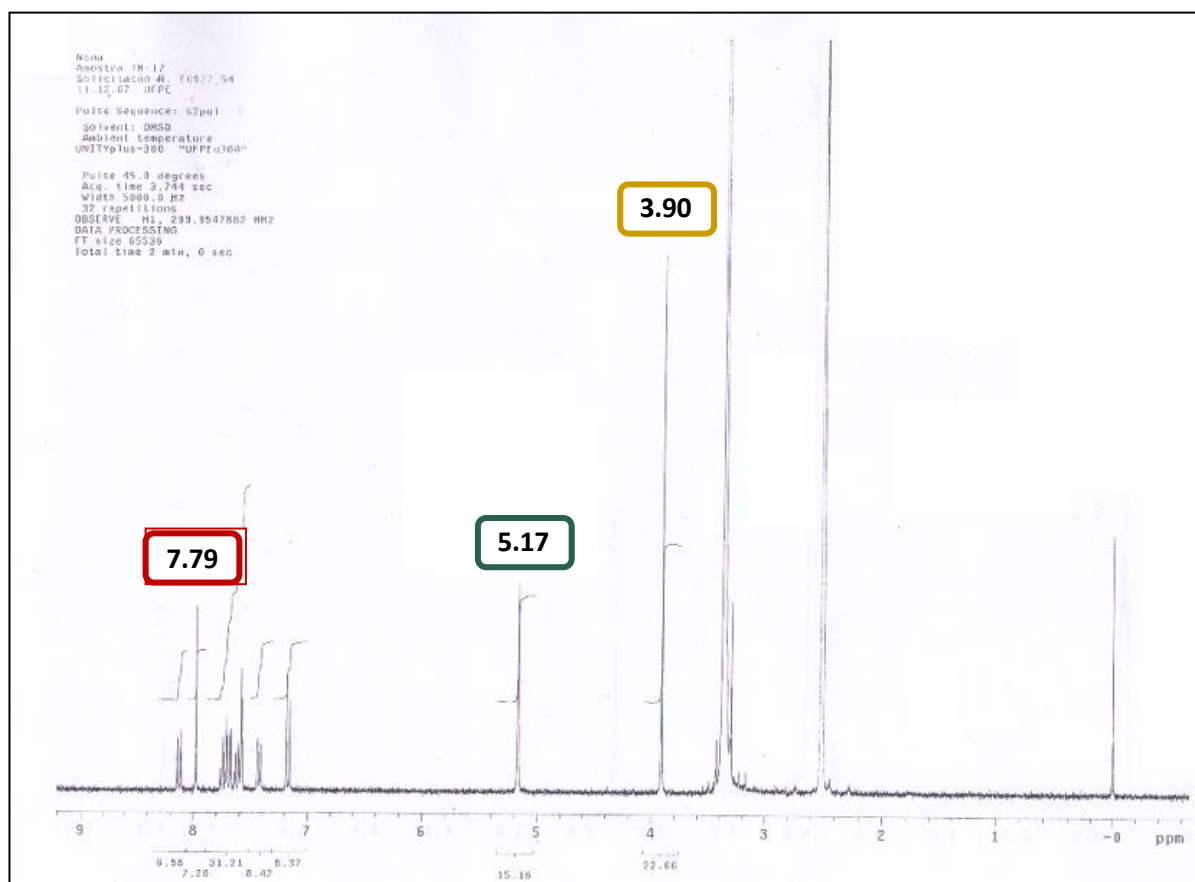


FIGURA 9: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio do derivado LPSF/TM17

Publicado no The Journal of Rheumatology Volume 39, no. 11 (2012), 2220-2221, doi:10.3899/jrheum.120757.

Interleukin 22, a Potential Therapeutic Target for Rheumatoid Arthritis

To the Editor:

A recent report by Da Rocha, *et al* indicated that levels of interleukin 22 (IL-22) were increased in patients with rheumatoid arthritis (RA) compared with controls; levels of IL-22 correlated with Disease Activity Score (DAS28) and Clinical Disease Activity Index measures, rheumatoid factor positivity was correlated with higher levels of IL-22 in patients with RA, and the presence of bone erosions was associated with high IL-22 levels¹. These findings suggest that IL-22 may be a good biomarker for assessment of activity in RA, and IL-22 seems to be a potential therapeutic target for RA.

Other studies have indicated the similar relationship between IL-22 and RA, where serum IL-22 levels were found to be increased in patients with RA compared with controls^{2,3,4,5}, and high IL-22 levels correlated with bone erosions⁴. The IL-22 concentration in synovial fluid was higher in patients with RA compared with controls^{2,3}. In patients with RA, Th17 cells were recognized to produce higher IL-22. Th22 cells also produced IL-22 and the expression of Th22 cells. IL-22 were significantly elevated in RA patients^{5,6}. More importantly, Th17/22 cells showed positive correlations with IL-22, C-reactive protein, and DAS28 data⁶. In addition, natural killer (NK)-22 cells *in vitro* can secrete higher levels of IL-22 and tumor necrosis factor- α (TNF- α), and NK-22 supernatant can induce the proliferation of RA fibroblast-like synoviocytes (FLS); however, addition of IL-22 antibody plus TNF- α antibody inhibited the proliferation of FLS induced by the NK-22 supernatant⁷. *In vitro*, human recombinant IL-22 (rhIL-22) significantly increased proliferation of RA synovial fluid and FLS and production of monocyte chemoattractant protein-1^{13,7,8}, but an inhibitory effect of anti-IL-22R antibody on proliferation of FLS induced by rhIL-22 was found in RA³.

Moreover, an experimental arthritis model (IL-1Ra^{-/-}) displayed a progressive erosive arthritis characterized by upregulation of IL-22 in severely inflamed synovia; and anti-IL-22 treatment of IL-1Ra^{-/-} mice significantly

reduced the inflammation and bone erosions⁹. Similarly, in studies of collagen-induced arthritis (CIA), serum IL-22 levels were increased, and the specific IL-22RI was expressed in lymphoid tissue, including splenocytes. IL-22^{-/-} mice were less susceptible to CIA than wild-type mice, as shown by their reduced incidence of arthritis and decreased pannus formation. Remarkably, the less severe form of arthritis in IL-22^{-/-} mice was associated with increased production of collagen II-specific and total IgG antibodies. *In vitro*, IL-22 was found to promote osteoclastogenesis, a process that may contribute to its proinflammatory activity in CIA¹⁰. On the other hand, 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25[OH]2D3) prevented corticosteroid-induced osteoporosis in patients with early RA, where 1,25[OH]2D3 directly modulated human Th17 polarization, accompanied by suppression of IL-17, TNF- α , and IL-22 production¹¹. In patients with RA, rituximab reduced expression of IL-22 and Th17-positive cells in synovial tissue, and this correlated with better clinical outcomes. *In vitro*, rituximab strongly reduced IL-17 and IL-22 production induced by *Candida albicans*¹².

These findings suggest therapeutic potential for patients with RA, and suggest a role for IL-22 in development of RA. Further studies are needed to clarify the role of IL-22 in RA. Therapeutic agents targeting IL-22 might result in innovative new therapies for RA.

QIANG XIE, MD, School of Pharmacy, Anhui Medical University, PET/CT Center, Anhui Provincial Hospital; SHI-CUN WANG, MM, PET/CT Center, Anhui Provincial Hospital; JUN LI, MD, School of Pharmacy, Anhui Medical University, 81 Meishan Road, Hefei, Anhui, 230032, PR China. Address correspondence to Dr. Li;
E-mail: lijun@ahmu.edu.cn

REFERENCES

1. Da Rocha LF Jr, Duarte AL, Dantas AT, Mariz HA, Pitta ID, Galdino SL, et al. Increased serum interleukin 22 in patients with rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. *J Rheumatol* 2012;39:1320-5.

2. Kim KW, Kim HR, Park JY, Park JS, Oh HJ, Woo YJ, et al. Interleukin-22 promotes osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis through induction of RANKL in human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2012;64:1015-23.
3. Mitra A, Raychaudhuri SK, Raychaudhuri SP. Functional role of IL-22 in psoriatic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R65.
4. Leipe J, Schramm MA, Grunke M, Baeuerle M, Dechant C, Nigg AP, et al. Interleukin 22 serum levels are associated with radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1453-7.
5. Zhang L, Li JM, Liu XM, Ma DX, Hu NW, Li YG, et al. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 2011;31:606-14.
6. Zhang L, Li YG, Li YH, Qi L, Liu XG, Yuan CZ, et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2012;7:e31000.
7. Ren J, Feng Z, Lv Z, Chen X, Li J. Natural killer-22 cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis are an innate source of interleukin 22 and tumor necrosis factor- α . *J Rheumatol* 2011;38:2112-8.
8. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: Potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum* 2005;52:1037-46.
9. Marijnissen RJ, Koenders MI, Smeets RL, Stappers MH, Nickerson-Nutter C, Joosten LA, et al. Increased expression of interleukin-22 by synovial Th17 cells during late stages of murine experimental arthritis is controlled by interleukin-1 and enhances bone degradation. *Arthritis Rheum* 2011;63:2939-48.

10. Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renauld JC, et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 Mice. *Arthritis Rheum* 2009;60:390-5.
11. Colin EM, Asmawidjaja PS, van Hamburg IP, Mus AM, van Driel M, Hazes JM, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:132-42.
12. van de Veerdonk FL, Lauwerys B, Marijnissen RJ, Timmermans K, Di Padova F, Koenders MI, et al. The anti-CD20 antibody rituximab reduces the Th17 cell response. *Arthritis Rheum* 2011;63:1507-16. *J Rheumatol* 2012;39:11; doi:10.3899/jrheum.120757