

Quantificação e caracterização fenotípica e funcional das células Th(c)17 e Th(c)1 no sangue periférico de doentes com Artrite Reumatóide.

Marlene Areias¹, Cátia Duarte³, Ana Henriques², Artur Paiva², José António Pereira da Silva³.

Afiliação

¹ Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Portugal.

² Centro de Histocompatibilidade do Centro, Portugal.

³ Serviço de Reumatologia dos Hospitais Universitários de Coimbra, Portugal.

Endereço

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Rua Larga

3004-504 Coimbra

Telf: +351-239 857700/ Fax: +351-239 823236

marleneareias.ter@gmail.com

Resumo

A artrite reumatóide é uma doença sistémica, auto-imune, que pode envolver vários órgãos e sistemas. Pensa-se que nesta, bem como em outras doenças auto-imunes, este processo é mediado por células Th1. Contudo, nos últimos anos, têm sido descrito em vários estudos, uma nova subpopulação de células efectoras, as Th(c)17, produtoras de IL-17, mas o seu papel na fisiopatologia das doenças reumáticas ainda não foi esclarecido.

Neste estudo, analisou-se a frequência e a actividade funcional de células Th(c)1 e Th(c)17 produtoras de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, TNF- α e IFN- γ) e ainda a quantidade de cada citocina a nível celular através da citometria de fluxo, após estimulação *in vitro*, em doentes com artrite reumatóide inactiva ou de baixa actividade (DAS<3,2; n=19) e com actividade moderada a elevada (DAS>3,2; n=13) da doença, comparando com resultados obtidos num grupo controlo (N; n=13).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram uma tendência para um aumento da frequência das células Tc17 nos doentes com artrite reumatóide, particularmente naqueles com actividade da doença elevada, assim como uma maior capacidade das células Th17 para produzirem IL-17. No entanto, nos doentes com artrite reumatóide, observou-se uma diminuição significativa da produção de TNF- α nas células Th(c)17, uma vez mais, preferencialmente no grupo com alta actividade. Também, se observou uma diminuição da produção de quase todas as citocinas pró-inflamatórias em estudo, com excepção da IL-2, pelas Th(c)1. A IL-2 encontrou-se aumentada nos doentes com baixa actividade da doença.

Analisando a proporção de células produtoras de citocinas pró-inflamatórias, verificou-se uma polarização no sentido Tc1 nas células T CD8, enquanto nas células T

CD4 não se observaram diferenças significativas, a não ser uma diminuição destas células produtoras de IFN- γ .

Os resultados obtidos demonstram que a plasticidade funcional das células Th(c)17 e Th(c)1 parece contribuir para a produção local de citocinas reforçando a sua participação activa e conseqüentemente seu papel relevante, nomeadamente das células Tc1 e Th(c)17, na fisiopatologia da artrite reumatóide.

Palavras-chave: Th(c)17, Th(c)1, citocinas pró-inflamatórias e Artrite reumatóide.

Abstract

Rheumatoid Arthritis is a systemic and autoimmune disease, that can involve all organism. Were believed, like other autoimmune diseases, to be mainly driven by Th1 cells. However, in recent years several studies have been described a new subset of effector T cells with the ability to produce IL-17, the Th(c)17 cells, but the involvement of this cells on the pathophysiology of rheumatic diseases it's not defined.

In this study, we analysed the number and functional activity of Th(c)17 and Th(c)1 according to the frequency of pro-inflammatory cytokines (IL-2, TNF- α and IFN- γ) producers cells, as well as their cytokine amount by flow cytometry single cell analysis, after stimulation *in vitro*, in rheumatoid arthritis patients with a inactive or low disease activity (DAS<3,2; n=19) or with moderate to high disease activity (DAS>3,2; n=13) compared to healthy controls (N, n=13).

Results obtained demonstrate a trend to an increase of frequency of Tc17 cell in rheumatoid arthritis patients, particularly in those it high disease activity, as well as one bigger capacity of these cells to produce IL-17. However, in rheumatoid arthritis

patients, a significant reduction of the production of TNF- α in Th(c)17 was observed, particularly in patients it high disease activity.

A similar decrease was observed in Th(c)1, for almost all studied pro-inflammatory cytokines, with the exception of IL-2, which was increased in Tc1 from low disease activity patients. Analysing the proportion of pro-inflammatory cytokines producer's cells, a polarization to Tc1 phenotype seemed to occur in CD8 T cells, while CD4 T cells did not significantly differ with this respect and appears even to be decreased in IFN-g producer's cells.

Results demonstrate that functional plasticity of Th(c)17 and Th(c)1 cells seem to contribute to the local cytokine production, strengthening its active participation and pointing an important role, mainly of Tc1 and Th(c)17 cells, in the pathophysiology of rheumatoid arthritis.

Key-words: Th(c)17, Th(c)1, pro-inflammatory cytokines, Rheumatoid arthritis.

Introdução

A Artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune e crónica caracterizada pela inflamação da membrana sinovial e consequente destruição óssea e cartilaginosa da articulação. Afecta aproximadamente 1% da população mundial (7).

Apesar de a sua etiopatogenia não ser completamente compreendida, factores genéticos, ambientais e desregulação imune têm sido considerados (10).

Esta desregulação imune, mediada pela produção contínua de citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases da matriz (MMP's) (14) e também pela inflamação sistémica (20), estaria associada às células Th1 (14), melhor dizendo a um desequilíbrio Th1/Th2 (2,20,23). Pois, as células Th1 produzem citocinas pró inflamatórias, como a IL-2 e o IFN- γ , que se encontram envolvidas nas reacções inflamatórias mediadas por células (1) e ainda possuem a habilidade de induzirem a osteoclastogénese, contudo este mecanismo permanece por esclarecer (19). Recentemente, surgiram evidências contraditórias como o facto de o IFN- γ muito raramente ser detectável no líquido sinovial de doentes com AR (2,14,23), a ausência de eficácia da terapêutica com anticorpos monoclonais anti – IFN- γ (2), agravando ainda mais a inflamação, (14) e ainda o papel inibitório desta citocina na reabsorção óssea (19,23,26). Alguns estudos apontam para uma diminuição das células Th1 em doenças autoimunes, resultando num aumento das funções desempenhadas pelas células Th2, uma vez que estes subtipos de células CD4 se auto-regulam e influenciam reciprocamente a sua homeostase

Assim, vários estudos foram desenvolvidos ao longo dos anos, para esclarecer o papel das células Th1 na AR, levando à descoberta duma nova subpopulação de células Th, a Th17 (5,25), que veio demonstrar um potencial para clarificar esta controvérsia, sendo que foi muitas vezes designada, em vários modelos auto-imunes e também em condições inflamatórias humanas, como as principais células promotoras da inflamação

(4,11,13). Esta nova subpopulação de células T CD4+, Th17, é caracterizada pela produção de citocinas, principalmente IL-17 (A) mas também IL-17 F, IL-21, IL-22 e IL-6 (4,25,26).

Contudo, ainda não existem provas concretas quanto ao seu papel, mas existem evidências que sugerem a sua importância na AR, nomeadamente a acção da IL-17 em estimular a osteoclastogénese (3,11,23) através da estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e proteases pelos condrócitos e osteoblastos (11,16,23). Também se demonstrou que as células T e as citocinas IL-17 e TNF- α têm um papel sinérgico entre si nas situações inflamatórias (16). Activam fibroblastos sinoviais, condrócitos e osteoclastos, com a subsequente expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8, mediadores da inflamação articular) (3,14,19,25), bem como estão ainda envolvidas num feedback, promovendo a perpetuação da inflamação (3), que pode ser um mecanismo importante para o desenvolvimento da artrite persistente (14).

Foram descritas, recentemente, células T CD8+ produtoras de IL-17, as Tc17, contudo os estudos sobre estas células são ainda muito escassos (7,9,18). Mas, é possível que as células Tc17 desempenhem também um papel significativo na fisiopatologia das doenças inflamatórias, nomeadamente na AR, contudo a função desta subpopulação permanece por esclarecer.

Neste contexto, foi objectivo deste estudo, avaliar a plasticidade funcional e a frequência de diferentes subpopulações de células T, Th(c)17 e Th(c)1, através da produção de citocinas pró-inflamatórias, nos diferentes estadios da doença de forma a entender a biologia das células T na AR. O que também será importante para o desenvolvimento de diferentes terapêuticas que poderão mudar o prognóstico desta doença.

Materiais e métodos

Doentes e Controlo

Foram incluídos 32 doentes com o diagnóstico de AR, de acordo com os critérios do Colégio Americano de Reumatologia 1987 (6), seguidos no Serviço de Reumatologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra e que aceitaram participar neste estudo.

Os doentes foram classificados de acordo com a actividade clínica da doença (classificação EULAR), em actividade baixa ou inactiva ($DAS < 3,2$) (19 doentes) ou actividade moderada a elevada ($DAS > 3,2$) (13 doentes).

Os doentes com infecções activas, amiloidose secundária, neoplasia, sob tratamento biológico ou que recusaram participar foram excluídos.

Um terceiro grupo (controlo), incluído no estudo, constituído por 13 indivíduos voluntários e aparentemente saudáveis, segundo os próprios e um exame médico básico.

O estudo respeitou os princípios da declaração de Helsínquia e foi aprovado pelo código ético local; todos os intervenientes assinaram o consentimento informado.

No momento da colheita de sangue, os doentes foram avaliados por um reumatologista com experiência na avaliação de doentes com AR. Foram colhidos dados quanto ao número de articulações tumefactas (AT) e dolorosas (AD), Velocidade de Sedimentação (VS), Proteína C Reactiva (PCR), DAS28 e terapêutica actual. O factor reumatóide (FR), o anticorpo anti-peptídeo citrulinado (Anti-CCP), as erosões radiográficas e a duração da doença foram também determinados.

Recolheram-se 20 ml de sangue periférico de cada participante no dia da inclusão no estudo e avaliação clínica. As amostras foram enviadas para o laboratório, devidamente identificadas com um número de código e as análises foram efectuadas sem conhecimento do estado da doença do participante.

Imunofenotipagem de células Th(c)17 e Th(c)1 no sangue periférico, após a estimulação *in vitro* com PMA/Ionomicina, na presença de Brefeldina A

500 µl de cada amostra de sangue periférico foi diluída L/L (vol/vol), em meio RPMI-1640 (Gibco; Painactive SLEy, Escócia, Reino Unido), suplementada com 2 mM L-glutamina. 50 ng/mL de forbol 12-miristate 13-acetato (PMA; Sigma, Saint Louis, MO, EUA), 1 µg/mL de Ionomicina (Boehringer Mannheim, Alemanha) e 10 µg/mL de Brefeldina A (Golgi plug- Sigma, Saint Louis, MO, EUA) são adicionados e a amostra é incubada por 4 h a 37°C num incubador humidificado com uma concentração de CO₂ de 5%.

Cada cultura da amostra de sangue periférico é aliquoteada e colocada em três tubos diferentes (200 µL/tubo) seguindo-se uma permeabilização intracitoplasmática e mantém-se o protocolo de modo a analisar separadamente a expressão de IL-2, TNF-α e IFN-γ nas subpopulações de células T positivas e negativas para IL-17, dentro do conjunto de células T CD4 e T CD8. Todas as células aliquoteadas foram marcadas com IL-17 PE (clone 41802; Sistemas R&D, Europa) e separadamente com IL-2 (clone MQ1-17H12; BD Pharmingen, San Diego, C.A., EUA), TNF-α (clone MAb11; BD Pharmingen, San Diego, C.A., EUA) e IFN-γ (clone 4S.B3; BD Pharmingen, San Diego, C.A., EUA), de acordo com as instruções dos fabricantes, para fixação e permeabilização. Estes anticorpos monoclonais (mAb), para a quantificação intracelular de citocinas, foram adicionados a cada tubo depois da marcação directa de superfície para a identificação das subpopulações de linfócitos T – anti-CD3-PerCP (clone SK7; BD, São José, C.A., EUA) e anti-CD8 APC (clone SK1; BD, São José, C.A., EUA). Por último, as células foram ressuspensas em 0.5 ml de PBS até à sua análise no citómetro de fluxo. Nos linfócitos CD3⁺ procedeu-se à identificação das subpopulações de

linfócitos T CD8+ com base na expressão deste marcador e por exclusão dos linfócitos T CD4+. Os linfócitos T $\gamma\delta$ foram excluídos do estudo com base na sua alta reactividade para CD3 e características de dispersão de luz (tamanho e complexidade).

Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo

A aquisição de dados foi realizada em dois passos consecutivos no citómetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, Califórnia, EUA) equipado com um raio iónico de árgon e um laser diodo vermelho, usando o software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, EUA). No primeiro passo, foram adquiridos 2×10^4 eventos, correspondentes a todas as células nucleadas da amostra, que foram registados e armazenados. De seguida, para melhorar a sensibilidade da análise procedeu-se a um *gate* electrónico correspondente às células CD3 positivas, num mínimo de 2×10^5 e produção de citocinas foram avaliadas dentro de cada subpopulação de células T. Os resultados foram analisados pelo software Infinicyt 1.4 (Cytognos, Salamanca, Espanha) e ilustram a percentagem de células positivas dentro de cada subpopulação e/ou a sua média da intensidade fluorescente (MFI). Os linfócitos T são identificados de acordo com a sua positividade para o CD3 e características de dispersão da luz.

Análise estatística

Os resultados foram expressos pela média \pm desvio-padrão para variáveis contínuas e sob a forma de proporções para variáveis categóricas. A normalidade foi avaliada pelo teste de Klomogorov-Smirnov. A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o teste Mann-Whitney ou de Qui-quadrado (χ^2), conforme adequado.

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando-se o software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA) para o windows. Consideraram-se todas as diferenças significativamente estatísticas aquelas com um valor de $P < 0,05$.

Resultados

Estudo da população: doentes com baixa e alta actividade da AR.

Foram avaliadas as amostras sanguíneas de 32 indivíduos doentes, 13 com alta actividade da doença (90.0% sexo feminino, 32±11 anos) e 19 com baixa actividade da doença (94.4% sexo feminino, 32±11 anos). O grupo controlo formado por 13 indivíduos correspondendo no sexo e idade, sem processo inflamatório (84.6% sexo feminino, 30±10 anos) foram também avaliados. Não foram observadas diferenças quanto ao sexo e idade entre os 3 grupos.

Como esperado, de acordo com a classificação em cada grupo, os doentes com alta actividade da doença apresentam um aumento significativo do número de AD e AT, tal como a VS. Ambos os grupos de doentes com AR apresentam uma relação positiva e semelhante de FR (50.0 vs 66.7%, $P=0.367$), Anticorpo anti-CCP (50.0 vs 81.8%, $P=0.280$) e erosões ósseas (92.3 vs 88.9%, $P= 0.784$). Aproximadamente 35% dos doentes estão a tomar corticosteróides ($P= n.s$) e nenhuma diferença é observada entre os grupos medicados com metotrexato .

Frequência e caracterização funcional das células Th1 e Th17 no sangue periférico.

Não observámos diferenças estatisticamente significativas na frequência das células Th17 entre os três grupos, havendo apenas diferença muito ligeira entre o grupo de baixa actividade e alta actividade (Tabela I)

Numa tentativa de melhor compreender a actividade funcional das células Th17 e Th1, nós estudámos a frequência destas células produtoras de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IFN- γ) e a quantidade de cada citocina a nível celular (média intensidade de fluorescência, MFI).

A frequência de células Th1 produtoras de TNF- α e IL-2 foi semelhante nos 3 grupos. Contudo, as células T produtoras de IFN- γ surgiram significativamente diminuídas em ambos os grupos de doentes com AR, comparando com os controlos (Fig.1A).

A frequência de células Th17 produtoras de TNF- α e IFN- γ foi similar entre os três grupos, havendo no geral uma diminuição das células Th17 produtoras de IFN- γ . As produtoras de IL-2 encontram-se significativamente diminuídas nos doentes com baixa actividade, comparando com o grupo controlo ($P < 0,05$) (Fig.1A).

Observando os níveis de citocinas, detectou-se um aumento significativo de IL-17 pelas células Th17 nos doentes com alta e baixa actividade da AR comparando com os controlos ($P = 0,004$ e $P = 0,02$) (Tabela I).

Em relação ao TNF- α e IFN- γ , estes encontraram-se significativamente diminuídos nos doentes com AR, comparando com o grupo controlo, nas células Th1 (Fig.1B). Também, nas células Th17 se observou uma diminuição significativa dos níveis de TNF- α nos doentes comparativamente com os controlos, assim como uma diminuição, igualmente significativa, no grupo de alta actividade comparando com os doentes de baixa actividade (Fig.1B). Em termos de actividade de doença, não se observaram mais diferenças significativas quando comparados os dois grupos de doentes.

Frequência e caracterização funcional das células Tc1 e Tc17 no sangue periférico.

Um aumento da frequência de células Tc17 nos doentes com AR, particularmente nos doentes com alta actividade foi observado comparativamente ao grupo controlo, embora não apresentando significado estatístico (Tabela I).

Quanto à frequência de células Tc1 produtoras de citocinas pró-inflamatórias, encontrou-se um aumento destas células produtoras de IL-2 no grupo de baixa actividade comparando com o de alta actividade e com o grupo controlo. Também se apresentaram aumentadas, no grupo de baixa actividade, as células produtoras de TNF- α relativamente ao controlo (Fig.2A). Quanto à frequência das Tc17 não se observaram diferenças significativas, sendo a frequência semelhante entre os 3 grupos (Fig.2A).

Em relação aos níveis de citocinas produzidos pelas células Tc1 observou-se um aumento significativo de IL-2, mas diminuição de IFN- γ nos doentes com baixa actividade quando comparando com o grupo controlo. O TNF- α encontrou-se significativamente diminuído nas células Tc17 dos doentes com alta actividade comparando com os controlos (Fig.2B).

Tabela I. Análise comparativa da proporção de células Th17 e Tc17 nos doentes e nos controlos, e a quantidade de IL-17 a nível celular (MFI)

	DAS < 3,2	DAS > 3,2	N
Th17			
%CD4+	0,87 ± 0,37	0,94 ± 0,22	0,95 ± 0,23
MFI	90,58 ± 22,73 ^b	106,35 ± 26,54 ^a	67,2 ± 27,39
Tc17			
%CD8+	0,43 ± 0,26	0,48 ± 0,12	0,36 ± 0,13
MFI	78,11 ± 26,55	60,67 ± 13,7	64,13 ± 27,13

Os resultados são expressos pela média ± desvio-padrão; %CD4+ = percentagem de células positivas de todas as células T CD4+ periféricas; %CD8+ = percentagem de células positivas de todas as células T CD8+ periféricas; MFI = média da intensidade fluorescente das células positivas; DAS < 3,2 = doentes com baixa actividade da doença; DAS > 3,2 = doentes com alta actividade da doença; N = indivíduos saudáveis.

São consideradas diferenças estatisticamente significativas quando o $p < 0.05$ (Teste de Mann-Whitney U): ^a DAS > 3,2 versus N; ^b DAS < 3,2 versus N.

Figure 1. Frequência de células T CD4+ produtoras de IL-2-, TNF- α e IFN- γ (Th1 e Th17) (A) e a quantidade de cada citocina por célula (MFI) (B), após estimulação com PMA/ionomicina.

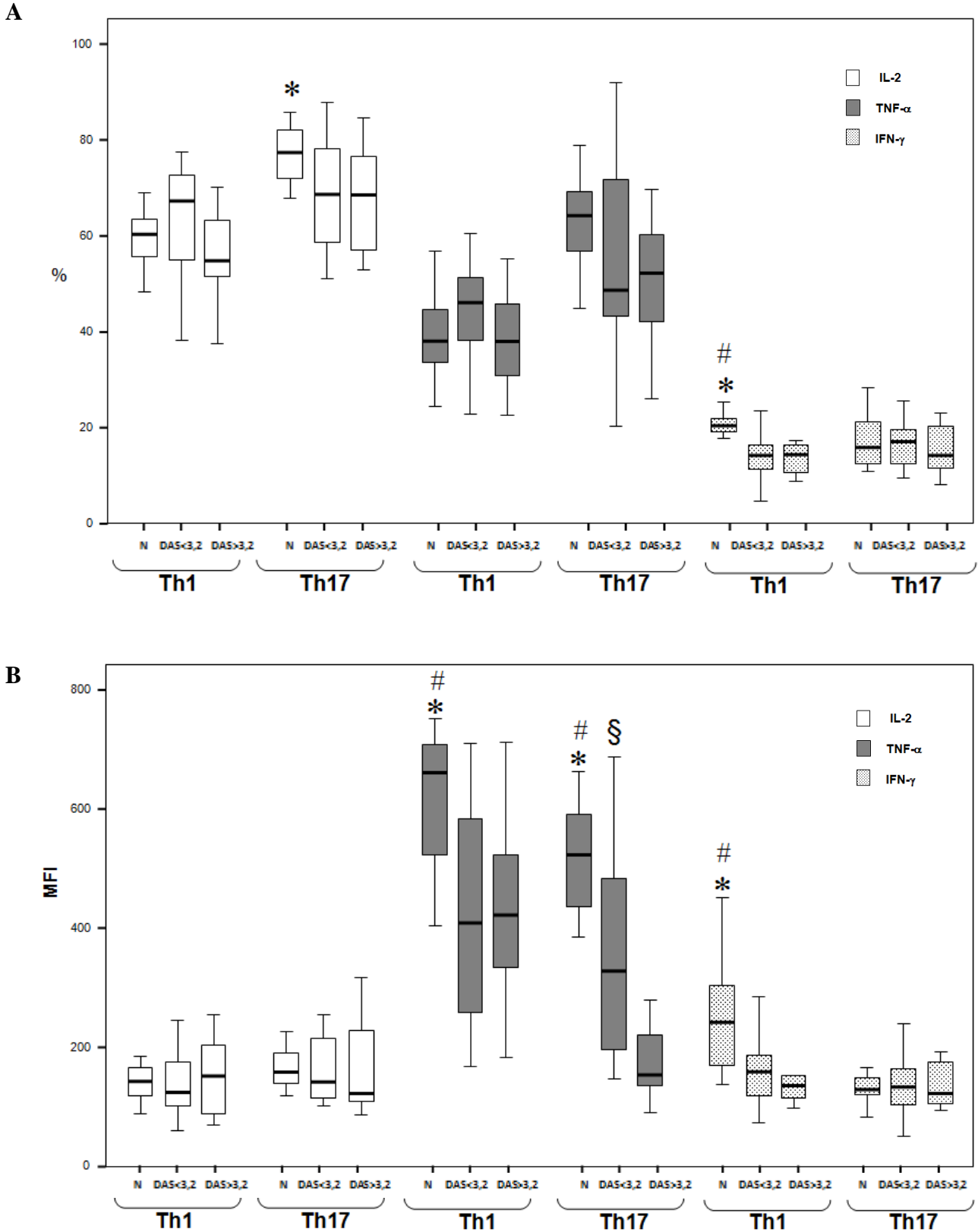
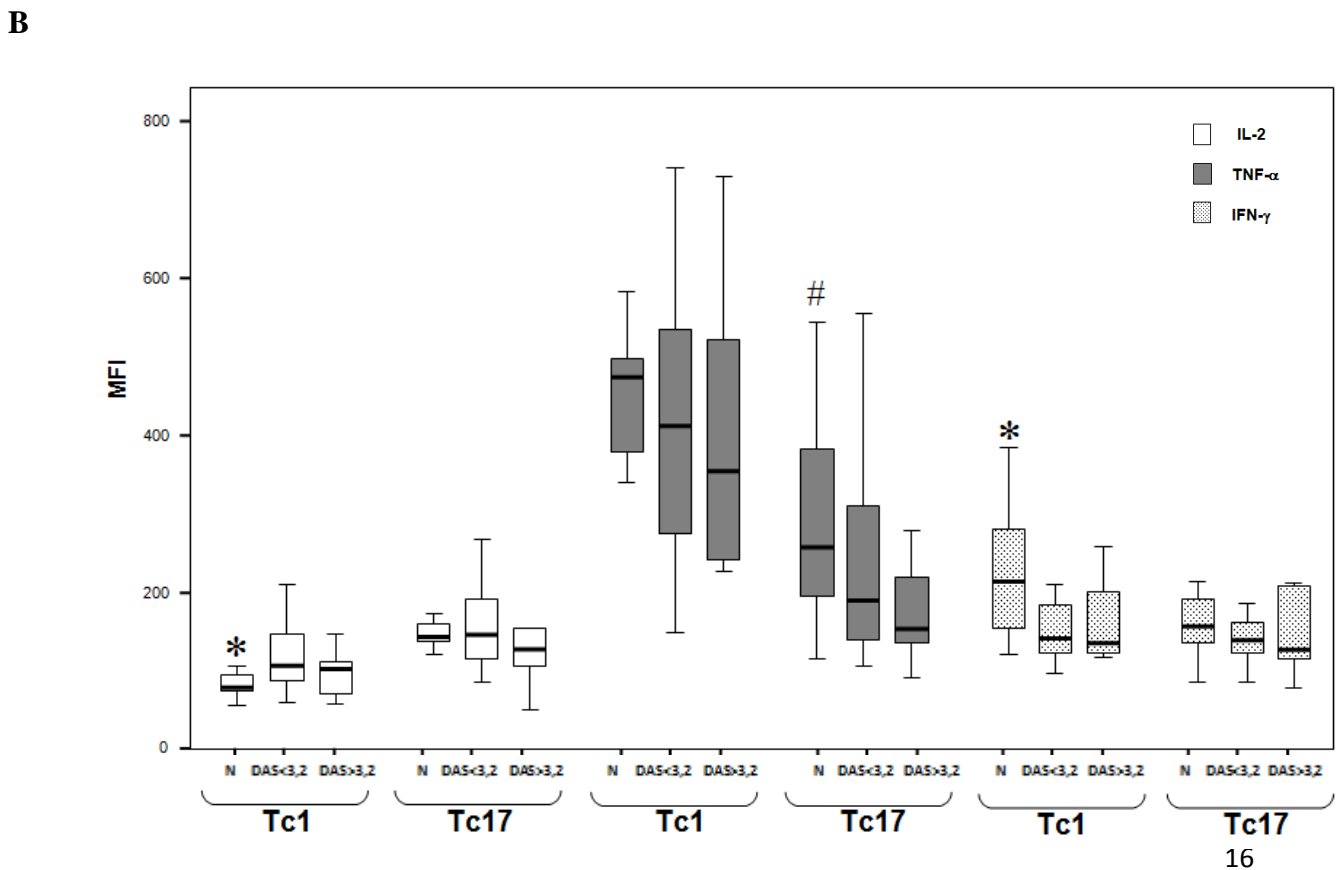
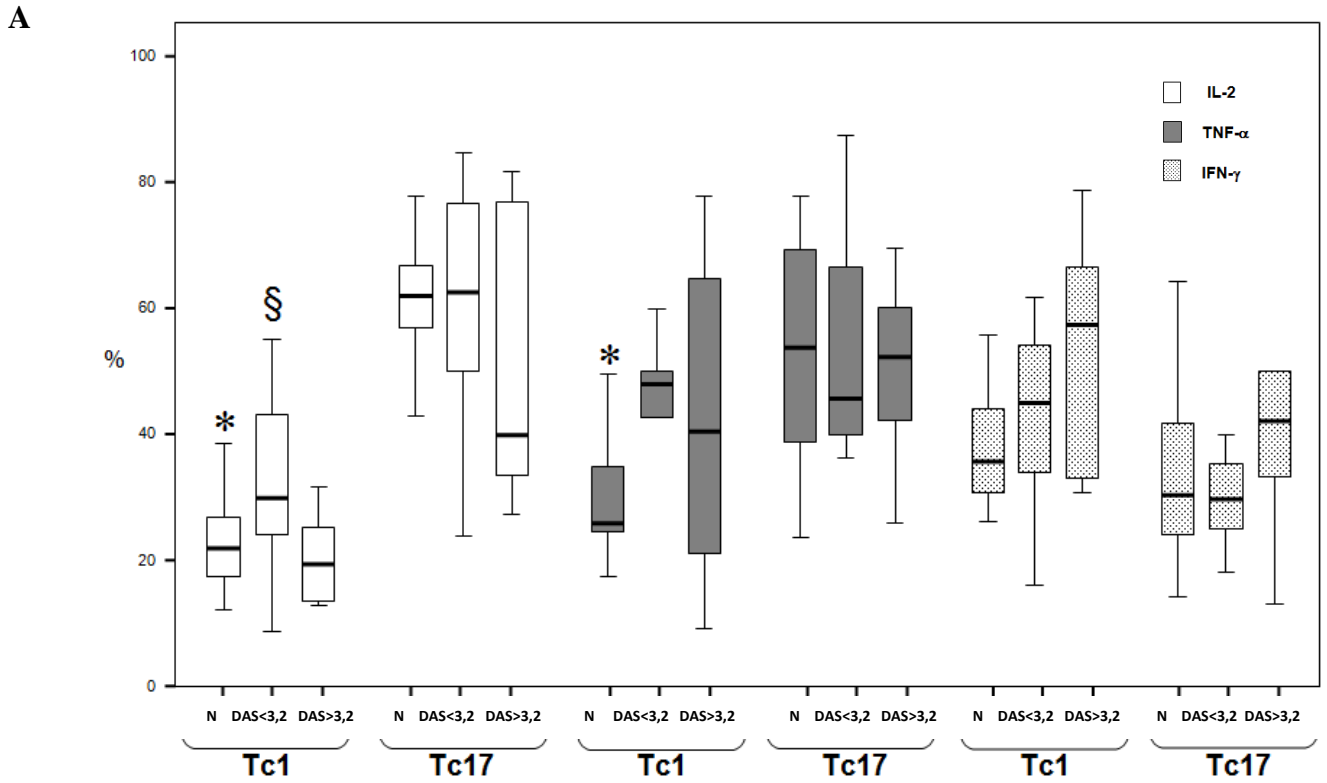


Figura 2. Frequência de células T CD8+ produtoras de IL-2-, TNF- α e IFN- γ (Tc1 e Tc17) (A) e a quantidade de cada citocina por célula (MFI) (B), após estimulação com PMA/ionomicina.



$p < 0,05$ DAS $> 3,2$ versus N

* $p < 0,05$ DAS $< 3,2$ versus N

§ $p < 0,05$ DAS $< 3,2$ versus DAS $> 3,2$

Discussão

Tem sido proposto que as células T desempenham um papel inflamatório importante na AR (24), nomeadamente, que na base da etiopatogenia da AR se encontra uma desregulação imune associada a um desequilíbrio Th1/Th2 (2,20,23). Alguns estudos apontam para uma diminuição das células Th1 em doenças autoimunes, resultando num aumento das funções desempenhadas pelas células Th2, uma vez que estes subtipos de células CD4 se auto-regulam e influenciam reciprocamente a sua homeostase (8, 25). Em concordância com estes estudos, nos doentes com AR observamos uma diminuição significativa, quer em termos de frequência de células T CD4 produtoras de IFN- γ , quer de quantidade de IFN- γ e TNF- α produzido por célula sugerindo alterações funcionais nos linfócitos T do SP e não apenas ao nível do tecido sinovial dos doentes com AR (Fig.1). No entanto, quando avaliadas tais alterações quanto à actividade de doença, os dois grupos de doentes não apresentaram diferenças significativas. Neste contexto, nos doentes com AR a diminuição da resposta imune pelas células Th1 parece resultar numa maior indução de uma resposta imune Th2. De facto, apesar da inflamação ao nível das articulações característica da AR, os doentes apresentam evidências de uma condição inflamatória sistémica marcada pela presença de auto-anticorpos, como FR e Anti-CCP resultantes de uma resposta imune Th2.

Além do mais, a associação da artrite a um perfil do tipo Th1 com células T CD4 produtoras de IFN- γ tem vindo a ser nos últimos anos questionado e vários estudos parecem apontar para a participação central na fisiopatologia da doença de um novo subtipo de linfócitos T - Th17 cells (5, 26). Da mesma forma, no compartimento de células T CD8, também foi demonstrada a presença de uma população minoritária Tc17 com uma possível participação nas doenças autoimunes (5,6,20).

Com base nestas observações, o presente estudo pretende determinar em doentes com AR e diferente actividade de doença a relativa abundância das células Th17 e Tc17 no sangue periférico, assim como a caracterização funcional das mesmas.

Contrariamente a outros autores que reportaram níveis elevados de células T produtoras de IL-17, no sangue periférico de doentes com AR (7,28), nós não encontramos diferenças na frequência das Th17. Isto pode dever-se ao recrutamento activo destas células T efectoras para os locais de inflamação, onde elas parecem estar em elevada quantidade ou como uma consequência das diversas terapêuticas a que os doentes estavam submetidos. Além do mais, o aumento de células T produtoras de IL-17 reportado por estes autores não resulta da activação directa *ex vivo*, mas antes de uma activação com fitohemaglutinina por 7 dias seguida de re-estimulação com PMA e ionoforo de cálcio (3).

Funcionalmente, as células Th17 mostram um aumento de IL-17 por célula em ambos os grupos de doentes, especialmente nos de alta actividade, isto suporta o facto de que esta citocina está relacionada com o aumento da actividade da doença (7). O que está de acordo com a ideia de que, mais importante do que o aumento da frequência de células produtoras de IL-17 em contribuir para a patogénese da artrite inflamatória é a capacidade funcional de produzirem esta citocina (6,28). Realmente, a IL-17 é capaz de promover a inflamação através da indução duma variedade de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores da destruição óssea e cartilágnea, como o RANKL e MMP's, levando à osteoclastogénese e subsequente destruição óssea (6,11,15,19), o que acaba por estar implicado na progressão da inflamação (13). Outro dado que realça o papel desta citocina é o facto de a neutralização desta, no líquido sinovial ou de seus receptores nos monócitos, reduzir significativamente a migração destas para a sinovial (27).

Ainda se quantificaram a produção de outras citocinas pró-inflamatórias pelas células Th17, pois está descrito que estas também são capazes de produzir IFN- γ , IL-2 e TNF- α , (7,17,21), tal como as Th1, quando expostas a determinado microambiente de citocinas. Observou-se que a frequência de células Th17 produtoras de IL-2 se encontrava significativamente diminuída nos doentes, tal como aquelas produtoras de TNF- α , mas não se atingindo nestas últimas diferenças estatisticamente significativas.

As células Th1 e Th17 mostram uma capacidade diminuída para produzirem TNF- α (Fig.1), o que pode ter implicações funcionais importantes, uma vez que esta citocina exibe uma função sinérgica com a IL-17, nos efeitos pró-inflamatórios (16). Isto pode ser devido ao facto de o tratamento que os doentes fazem poder ter algum efeito inibitório na produção do TNF- α (8,22).

Relativamente às células Tc17, e apesar da sua baixa representatividade dentro da população de linfócitos T, observou-se um aumento não significativo da sua frequência nos doentes com AR, particularmente naqueles com alta actividade comparando com os controlos (Tabela I). Quando se estudaram as células Tc17 do ponto de vista funcional, observaram-se pequenas diferenças na frequência destas células produtoras de IL-2 e IFN- γ e na quantidade destas citocinas por célula (Fig.2). Contudo, observou-se uma diminuição significativa destas células produtoras de TNF- α nos doentes de alta actividade, comparativamente aos outros grupos (Fig.2B). Desde que, as células Tc17 representam uma população recentemente descrita das CD8+, este é o primeiro estudo com o objectivo de investigar a sua funcionalidade na AR. Assim, quando se avaliou as restantes células T CD8+, produtoras de citocinas do tipo Tc1, encontrou-se a mesma diminuição de TNF- α , mas sem diferença significativa, e também uma diminuição significativa de IFN- γ nas Tc1 dos doentes com baixa actividade quando comparando com os controlos (Fig.2B). Esta evidência pode indicar, como já

referido, uma possível consequência da terapêutica imunossupressora que pode exercer um efeito inibitório na função das células T, alterando o padrão de secreção das citocinas (1,13), ou ainda de um rápido *turnover* ou comprometimento da produção que está associado a reacção celular secundária, com a produção de mediadores solúveis (12).

Além do mais, o número de células T CD8+ produtoras de TNF- α e IL-2, tal como, a quantidade de IL-2 por célula encontraram-se elevados nos doentes com AR, especialmente naqueles com baixa actividade da doença, comparando com os controlos (Fig.2). Esta evidência vem demonstrar uma participação relevante destas células Tc1, mediadoras de mecanismos de citotoxicidade, na AR e a possível influência que um microambiente de citocinas particular, provavelmente associado com uma resposta Th1, pode ter na actividade dessas células.

Em conclusão, as células T CD8 na AR mostram uma polarização preferencial no sentido tipo Tc1, bem visível pela frequência aumentada de células T CD8 a produzir IFN- γ e TNF- α que acompanhada pela sua acentuada perda de capacidade para produzir estas citocinas pró-inflamatórias parece apontar para um papel chave destas células na actividade da doença. Por outro lado, as células Th17 de doentes com AR, apesar de revelarem uma reduzida capacidade para produzir IL-2 e TNF- α apresentam uma maior habilidade para produzir IL-17, facto que juntamente com o aumento de células Tc17 observado particularmente nos doentes com alta actividade de doença sugere um importante contributo da IL-17 e das Th(c)17 para a fisiopatologia da AR.

Referências

1. Berner B, Akça D, Jung T, Muller GA, Reuss-Borst MA. Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry. *J Rheumatol*. 2000 May;27(5):1128-35.
2. Boissier MC, Assier E, Falgarone G, Bessis N. Shifting the imbalance from Th1/Th2 to Th17/treg: the changing rheumatoid arthritis paradigm. *Joint Bone Spine*. 2008 Jul;75(4):373-5.
3. Brennan FM, McInnes IB. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. 2008 Nov;118(11):3537-45.
4. Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:87-102.
5. Gaffen SL. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep*. 2009 Oct;11(5):365-70.
6. Gaston JS. Cytokines in arthritis--the 'big numbers' move centre stage. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Jan;47(1):8-12.

7. Hamada H, Garcia-Hernandez Mde L, Reome JB, Misra SK, Strutt TM, McKinstry KK, et al. Tc17, a unique subset of CD8 T cells that can protect against lethal influenza challenge. *J Immunol.* 2009; 182(6): 3469-81.
8. Henriques A, Ines L, Couto M, Pedreiro S, Santos C, Magalhaes M, et al. Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Immunol.* 2010;264(1):97-103.
9. Hinrichs CS, Kaiser A, Paulos CM, Cassard L, Sanchez-Perez L, Heemskerk B, et al. Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood.* 2009; 114(3) :596-9.
10. Kokkonen H, Söderström I, Rocklöv J, Hallmans G, Lejon K, Rantapää Dahlqvist S. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):383-91.
11. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
12. Kutukculer N, Caglayan S, Aydogdu F.. Study of pro-inflammatory (TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol.* 1998;17(4):288-92.

13. Leipe J, Grunke M, Dechant C, Reindl C, Kerzendorf U, Schulze-Koops H, Skapenko A. Role of Th17 cells in human autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 2010 Oct;62(10):2876-85.
14. Lubberts E. Th17 cytokines and arthritis. *Semin Immunopathol.* 2010 Mar; 32(1):43-53. Epub 2010 Feb 4.
15. Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis T lymphocytes. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):202.
16. Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum.* 2003 Mar;48(3):594-601.
17. Oo YH, Hubscher SG, Adams DH. Autoimmune hepatitis: new paradigms in the pathogenesis, diagnosis, and management. *Hepatol Int.* 2010;4(2):475-93.
18. Ortega C, Fernandez AS, Carrillo JM, Romero P, Molina IJ, Moreno JC, et al. IL-17-producing CD8⁺ T lymphocytes from psoriasis skin plaques are cytotoxic effector cells that secrete Th17-related cytokines. *J Leukoc Biol.* 2009; 86(2): 435-43.
19. Peck A, Mellins ED. Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. *Clin Immunol.* 2009 Sep;132(3):295-304.

20. Pernis AB. Th17 cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *J Intern Med.* 2009 Jun;265(6):644-52.
21. Raposo BR, Rodrigues-Santos P, Carneiro H, Agua-Doce AM, Carvalho L, Pereira da Silva JA, et al. Monoclonal anti-CD8 therapy induces disease amelioration in the K/BxN mouse model of spontaneous chronic polyarthritis. *Arthritis Rheum.* 2010 Jun 18.
22. Rubbert-Roth A, Finckh A. Treatment options in patients with rheumatoid arthritis failing initial TNF inhibitor therapy: a critical review. *Arthritis Res Ther.* 2009;11 Suppl 1:S1.
23. Sato K. Th17 cells and rheumatoid arthritis--from the standpoint of osteoclast differentiation--. *Allergol Int.* 2008 Jun;57(2):109-14.
24. Scrivo R, Di Franco M, Spadaro A, Valesini G. The immunology of rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Jun;1108:312-22.
25. Shah K, Lee WW, Lee SH, Kim SH, Kang SW, Craft J, et al. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2010;12(2):R53.
26. Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM 2nd, Pope RM. TH-17 cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2008;10(4):R93.

27. Shahrara S, Pickens SR, Dorfleutner A, Pope RM. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 2009 Mar 15;182(6):3884-91.

28. Shen H, Goodall JC, Hill Gaston JS. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2009 Jun;60(6):1647-56.