



Células Th17 e Interleucina 17 em Doentes com Artrite Reumatóide: Um novo alvo de tratamento?

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Ana Rita dos Santos Pacheco

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar
Universidade do Porto
4099-003 Porto, Portugal

lmed05069@icbas.up.pt

Orientador – António Joaquim dos Santos Pereira Sá Marinho
Assistente Hospitalar de Medicina Interna

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família, o sustento e apoio incondicional ao longo destes anos de estudo, em especial à minha tia, Gabi, pela paciência com que me educou desde a minha infância.

À Mónica e à Patrícia, companheiras de vida, por estarem presentes em qualquer situação e prontas para me segurar. Ao Anto, por estar sempre do meu lado mesmo com a distância que nos separa, por aturar os meus acessos de mau humor sem reclamar. À Anabela pela irmandade e confiança transmitida. À Ana e à Raquel, pelas aventuras e ‘descompensações’ desde o primeiro ano de faculdade. A todos os amigos do núcleo, aos “meninos e meninas” que sempre me acompanharam.

Ao Dr. António Marinho pelo apoio e motivação transmitidos desde o início, tanto na decisão do trabalho de investigação, como na sua defesa ao longo do tempo, a culminar na disponibilidade em corrigir o trabalho exposto.

À Dr^a Júlia Vasconcelos por ter planeado todo o início do trabalho laboratorial a ser realizado, pelo apoio e interesse demonstrados, pelo auxílio sempre que necessário. À Dr^a Esmeralda Neves e Dr^a Judite Guimarães por prestarem auxílio no início do trabalho em si.

Por fim, aos vários elementos do Instituto Ciências Biomédicas de Abel Salazar, responsáveis pela minha formação.

Introdução: A Artrite Reumatóide (AR) é a mais comum das doenças reumáticas autoimunes. Caracteriza-se por uma inflamação sinovial crónica que conduz a uma destruição articular/óssea, tendo, também, repercussões extra-articulares, associadas a elevada morbilidade e mortalidade. O tratamento dirigido para bloquear a doença nas suas fases iniciais tem evoluído significativamente; no entanto, continuam a existir doentes não tratados convenientemente e que mantêm actividade de doença destrutiva grave. A descoberta de uma nova linhagem de células que produzem preferencialmente IL-17, as Th17, trouxe novas expectativas promissoras quanto à regulação do sistema imune, sendo objecto de estudo actual.

Objectivo: Pretendia-se efectuar um estudo *follow-up* da frequência das células Th17 em 3 fases, de modo a verificar se o número destas células se altera em resposta à terapêutica instituída e se é ou não transversal nos vários estadios da doença em cada caso individual.

Material e Métodos: Colheita de sangue periférico de 20 doentes em 3 fases, antes de iniciar o tratamento com novo DMARD, ao primeiro mês e após três meses, para análise por citometria de fluxo da frequência de Th17. Recolha de dados laboratoriais analíticos a partir da consulta do processo clínico electrónico, na aplicação informática Sistema de Apoio ao Médico®, e registo em Microsoft Office Excell 2007 para posterior comparação.

Resultados: Dada a impossibilidade de realizar o estudo em tempo útil, efectua-se uma revisão dos conhecimentos actuais que apoiam e validam o proposto. O exposto, é uma sistematização do *state-of-art* actual acerca da patogenia subjacente à AR, tendo como base a participação das Th17 e IL-17 nos mecanismos da inflamação na VERA e a necessidade de novas terapêuticas dirigidas para esse estadio.

Conclusão: A confirmação da participação e das funções pro-inflamatórias com carácter destrutivo das Th17 e IL-17 na VERA contribui para a ideia de as tornar alvos terapêuticos. Mais esclarecimentos relativamente à patogenia e interacção entre os elementos envolvidos na inflamação serão necessários para se chegar a uma melhor estratégia de abordagem e para atingir a remissão da doença. A meta é tratar o mais precocemente possível, mas há ainda limitações, tanto no desenvolvimento de fármacos como nos custos, que tornam a AR mais uma doença de dilema médico dos dias de hoje, no qual tratamento efectivo não é acessível a todos os que podem beneficiar dele.

Palavras-Chave: Artrite Reumatóide; VERA; Células Th17; Interleucina 17; DMARDs;

Abstract

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is the most common autoimmune rheumatic disease. It is characterized by chronic synovial inflammation that leads to joint/bone destruction, and has also systemic effects, associated with high morbidity and mortality. The treatment aimed to block the disease in its early stages has evolved significantly; however, there are still patients not adequately treated that maintain severe destructive disease activity. The discovery of a new lineage of cells that electively produce IL-17 - the Th17 cells - has brought new expectations about the immune system regulation, being the subject of current studies.

Objective: The aim was to make a follow-up study of the frequency of Th17 cells in three phases in order to verify if the numbers of these cells change in response to therapeutic regimens and whether or not there's a variation of the account across the various stages of the disease in each case.

Methods: Collection of peripheral blood from 20 patients in three phases - before starting treatment with a new DMARD, the first month and after three months - to analyze the frequency of Th17 by flow cytometry. Gather of laboratory analytical data from the electronic clinical process, the SAM software application, and register in Microsoft Office Excel 2007 for comparison.

Results: Given the inability to conduct the study in time, it was carried out a review of the current knowledge that supports and validates the proposed work. The exposed is a systematic view of the actual state-of-art of the underlying pathogenesis of RA, based on the participation of Th17 and IL-17 in the mechanisms of inflammation in VERA and the need for new therapies targeted to that stage.

Conclusion: The evidence of participation and of the pro-inflammatory functions of Th17 and IL-17 in VERA contributes to the idea of making them targets for treatment. More elucidation is needed regarding the pathogenesis and interaction between the elements involved in the inflammation to reach the best approach and strategy to achieve remission of the disease. The goal is to treat as early as possible, but there are still limitations not only in drug development but also in their costs. This makes RA one more disease of the medical dilemma of today, where effective treatment is not accessible to all who can benefit from it.

Keywords: Rheumatoid arthritis; VERA; TH17 cells, Interleukin 17; DMARDs;

Índice de Figuras

Figura 1 – Processo imunológico na articulação com artrite

Figura 2 – Modelo de mecanismo de diferenciação das células Th17

Figura 3 - Citocinas relacionadas com a diferenciação em Th17 estão aumentadas no sangue periférico de doentes com VERA e no líquido sinovial de doentes com AR estabelecida

Figura 4 – Pirâmide de abordagem invertida no tratamento da AR

Figura 5 – Algoritmo para a abordagem da AR baseado nas recomendações da EULAR

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Critérios de Classificação da ACR/EULAR para a AR (2010)

Tabela 2 – Resumo do papel de IL-17A em estudos Humanos de artrite

Lista de acrónimos

ACPA Anticorpo Antipéptido Citrulinado	MTX Metotrexato
ACR <i>American College of Rheumatology</i>	NK <i>Natural Killer cells</i>
AINEs Anti-inflamatórios não esteróides	NOAR <i>Norfolk Arthritis Register</i>
Anti-TNF Anticorpo Factor de Necrose Tumoral	OPG Osteoprotegina
APCs Células Apresentadoras de Antígenos	PGE-2 Prostaglandina 2
AR Artrite Reumatóide	RANK <i>Receptor Activator of Nuclear Factor κB</i>
CCL20 <i>Chemokine (C-C motif) Ligand 20</i>	RANKL Ligando do RANK
CCR6 Receptor de Quimiocinas Tipo 6	RCP Proteína-C reactiva
CDAI Índice de Actividade Clínica da Doença	RM Ressonância Magnética
CD161+ <i>Cluster of Differentiation 161</i>	RORC <i>Related Orphan Receptor C</i>
DAS 28 <i>Disease Activity Score 28</i>	SDAI Índice de Actividade da Doença Simplificado
DMARDs <i>Disease-modifying Antirheumatic Drugs</i>	SF36 <i>Short-Form Health Survey</i>
EULAR <i>European League Against Rheumatism</i>	STAT-3 Sinal Transdutor e Ativador da Transcrição 3
ESR Velocidade de sedimentação globular	TGF- β <i>Transforming Growth Factor-β</i>
FLS Fibroblastos semelhantes a sinoviócitos	Th1 Células <i>T-helper 1</i>
FR Factor Reumatóide	Th 2 Células <i>T-helper 2</i>
HAQ <i>Health Assessment Questionnaire</i>	Th17 Células <i>T-helper 17</i>
IFN- γ Interferão γ	TNF- α Factor de Necrose Tumoral α
IL Interleucina	Treg Células T reguladoras
IRF-4 <i>Interferon Regulatory Factor 4</i>	VEGF Factor de Crescimento Endotelial Vascular
MMPs Metaloproteinases da Matriz	VERA <i>Very Early Rheumatoid Arthritis</i>

1. Introdução	1
2. Objectivos	5
3. Material e Métodos	6
4. Resultados/Desenvolvimento	7
4.1. Inflamação articular na AR: células Th17 e produção de citocinas	7
4.1.1. Expressão de citocinas.....	8
4.1.2. Diferenciação de TH17.....	10
4.2. Tratamento da Artrite Reumatóide.....	14
4.2.1. Breve Introdução	14
4.2.2. Novas Abordagens	17
5. Discussão: Th17/IL-17 <i>targeting</i>	18
6. Conclusões.....	20
 Bibliografia	 20

Anexos

1. Introdução

A AR é uma doença inflamatória sistémica, autoimune e de etiologia desconhecida, que acomete preferencialmente a membrana sinovial de pequenas articulações (das mãos e pés), com subsequente destruição articular e podendo provocar erosões cartilagueas e ósseas. Afecta aproximadamente 1% da população no mundo, com uma variação entre 0,3 a 1,5% dependendo da área geográfica onde o estudo populacional foi realizado ^[1-6]. Em Portugal, estima-se uma prevalência de 0,36%, à semelhança de outros países mediterrânicos, como a Grécia e Espanha, com valores entre os 0,3% e os 0,5% ^[6]. Há evidências de um aumento da incidência nos últimos anos, sendo o género feminino três vezes mais atingido que o masculino, com um pico entre os 35-45 anos ^[7,8].

Vários factores etiológicos podem estar envolvidos na AR, sem que nenhum seja prevalente e responsável único pela patologia; é proposto que em indivíduos geneticamente predispostos, factores ambientais específicos possam activar reacções imunes potencialmente patogénicas, incluindo a formação de anticorpos. Anos mais tarde, eventos adicionais, como traumatismos ou infecções, podem contribuir para o despoletar da doença, dirigindo reacções imunes contra as articulações. Ao mesmo tempo, factores socioeconómicos, psicológicos e o próprio estilo de vida (como o consumo de tabaco) podem influenciar a evolução mais ou menos insidiosa e o prognóstico da doença ^[9-12].

A manifestação clínica *pivot* é a de uma sinovite poliarticular, bilateral e simétrica, associada a dor, tumefacção (decorrente do edema e espessamento da sinovial) e rigidez articular. No entanto, a natureza crónica, autoimune e debilitante da patologia pode perturbar praticamente qualquer órgão ou sistema, do cardiovascular ao nervoso, atingindo pele, pulmão, olho, rim (entre outros). Assim, doentes com AR estabelecida podem não só apresentar um compromisso irreversível da sua capacidade funcional, com limitações nas actividades sociais, de lazer e profissionais, como também ter graves comorbilidades, com redução da qualidade e esperança média de vida ^[1-5, 9,13-16]. Para o evitar, é essencial uma intervenção precoce e apropriada nas fases iniciais da doença – na AR muito inicial ou muito precoce (*VERA – Very Early Rheumatoid Arthritis*).

O conceito de VERA surge com a evolução nos conhecimentos da fisiopatogenia e da divisão do ‘ciclo de vida’ da AR em fases. É definido como as primeiras 6-12 semanas de sintomatologia, um período crítico de janela de oportunidade terapêutica na qual a

intervenção adequada poderá modificar o curso da doença, com melhoria do prognóstico [16,17]. Contudo, esta definição não é linear: Dixon e Symmons, através do Registo de Artrite de Norfolk (NOAR) [18], abordaram o curso da doença, sugerindo que, em vez do conceito de AR inicial, dever-se-ia considerar o doente como tendo artrite inflamatória indiferenciada [19]. Outros estudos chegaram a conclusões semelhantes, constatando que, dos doentes com artrite de curta duração, apenas cerca de um terço desenvolviam AR; entre os restantes, alguns tinham resolução espontânea do quadro e outros conservavam a forma indiferenciada ou desenvolviam outra patologia reumatológica [16,20-22].

Assim, a dificuldade prendia-se com o reconhecimento e diagnóstico de VERA, principalmente pelo uso dos Critérios de Classificação da AR de 1987 da *American College of Rheumatology* (ACR) [23]. Em vez de critérios direccionados para a identificação de uma doença estabelecida, era fundamental determinar marcadores clínicos, serológicos ou genéticos que permitissem verificar quais os doentes que evoluíam para AR e que precisariam de terapia apropriada, mais ou menos agressiva, para diminuir a probabilidade de desenvolver doença persistente ou lesões erosivas [24]. Em Abril de 2010, num estudo colaborativo entre ACR e a *European League Against Rheumatism* (EULAR), Aletaha D *et al* propõem uma nova classificação para a AR, que se baseia em seis critérios. Dois são considerados essenciais: evidência de sinovite em pelo menos uma articulação e inexistência de uma etiologia específica para a mesma. Aos restantes critérios (1. forma e extensão do atingimento articular; 2. serologia - factor reumatóide (FR) e anticorpo antipéptido citrulinado (ACPA); 3. parâmetros de fase aguda- velocidade de sedimentação globular (ESR) e proteína C reactiva (CRP); 4. duração da sinovite) é atribuída uma pontuação. O diagnóstico da doença deverá ser efectuado com uma contagem igual ou superior a 6 (nos possíveis 10 pontos). São incluídos neste diagnóstico todos os doentes que tiverem erosões radiográficas, típicas da AR, com história clínica consistente e aqueles que tiverem doença (mesmo que inactiva) que no passado tenha completado os critérios estipulados [25].

	Score
Target population (Who should be tested?): Patients who	
1) have at least 1 joint with definite clinical synovitis (swelling)	
2) with the synovitis not better explained by another disease†	
Classification criteria for RA (score-based algorithm: add score of categories A-D; a score of $\geq 6/10$ is needed for classification of a patient as having definite RA)	
A. Joint involvement	
1 large joint	0
2–10 large joints	1
1–3 small joints (with or without involvement of large joints)	2
4–10 small joints (with or without involvement of large joints)	3
>10 joints (at least 1 small joint)	5
B. Serology (at least 1 test result is needed for classification)	
Negative RF <i>and</i> negative ACPA	0
Low-positive RF <i>or</i> low-positive ACPA	2
High-positive RF <i>or</i> high-positive ACPA	3
C. Acute-phase reactants (at least 1 test result is needed for classification)	
Normal CRP <i>and</i> normal ESR 0	0
Abnormal CRP <i>or</i> normal ESR 1	1
D. Duration of symptoms	
<6 weeks	0
≥ 6 weeks	1

Tabela 3 – Critérios de Classificação da ACR/EULAR para a AR (2010)

ACPA - anticorpo antipéptido citrulinado; CRP – proteína C reactiva; ESR – velocidade sedimentação globular²⁵

Praticamente em simultâneo com a publicação dos novos critérios de classificação, Smolen JS *et al.* sugerem as Recomendações da EULAR para o Controlo da AR com *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs) biológicos e sintéticos ^[26]. Nesta está presente a metodologia a ser seguida na abordagem da doença, tanto inicial como estabelecida, com informação para reumatologistas, doentes e agências de segurança social e de reembolso. Apesar de se constatar os avanços terapêuticos conseguidos nesta última década, admite-se a necessidade de investigações futuras para direccionar o tratamento de modo mais selectivo e estabelecer o melhor agente (ou combinação de agentes) para determinado doente, com base no seu fenotipo e nos factores de risco modificáveis que possa apresentar ^[17,27].

A Interleucina-17 (IL-17) e o seu receptor, IL-17R, foram descobertos em meados da década de 90. Constatou-se que é uma citocina pro-inflamatória produzida por células T e com capacidade de promover a activação e maturação de neutrófilos, o que conduziu a uma associação imediata à AR. Com avanço nas investigações, concluiu-se que não era única: fazia parte de uma família de citocinas (que inclui IL-17A a F), de sequência diferente mas com efeitos semelhantes ^[28,29]. Apesar do conhecimento da existência desta família há alguns anos, apenas em 2005/6 foram identificadas as células produtoras, as T *helper* 17 (Th17). São uma linhagem de células T CD4+, diferentes das já estudadas e conhecidas T *helper* 1 (Th1) e T *helper* 2 (Th2), com uma contribuição *major* na patogenia de várias doenças autoimunes (da AR à Psoríase, Doença de Crohn, Esclerose Múltipla) ^[30-33]. Além da produção de citocinas (IL-17A, IL-22, factor de necrose tumoral α (TNF- α), IL-6), estão, também, envolvidas nas interacções entre células através da expressão do *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand* (RANKL) e no recrutamento e sobrevivência de neutrófilos ^[34]. Contudo, a sua contribuição e efeito no início a ao longo da evolução da AR não estão completamente esclarecidos ^[35].

O tratamento direccionado para citocinas inflamatórias com os mais variados inibidores (como os anticorpos monoclonais contra TNF ou o receptor celular de IL-6) permitiram extrapolar a possibilidade de inibir a actividade de IL-17 nos estadios precoces da AR, de modo a evitar a sua evolução.

Para aprofundar o conhecimento nesta área e melhor entender a progressão da doença com o tempo, procurou-se estudar a frequência de células Th17 no sangue periférico de doentes com AR que tivessem iniciado uma nova terapia com DMARDs biológicos ou não biológicos (*vide* Material e Métodos e Anexos). Apesar do esforço para continuar o estudo, os prazos estabelecidos para iniciar e efectuar o *follow-up* não foram cumpridos devido a atrasos na obtenção de todas as autorizações necessárias, tendo sido o autor obrigado a adiá-lo para uma futura investigação. Por isso, efectua-se a revisão de artigos publicados em revistas referidas no Index Medicus utilizando para tal os motores de busca *PUBMED* e *MEDLINE OVID*, com as Palavras-chave: a) “*Rheumatoid arthritis*” b) “*VERA*” c) “*Th17*” d) “*IL7*” e) “*DMARDs*”. Foram incluídos todos os tipos de artigos, publicados até 2011, referentes à epidemiologia, fisiopatologia, clínica, diagnóstico e tratamento da AR, assim como aqueles referentes às células Th17 e à IL-17, nomeadamente, à diferenciação, produção de citocinas, função e interacção na AR e à terapêutica dirigida. Foi procurado obter informação relativa ao nosso país através do site da Sociedade Portuguesa de Reumatologia (<http://www.spreumatologia.pt/>), com consulta da *Acta Reumatológica Portuguesa*.

2. Objectivos

O estudo *follow-up* descritivo proposto procurava:

- Estudar a frequência de células Th17 em 3 fases: antes do início terapêutico, após um mês e após três meses;
- Verificar se a frequência das células Th17 se altera em resposta à terapêutica instituída;
- Verificar se a frequência das células Th17 é ou não transversal nos vários estadios da doença em cada caso isolado e correlacioná-la com a actividade da mesma, expressa através da *28-joint count Disease Activity Score* - DAS28.

Pretende-se efectuar uma sistematização da etiopatogenia da AR inicial com base na participação das células Th17 e IL17 nos mecanismos de inflamação, apresentar a metodologia de tratamento da doença e reforçar a necessidade de novas terapêuticas dirigidas para um estadio precoce.

3. Material e Métodos

Doentes e Amostras Colheitas de sangue periférico seriam efectuadas em 20 doentes com AR, que estivessem para iniciar uma nova terapêutica com um DMARD, biológico ou não biológico. Estes doentes provavelmente teriam diferente actividade da doença entre si, definida pelo valor de DAS28, avaliado durante cada consulta. O acompanhamento seria efectuado em simultâneo às consultas do 1º e do 3º mês pós-terapia, com prescrição de novas colheitas de sangue em cada uma destas. Para comparação, seriam utilizadas amostras 20 dadores saudáveis como controlos. O estudo foi aprovado por parte do Gabinete Coordenador de Investigação/Departamento de Ensino Formação e Investigação e pela Comissão de Ética para a Saúde (N/REF.^a 262/10 (175-DEFI/239-CES)). Todos os participantes seriam informados correctamente do estudo através do consentimento informado ^(anexo 1), com garantia da segurança do material colhido, do armazenamento e da confidencialidade dos dados. Não existe qualquer risco ou despesa para os participantes.

Follow-up analítico As colheitas de sangue efectuadas nos três tempos - início, 1º mês, 3º mês - seriam destinadas à realização de análises de rotina da Artrite (incluindo RCP, ESR, FR e ACPA) e à avaliação da frequência de células Th17. Esta última requer uma colheita específica para o estudo, ou seja, que não é rotina de doentes com Artrite, e inclui 1 tubo de Hemograma (3 ml por tubo). A sua quantificação é efectuada num citómetro de fluxo *Epick XL Coulter* (de acordo com instruções do fabricante) após um protocolo de activação, fixação e permeabilização celular ^(anexo 3).

Dados Os dados analíticos e clínicos necessários serão recolhidos com a consulta do processo electrónico dos participantes, através do sistema informático de Sistema de Apoio ao Médico®. Seriam registados a nível do Microsoft Excel 2007 para posterior análise e descrição.

4. Resultados/Desenvolvimento

4.1. Inflamação articular na AR: células Th17 e produção de citocinas

A maioria dos elementos imunológicos tem um papel fundamental no início, evolução e manutenção do processo autoimune da AR, sob um mecanismo complexo e não totalmente esclarecido. O defeito na regulação de citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, com produção excessiva da primeira, é fundamental no processo de inflamação que conduz à destruição articular [36,37]. A figura 1 é um modelo esquemático do processo imunológico subjacente à AR.

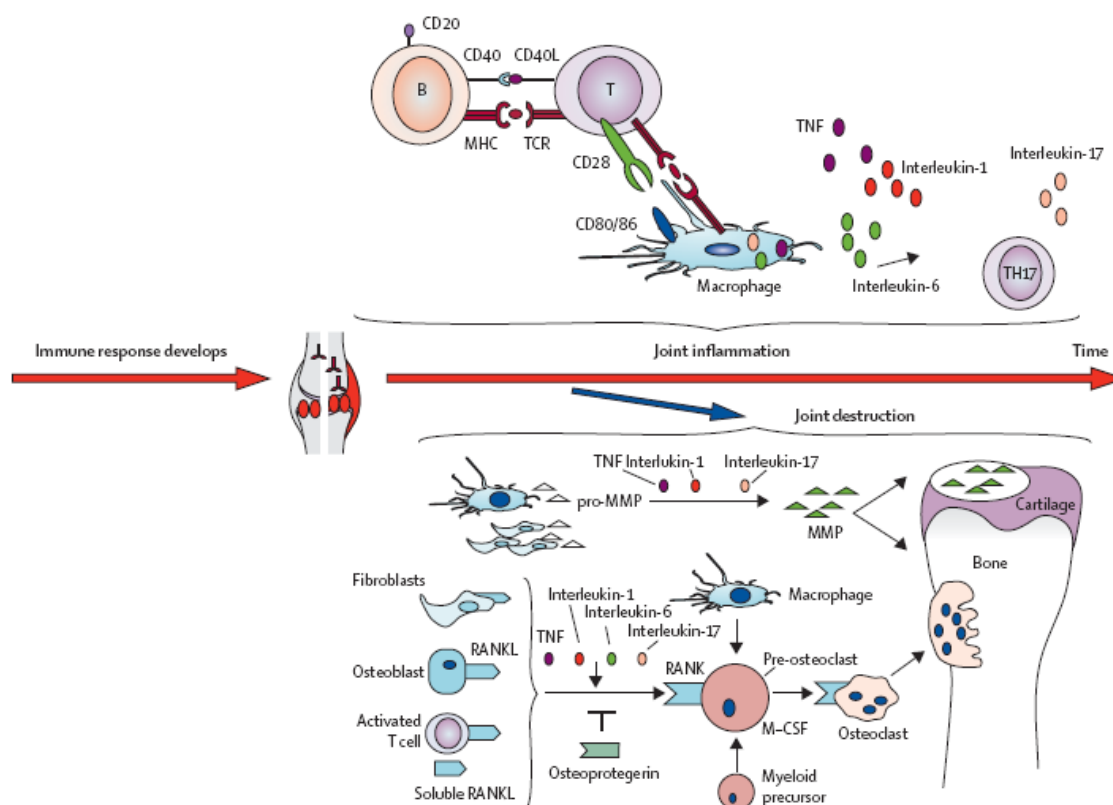


Figura 6 – Processo imunológico na articulação com artrite

Parte superior: inflamação articular; parte inferior: destruição articular⁹

Células B produtoras de anticorpos (FR, ACPA) podem ter, também, actividade de células apresentadoras de antígenos (APCs, assim como os macrófagos e células dendríticas). Estas comunicam com receptores das células T e a sua activação ocorre apenas se estiver na presença de sinais co-estimuladores mediados através da família de receptores CD28-B7. Posteriormente, estas células T podem activar macrófagos e outras células, como fibroblastos sinoviais, responsáveis pela produção de várias citocinas pro-

inflamatórias, o TNF- α , IL-1, IL-6. Estas citocinas criam um ambiente que induz a diferenciação de células T em diferentes fenótipos, como as células TH17^[32,38], e perpetuam a inflamação, com aumento da expressão de moléculas de adesão celular e hiper-produção de factores de crescimento e outras moléculas efectoras^[9].

4.1.1. Expressão da citocina IL-17

Nestes últimos anos, evidências mostram que as citocinas da família da IL-17 (em particular a IL-17A) têm um papel preponderante na patogenia da AR. A IL-17A é a *signature cytokine* das células Th17, mas também é produzida noutros tipos celulares (neutrófilos, células *Natural Killer* (NK), entre outras),^[39,40]. A Tabela 2, faz uma breve referência à sua actividade nos Humanos em diferentes situações^[35].

	Human studies
IL-17 expression	Spontaneously produced by RA synovium/synovial fluid
IL-17 in inflammation	IL-17 stimulates IL-6 and IL-8 in fibroblast, endothelial and epithelial cells IL-17 stimulates TNF, IL-1 in macrophages IL-17 stimulates GM-CSF, PGE2 in synoviocytes
IL-17 in early arthritis	Distinct but transient synovial fluid cytokine profile, including IL-17 IL-17 and TNF most pronounced with shorter disease duration
IL-17 in established arthritis	Synovial expression of IL-17, IL-1, TNF, IL-10 IL-1 more pronounced with longer disease duration IFN- γ protective
IL-17 and interplay with TNF and IL-1	Enhances IL-1 mediated IL-6 in RA synoviocytes as well as TNF-induced synthesis of IL-1, IL-6, IL-8 IL-17 synergize with IL-1, TNF
IL-17 in bone damage	IL-17 induces RANKL in cultures of osteoblasts Synergy between IL-17 and TNF
IL-17 in cartilage damage	IL-17 induces NO metalloproteinases in synoviocytes and chondrocytes Synergy between IL-17 and TNF
Th17	IL-17-producing cells in the synovium of RA patients (Th0/Th1 but not Th2)

Tabela 4 – Resumo do papel de IL-17A em estudos Humanos de artrite³⁵

A presença sustentada da IL-17 é um dos mecanismos que conduz à destruição cartilaginosa e óssea, podendo estas células participar:

1. Na produção de outras citocinas/quimiocinas (que promovem e recrutam outras células inflamatórias); de enzimas por neutrófilos (β -glucuronidase, elastase); na secreção de metaloproteinases da matriz (MMPs) por macrófagos e sinoviócitos; e no aumento de prostaglandina-2 (PGE-2): que contribuem para a degradação de proteínas estruturais da matriz extracelular da cartilagem ^[39];
2. No recrutamento e migração de monócitos e de fibroblastos semelhantes a sinoviócitos (FLS), com proliferação local dos mesmos, o que provoca a formação de uma membrana hiperplástica com capacidade de invasão de tecidos, designada *pannus* ^[41,42];
3. Na indução de neoangiogénese através da produção de factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e outros factores angiogénicos por FLSs ^[43].
4. Na diferenciação e activação de osteoclastos através do eixo RANKL/RANK/Osteoprotegina (OPG), no qual uma desregulação conduz a um predomínio de RANKL em detrimento de OPG e activação de RANK (figura 1) ^[9,37,44]. Os mecanismos têm um alvo preferencial, cartilagem ou osso, como foi demonstrado por Cohen et al num estudo com inibidor selectivo de RANKL, no qual foram prevenidas erosões ósseas mas não inflamação ou diminuição do espaço articular ^[45].

O interesse nesta citocina cresceu graças aos modelos animais, que demonstraram que ausência/bloqueio da IL-17 parecia suprimir a indução e diminuir a progressão da doença. De facto, verificou-se que níveis mais elevados de IL-17 e TNF- α , presentes no soro e sinovial de doentes com VERA, prognosticam uma pior progressão e dano articular, ao contrário da presença de interferão γ (IFN- γ), que prenuncia protecção de uma progressão deletéria ^[46-48]. Estes achados e a evidência da presença de células Th17 nas fases descritas, dão pistas sobre como mecanismos de estimulação de células T *in situ* podem iniciar a inflamação crónica na sinovial da AR.

Em concordância, uma recente revisão de Ferraccioli e Zizzo ^[49], defende o envolvimento das células Th17 na evolução de uma inflamação base, inicial, mediada por imunidade inata, para a inflamação crónica, auto-imune e dificilmente reversível da AR. Um exemplo para tal associação é a relação entre Th17/IL-17 e FLS, acima referida. Esta pode representar o mecanismo de base para a cronicidade da doença, já que ocorre uma

constante activação recíproca entre estas células: é a produção de citocinas pelas Th17 que promove a “transformação” de FLS e a sua conversão no fenótipo destrutivo presente na AR – *pannocytes*, de *pannus* ^[42]. Estas últimas, por sua vez, expressam proteínas oncogénicas sinalizadoras que conduzem à produção descontrolada de IL-6 e IL-15 (expresso na forma ligada à superfície da membrana de FLS da AR), recentemente relacionado a áreas de grande acumulação e activação de células T CD4+, como a medula óssea justa-articular ^[49].

4.1.2. Diferenciação das Th17

Desde há vários anos são propostos modelos nos quais células T *helper* CD4+ são modeladas e diferenciam-se consoante o ambiente de citocinas presente ^[37,49,50]. Resumindo, havia evidências da existência de dois subtipos de células T, as Th1 ou Th2 (derivadas da reacção a sinais IL-12 e IFN- γ ou IL-4, respectivamente), que, no entanto, não explicavam a patogenia de algumas doenças. Infante-Duarte et al, efectuaram um estudo de estimulação de APCs com lipopeptídeos da *Borrelia burgdoferi* e células T, no qual ocorreu a secreção de IL-17 e TNF- α , associados a pior prognóstico, mas não IFN- γ ou IL-4, concluindo que um outro fenótipo de células seria responsável pelo mecanismo imune ^[51].

Foi este o impulso para a procura da nova linhagem e após o avanço nas investigações, a descoberta de IL-23 e o uso de modelos animais, as tentativas de diferenciação deste grupo de células com diferentes citocinas e as várias controvérsias relativamente ao seu desenvolvimento e activação, chegou-se a conclusões essenciais para a compreensão do seu funcionamento, resumidas por Ghilardi e Ouyang num artigo de revisão de 2007 ^[52]. De forma sintética, a figura 2 propõe o mecanismo de diferenciação de células Th17 em ratinhos, que parece ter algumas diferenças comparada com a humana ^[39]. Células T CD4+ indiferenciadas responderiam a citocinas promotoras como IL-1 β , IL-6, IL-21 e doses baixas de *transforming growth factor* β (TGF- β) ^[46], activando o sinal transdutor e activador da transcrição 3 (STAT-3). Este, por sua vez, induz a produção de *interferon regulatory factor* 4 (IRF-4), *related orphan receptor* C (RORC – ortólogo de ROR γ t de ratos), receptor da interleucina 23 (IL-23R) e IL-21. A expressão do IL-23R nesta fase permite a acção com IL-23, essencial à patogenia e expansão das Th17, e explica o porquê desta citocina não agir na diferenciação das células T *naive* ^[32]. A produção de IL-21 permite um feedback positivo autócrino que, através da promoção da activação de STAT3 e da expressão de RORC, reforça a diferenciação de mais células Th17 e

estabiliza a presença deste fenótipo. Pode, também, ter um papel preponderante ao contrariar a supressão por células T reguladoras (Treg), o que leva a alteração do equilíbrio TCD4+/Treg^[32,40,46,52,53]. Outras citocinas pró-inflamatórias são produzidas, como o TNF- α e a IL-22, indutor de quimiocinas, proteínas de fase aguda como RCP, defensinas, hiperplasia, que pode promover ou limitar a inflamação dependendo do tipo de tecido onde actua.

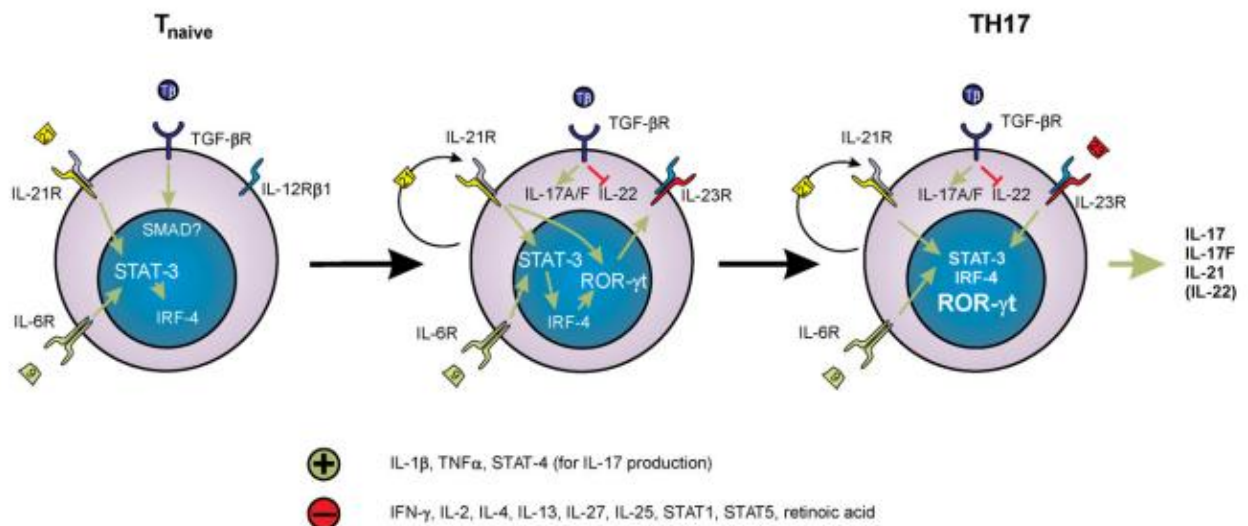


Figura 7 –Modelo de mecanismo de diferenciação das células Th17⁵⁵

No indivíduo saudável, as respostas inflamatórias têm de ser cuidadosamente balanceadas para evitar consequências deletérias. Como tal, há várias citocinas que contrariam o efeito das acima referidas, inibindo a diferenciação destas células ^[54,55]. São exemplo disso, citocinas produzidas por células Th1 e Th2, o IFN- γ e a IL-4; a IL-2 e IL-25 que diminuem a actividade; a IL-10, produzida pelas próprias Th17, com um efeito imunoregulador negativo nas células produtoras e que aumenta as células Treg no sangue e na sinovial articular ^[33]; e a IL-27 que, através do STAT1 e de forma independente de outras células, é provavelmente o supressor mais potente da diferenciação de células Th17 ^[56].

Actualmente procura-se verificar até que ponto este mecanismo ocorre na VERA, como se exprimem as células Th17 e se podem ou não ter um papel na transição da fase aguda da inflamação para uma fase crónica. Ou seja, pretende-se averiguar se as citocinas que induzem a activação, proliferação e actividade das Th17 estão já presentes no ambiente inicial da inflamação, e qual é a diferença de expressão de citocinas entre as fases iniciais e a AR estabelecida.

Cascão et al estudaram a rede de citocinas responsável pela activação de neutrófilos e Th17 em doentes com AR inicial não tratada [3]. Os resultados evidenciaram que os níveis de IL-17 estão aumentados em doentes com VERA em comparação com controlos, mostrando apenas um pequeno aumento naqueles com AR estabelecida. Tal observação está de acordo com o estudo de Kokkonen et al [57]: a concentração de IL-17 atinge o seu máximo em “pré-doentes”, 3 anos antes da AR estabelecida. O mesmo ocorre com IL-1 β , IL-6 e IL-22, cujos níveis eram mais elevados na VERA, em comparação com controlos. A IL-6 mantinha-se elevada em todos os grupos de doentes, enquanto a IL-1 β estava aumentada só na VERA e a IL-22 na VERA e na AR estabelecida (figura 3). Em contraste, não foram encontradas diferenças nos níveis de citocinas promotoras da diferenciação de Th1 e Th2 nos diferentes estadios de indivíduos com patologia. Assim, concluíram que o padrão de citocinas na VERA (IL-1 β , IL-6) favorece a diferenciação de células Th17, que por sua vez secretam IL-17 e IL-22, que têm função na patogenia de doenças autoimunes.

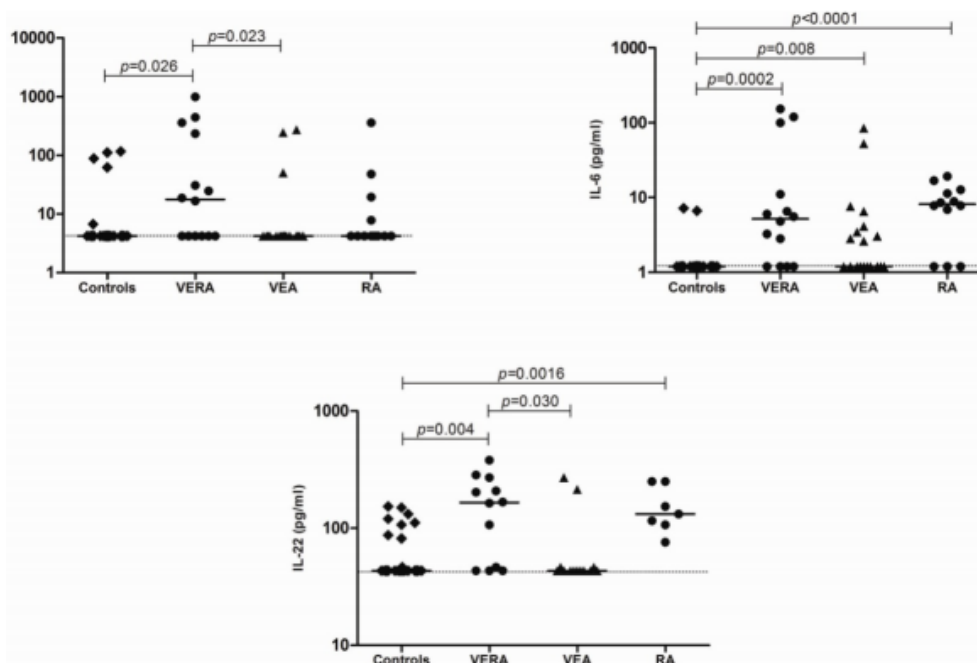


Figura 8- Citocinas relacionadas com a diferenciação em Th17 estão aumentadas no sangue periférico de doentes com VERA e no líquido sinovial de doentes com AR estabelecida⁴

Um outro assunto de particular interesse e por vezes esquecido é a plasticidade entre linhagem de células Th. A diferenciação para fenótipos específicos Th1/Th2/Th17/Treg não é fixa, ou seja, pode ocorrer interconversão entre estes subtipos de células consoante o ambiente inflamatório [58]. Nistala et al, num estudo pormenorizado da

plasticidade de células T ^[38], analisaram directamente as propriedades de transcrição, a função e características clonais das Th17 e a sua possível conversão em células que expressem um fenótipo intermediário Th17/Th1 (produtoras de IL-17 e IFN- γ) ou mesmo Th1. Concluem que as células Th17 realmente têm plasticidade num microambiente de citocinas favorável, nomeadamente com a presença de IL-12, e que expressam factores de transcrição (mais especificamente, RORC2) comuns a ambos os fenótipos Th17 vs Th17/Th1. O mesmo não parece acontecer com as Th1, que mantém o seu fenótipo mesmo com variações de citocinas. No local de inflamação, Th17 e Th17/1 estão restritas à população com receptor quimiocinas tipo 6 (CCR6+), o que pode reflectir o papel do seu ligando, *chemokine (C-C motif) ligand 20* (CCL20), como essencial ao recrutamento de mais Th17. Por fim, constata-se a possível identificação de células Th1 com ancestral Th17 através do *cluster of differentiation* 161 (CD161), ou seja, a população de células Th1 CD161+ encontrada no local de inflamação pode resultar da plasticidade das Th17. Se se confirmar que este processo de conversão ocorre e está acelerado na AR, pode-se explicar a concentração elevada de células Th1, e não Th17, no líquido sinovial da AR estabelecida.

São estes estudos e outros semelhantes que apoiam o facto de um tratamento biológico direccionado para a linhagem de Th17 poder conduzir ao controlo precoce da doença numa parte dos doentes afectados, já que provam que a sua frequência é mais elevada em fases iniciais da AR, demonstram o seu papel na patogenia e na gravidade da doença, com evolução para cronicidade, e ainda reflectem sobre a possibilidade de estas células serem a base de outras presentes em fases mais avançadas da patogenia e responsáveis pela erosão grave e debilitante na AR estabelecida.

4.2. Tratamento da Artrite Reumatóide

4.2.1. Breve Introdução

O tratamento óptimo da AR é multifacetado e multidisciplinar, requer a integração de medidas farmacológicas e não farmacológicas: uso de DMARDs, anti-inflamatórios não esteróides (AINEs), analgésicos, glucocorticóides, imunomoduladores, terapia ocupacional e exercício físico, aconselhamento psicológico e, em última instância, a intervenção cirúrgica ^[26].

Nesta última década, o uso optimizado DMARDs, nomeadamente metrotexato, e a disponibilidade de novos agentes biológicos, particularmente os direccionados contra TNF- α , IL-1R e IL-6R, permitiram um maior sucesso no tratamento e aumentaram a oportunidade de progredir para novas estratégias de controlo da AR, com o objectivo de chegar à sua remissão clínica ou, se esta não for alcançável, uma baixa actividade de doença ^[13,25,26,39,59-61]. Estas estratégias incluem a referência e instituição precoce de DMARDs e o controlo apertado através de medidas da actividade da doença (DAS28, o índice de actividade da doença simplificado (SDAI) e o índice de actividade clínica da doença (CDAI), *health assessment questionnaire* – HAQ, ^[62]), com mudança do tratamento farmacológico quando apropriado. Por isso, inverteu-se a ideologia “*start low, go slow*” da pirâmide de abordagem da AR e o tratamento com DMARDs passa a ser iniciado ao efectuar o diagnóstico (Figura 4). Assim que níveis prolongados e satisfatórios de controlo da doença sejam atingidos, as doses farmacológicas podem ser cuidadosamente reduzidas até ao nível mínimo necessário para manter essas condições ^[65].



Figura 9 – Pirâmide de abordagem invertida no tratamento da AR

É nesta sequência que, em 2010, foram criadas as 15 recomendações da EULAR ^[26], sujeitas a avaliação económica para verificar o seu balanço custo/efectividade. Com base nestas, elaboraram um algoritmo de abordagem da AR, representado na figura 5.

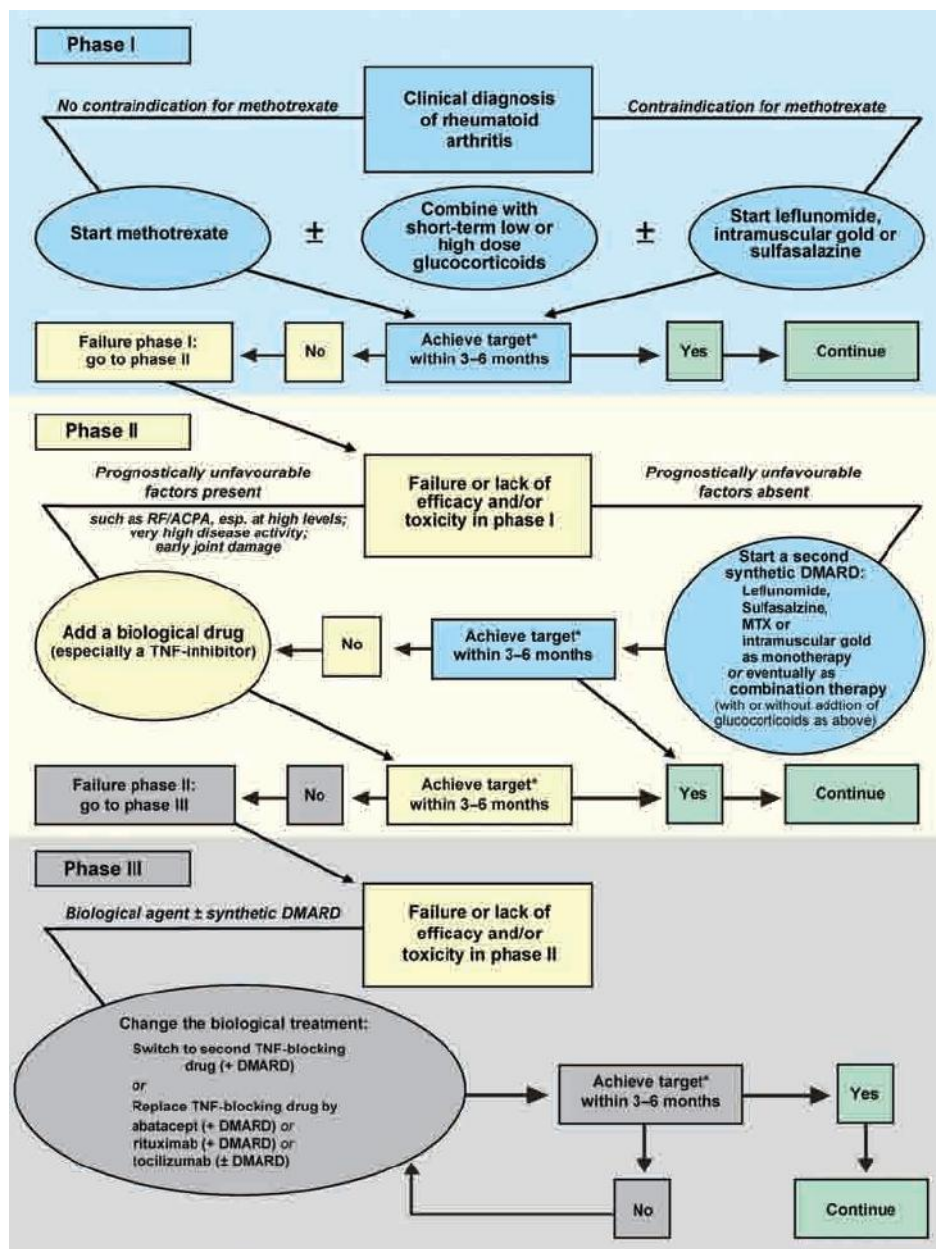


Figura 10 – Algoritmo para a abordagem da Ar baseado nas recomendações da EULAR[10]

* target do tratamento definido como remissão clínica da doença ou, pelo menos, baixa actividade da doença ²⁶

Desde a sua introdução, o Metotrexato (MTX, inibidor do metabolismo do ácido fólico) tem sido o pilar da terapia inicial e o componente chave na maioria das combinações. Uma das características do tratamento com este DMARD é o uso concomitante com

suplementos de ácido fólico que diminua a sua toxicidade. Novas evidências para o seu uso optimizado continuam a surgir, nomeadamente na área da posologia e farmacologia, de modo a tentar aumentar o número de doentes que responde a esta terapêutica. A Hidroxicloroquina, a Sulfasalazina e a Leflunomida, continuam a ser fármacos relevantes nos doentes refractários ao tratamento, sendo efectivos tanto em monoterapia como quando em associação ^[61].

Apesar de serem os fármacos de segunda linha eleitos e dos mais utilizados para o tratamento da AR, os bloqueadores de TNF- α (Infliximab, Etanercept, Adalimumab) também não são bem sucedidos em todas as situações. Lina C. et al, num estudo publicado no último mês (Maio 2011), procuraram investigar se a desregulação Th1/Th2 e Th17/Treg poderia ser revertida por Etanercept e se estaria relacionada com uma melhoria clínica (avaliada com DAS28). Em doze semanas compararam a frequência das células e a quantidade de citocinas relacionadas em três grupos (um de controlo, outro com terapia com MTX e o terceiro com terapia combinada MTX e Etanercept). Chegaram à conclusão que a terapia combinada era a mais eficaz: diminuía a actividade da AR ao normalizar a distribuição de Th17 e Treg e das suas citocinas, com melhores resultados que a monoterapia com MTX ^[64]. Tal achado apoia novamente a ideia concebida da acção fundamental das células Th17 na inflamação, com diminuição do DAS28 nos doentes com terapia que de alguma forma actue sobre estas células.

De modo semelhante, Tocilizumab, um anticorpo contra o receptor da IL-6, mostrou eficácia no tratamento da AR ^[65]; como referido, estas citocinas são importantes na diferenciação das Th17 e acabam por ser induzidas pelas IL-17, num eixo de feedback positivo. O mesmo pressuposto poderia ser válido para os antagonistas do receptor de IL-1, já que esta é uma citocina que também induz a diferenciação das Th17. No entanto, Anakinra não se mostrou eficaz na AR, o que deixa algumas dúvidas em relação ao seu mecanismo de acção ^[31,40].

Outros agentes dirigidos, como o Rituximab, e bloqueadores da co-estimulação, como Abatacept, melhoraram as respostas em alguns doentes previamente não-responsivos à terapêutica. No entanto, ainda não foi possível induzir a remissão em todos os doentes, com particular dificuldade naqueles cuja terapia prévia com bloqueador de TNF- α não funcionou. Tal facto é mais um apoio à necessidade de direcção da atenção científica para o grupo de novas citocinas, como as IL-17, reguladoras fundamentais da resposta inflamatória ^[39,59,66].

4.2.2. Novas Abordagens

Actualmente, na era da terapêutica dirigida e com objectivo delineado, investigadores procuram desenvolver novas moléculas para um grande número de alvos da cascata inflamatória. A inibição selectiva de citocinas continua a ser a área de investigação preferencial, seguida da abordagem dirigida para células e, por último, os mais recentes inibidores para pequenas moléculas ^[67].

Ustekinumab é um anticorpo monoclonal Humano com actividade na subunidade p40 da IL-12 e IL-23, que tem sido testado em doenças como psoríase, esclerose múltipla, doença de Crohn [7,15]. Ao considerar a acção destas citocinas na inflamação, não admira que a inibição de IL-23 seja de interesse em doenças que envolvem as células Th17, enquanto a inibição de IL-12 interessa aquelas que envolvem as Th1 ou ambas. O mecanismo de acção imunológico deste fármaco é ainda desconhecido e ainda não há muita informação sobre a sua eficácia na AR. Outras moléculas, como a STA-5326, têm sido avaliadas para o bloqueio da família de citocinas IL-12. Novas evidências serão necessárias para concluir a eficácia e benefícios da sua implementação ^[67].

Uma outra possível abordagem das doenças reumáticas inclui as tirosina cinases. Após a aplicação clínica do Imatinib em várias doenças oncológicas, surgem outros fármacos inibidores destas enzimas, como o Tofacitinib, um inibidor da *Janus* cinase 3. Os resultados iniciais com este fármaco têm sido promissores e espera-se, num futuro próximo, iniciar ensaios de fase 2 ^[67].

O leque de potenciais alvos terapêuticos inclui muitos outros elementos além dos referidos, como por exemplo proteases, canais iónicos, respostas do sistema imune inato, sendo um tema muito extenso e discurso para outra revisão. Em resumo, o desafio actual prende-se com a identificação de como melhor integrar estas novas e avançadas terapias na prática clínica do dia-a-dia e como avaliar a sua segurança e eficácia a longo termo ^[66,67].

5. Discussão: Th17/IL-17 targeting

Como foi referido na introdução ao tratamento da AR, uma significativa proporção de doentes não responde totalmente aos agentes disponíveis, e as taxas de remissão a longo-termo permanecem baixas; assim, existe um grande número de afectados com manifestações clínicas de AR estabelecida grave, com repercussões nefastas na sua qualidade de vida. Tendo em conta os efeitos pro-inflamatórios exuberantes da IL-17, acima descritos, e a sua presença em maior número ser numa fase inicial com potencial de resposta terapêutica elevado, parece sensato pensar no bloqueio desta para limitar a inflamação.

As estratégias para o bloqueio de efeitos de uma molécula como a IL-17 podem convergir para mecanismos prévios ou posteriores à sua produção, além da citocina em si. Exemplos desta premissa são a evidência dada pelo uso de fármacos como o Etanercept ou o Tocilizumab, que ao inibirem TNF- α e a IL-6 actuam na diferenciação das células Th17, e a depleção de células B, que diminui a produção de citocinas de diferenciação Th17/indução IL-17 e a quantidade de APCs presente ^[46,67].

As únicas terapias actualmente em estudo direccionadas para a citocina IL-17 *per se* têm por base dois clones de anticorpo monoclonal anti-IL-17, que já se demonstraram efectivos em modelos animais, e no tratamento da psoríase ^[39,46]. Ensaio clínico de fase II para melhor avaliar a sua eficácia, segurança e tolerabilidade estão neste momento a decorrer para casos de doentes com AR ^[46,47]. As observações iniciais de ensaios clínicos de fase I evidenciaram a redução de sinais e sintomas da AR, assim como do valor de DAS28, após o tratamento com estes bloqueadores de IL-17, sem efeitos adversos de preocupação maior (cefaleias, diarreia e, raramente, leucopenia, neutropenia, rinite). No entanto, o papel da IL-17 na defesa do hospedeiro, com acção contra bactérias gram negativas e fungos, não pode ser esquecido: é necessário avaliar correctamente até que ponto estes provocam imunossupressão e se são seguros, não aumentando a propensão a infecções. Outra consideração em causa é o facto da existência de uma família IL-17, na qual pelo menos duas isoformas têm propriedades pro-inflamatórias – IL-17A e IL-17F. O bloqueio eficaz da IL-17 terá de efectuar a neutralização de ambas as moléculas ^[39,46].

Uma abordagem directa para a IL-17 pode também implicar o bloqueio dos seus receptores, moléculas complexas constituídas por pelo menos duas unidades de IL-17RA e um IL-17RC ^[28,32], mas que pode existir em mais de uma forma de junção molecular. Não é ainda claro qual subunidade a considerar como alvo. Outras possíveis propostas

poderão ser o desenvolvimento de inibidores da transdução de sinal, que pudessem actuar tanto no IL-17R como em outros receptores de citocinas da diferenciação de Th17, ou de inibidores dos factores de transcrição essenciais para a Th17, como o RORC ^[46].

A complexidade das células Th17, da sua diferenciação, da plasticidade, do mecanismo, e as incertezas que as rodeiam, tornam essenciais uma bateria de testes pormenorizados para melhor as caracterizar. Os ensaios clínicos em curso seguramente trarão novas informações que complementem a base de conhecimentos já estabelecidos, principalmente em relação ao ser humano.

6. Conclusões

Actualmente considerada uma doença em rápida transição, a AR passa de uma síndrome de causa desconhecida para uma na qual se distinguem vários subtipos. Novas evidências a nível genético e molecular, e o reconhecimento de factores de risco, poderão ser a base para novas estratégias preventivas, dependendo do fenótipo de cada indivíduo.

O estudo da VERA e inflamação inerente permitiu considerar que o bloqueio nesta fase poderá evitar a progressão da doença. Conclui-se que a meta é tratar o mais precocemente possível, havendo ainda limitações, tanto no diagnóstico imediato por falta de acessibilidade do doente ao especialista, como na resposta de cada doente aos diferentes esquemas de tratamento. Para se chegar a uma melhor estratégia de abordagem e para atingir a remissão da doença é necessário evoluir tanto no desenvolvimento de novos fármacos como na diminuição dos custos que tornam a AR mais uma das doenças de dilema médico dos dias de hoje, no qual tratamento efectivo não é acessível a todos os que podem beneficiar dele.

A confirmação da participação e das funções pro-inflamatórias com carácter destrutivo das Th17 e IL-17 na VERA contribui para a ideia de as tornar alvos terapêuticos. No entanto, a pleora de citocinas que também o podem ser, exige a procura de mais conhecimentos, tanto relativamente à patogenia e interacção entre os elementos envolvidos na inflamação, como no papel prioritário exibido pelas diferentes moléculas.

O estudo proposto poderia trazer uma visão da resposta das Th17 a fármacos já vulgarmente utilizados, sendo relevante por efectuar uma descrição da variação destas células num período de tempo no qual o efeito terapêutico estaria no seu pico de acção.

Bibliografia

- [1] Lipsky PE. "Harrison's Principles of Internal Medicine". In: Isselbacher KJ, Braunwald E, Fauci AS, et al. *Rheumatoid arthritis*. 17th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2008; pp 2083-2090
- [2] Ghosh, Amit K., "Mayo Clinic Internal Medicine Review", 8th edition, Mayo Clinical Scientific Press, 2008;pp 971-1030.
- [3] Cascão, R.,Moura R.A., et al. (2010). Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 12(5): R196.
- [4] Firestein GS, Budd RC, Harris ED, McInnes IB, Ruddy S, Sargent JS. "KELLEY'S Textbook of Rheumatology. " 8th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2008.
- [5] Sherine EG, Michaud K. (2009) Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Research & Therapy* 3): 22
- [6] Ferreira LN, Ferreira PL, Baleiro RR. (2008) Qualidade de Vida em Doentes com Artrite Reumatóide. *Acta Reumatol Port* ;33: 331-42.
- [7] Myasoedova, E., Crowson, C. S., Kremers, H. M., Therneau, T. M. and Gabriel, S. E. (2010), "Is the incidence of rheumatoid arthritis rising?: Results from Olmsted County, Minnesota, 1955–2007" *Arthritis & Rheumatism*, 62: 1576–1582.
- [8] Teixeira, Roberto A. et al. (2007) Markers of Endothelial Activation and Autoantibodies in Rheumatoid Arthritis *rev bras reumatol*; v. 47, n.6, p. 411-417.
- [9] Klareskog L, Catrina AI, Paget S. (2009) Rheumatoid arthritis. *Lancet*; 373(9664):659-72
- [10] Carlens C, Hergens MP, Grunewald J, Ekblom A, Eklund A, Hoglund CO, et al. (2010) Smoking, use of moist snuff, and risk of chronic inflammatory diseases. *Am J Respir Crit Care Med*.;181(11):1217-22
- [11] Robert M. Plenge and Soumya Raychaudhuri (2010) Leveraging Human Genetics to Develop Future Therapeutic Strategies in rheumatoid arthritis; *Rheum Dis Clin North Am*. 36(2): 259–270.
- [12] Barton A, Worthington J. (2009) Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: an emerging picture. *Arthritis Rheum*;61(10):1441-6.
- [13] Smolen JS, Aletaha D.(2009) Developments in the clinical understanding of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*;11(1):204.
- [14] Michaud K, Wolfe F. (2007) Comorbidities in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*.;21(5):885-906.
- [15] Bruce TO. (2008) Comorbid depression in rheumatoid arthritis: pathophysiology and clinical implications. *Curr Psychiatry Rep*.;10(3):258-64.

- [16] Mota, L.MH, et al.(2010) Early Rheumatoid Arthritis - Concepts *Rev Assoc Bras*; 56(2):227-9
- [17] Mitchell KL, Pisetsky DS (2007) Early rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 19(3):278-83.
- [18] Symmons DP, Silman AJ. (2006) Aspects of early arthritis. What determines the evolution of early undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis? An update from the Norfolk Arthritis Register. *Arthritis Res Ther*. ;8:214.
- [19] Dixon WG, Symmons DP. (2005) Does early rheumatoid arthritis exist? *Best Pract Res Clin Rheumatol*.;19:37-5
- [20] Sokka T. (2005) Rheumatoid arthritis databases in Finland. *Clin Exp Rheumatol*. ; 23:S201-4.
- [21] van Vollenhoven RF, Askling J. (2005) Rheumatoid arthritis registries in Sweeden. *Clin Exp Rheumatol*.;23:S195-20
- [22] Hitchon CA, Peschken CA, Shaikh S, El-Gabalawy HS. (2005) Early undifferentiated arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*.;31:605-2
- [23] Arnett, F. C., et al. (1987) The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis *Arthritis & Rheumatism*, 31: 315–324.
- [24] Tedesco A, D'Agostino D, Soriente I, Amato P, Piccoli R, Sabatini P. (2009) A new strategy for the early diagnosis of rheumatoid arthritis: a combined approach. *Autoimmun Rev*;8(3):233-7
- [25] Aletaha, D., T. Neogi, et al. (2010). 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Ann Rheum Dis* 69(9): 1580-1588.
- [26] Smolen JS, Landewé R, et al. (2010) “EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs *Ann Rheum Dis*. 69(6):964-967
- [27] Saevarsdottir, S. et al. (2011) Patients With Early Rheumatoid Arthritis Who Smoke Are Less Likely to Respond to Treatment With Methotrexate and Tumor Necrosis Factor Inhibitors *Arthritis & Rheumatism* Vol. 63, No. 1;pp 26–36
- [28] S. Zrioual, M.L. Toh, A. Tournadre, Y. Zhou, M.A. Cazalis, A. Pachot, V. Miossec, P. Miossec, (2008) IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR p CXC chemokine expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood, *J Immunol* 180; pp 655-663
- [29] Wright JF, Bennett F, Li B, Brooks J, Luxenberg DP, Whitters MJ, Tomkinson KN, Fitz LJ, Wolfman NM, Collins M, Dunussi-Joannopoulos K, Chatterjee-Kishore M, Carreno BM. (2008) The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex. *J Immunol*;181(4):2799-805.

- [30] Ivanov S, Lindén A. (2009) Interleukin-17 as a drug target in human disease *Trends Pharmacol Sci.*;30(2):95-103
- [31] Miossec, P. (2009) IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases”*Microbes and Infection* 11: 625-630.
- [32] Gaffen, S. L. (2008). An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* **43**(3): 402-407.
- [33] Heo YJ, Joo YB, Oh HJ, Park MK, Heo YM, Cho ML, Kwok SK, Ju JH, Park KS, Cho SG, Park SH, Kim HY, Min JK. (2010) IL-10 suppresses Th17 cells and promotes regulatory T cells in the CD4+ T cell population of rheumatoid arthritis patients. *Immunol Lett* ;127(2):150-6.
- [34] Parsonage G, Filer A, Bik M, Hardie D, Lax S, Howlett K, Church LD, Raza K, Wong SH, Trebilcock E, Scheel-Toellner D, Salmon M, Lord JM, Buckley CD. (2008): Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNF α . *Arthritis Res Ther*, 10:R47.
- [35] Lubberts, E. (2008). IL-17/Th17 targeting: on the road to prevent chronic destructive arthritis? *Cytokine* 41(2): 84-91.
- [36] McInnes IB, Schett G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*;7(6):429-42.
- [37] Brennan FM, McInnes IB. (2008) Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*;118(11):3537-45.
- [38] Nistala K, Adams S e tal. (2010) Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment *Proc Natl Acad Sci USA*.107(33):14751-6.
- [39] Hueber,A.J.,Asquith D.L,et al.(2010).Embracing novel cytokines in RA - complexity grows as does opportunity! *Best Pract Res Clin Rheumatol* **24**(4): 479-487.
- [40] Gaffen SL. (2009) The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.*;11(5):365-70.
- [41] Goronzy JJ, Weyand CM. (2009) Developments in the scientific understanding of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*;11: 24.
- [42] Toh ML, Gonzales G, Koenders MI, Tournadre A, Boyle D, Lubberts E, Zhou Y, Firestein GS, van den Berg WB, Miossec P. (2010) Role of interleukin 17 in arthritis chronicity through survival of synoviocytes via regulation of synoviolin expression. *PLoS One* 5(10):e13416.
- [43] Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, Lin Z, Zhu B. (2011) IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 407(2):348-54.
- [44] Schett G. (2007) Erosive arthritis. *Arthritis Res Ther.*;9 Suppl 1:S2.
- [45] Cohen SB, Dore RK, Lane NE, Ory PA, Peterfy CG, Sharp JT, van der Heijde D,Zhou L, Tsuji W, Newmark R; (2008) Denosumab Rheumatoid Arthritis Study Group. Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in

- rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum*;58(5):1299-309.
- [46] Sarkar, S. and D. A. Fox (2010). Targeting IL-17 and Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* **36**(2): 345-366.
- [47] van den Berg WB, Miossec P. (2009) IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*;5(10):549-53.
- [48] Plater-Zyberk C, Joosten LA, Helsen MM, Koenders MI, Baeuerle PA, van den Berg WB. (2009) Combined blockade of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin 17 pathways potently suppresses chronic destructive arthritis in a tumour necrosis factor alpha-independent mouse model. *Ann Rheum Dis*;68(5):721-8.
- [49] Kuca-Warnawin E, Burakowski T, Kurowska W, Prochorec-Sobieszek M, Radzikowska A, Chorazy-Massalska M, Maldyk P, Kontny E, Maslinski W. (2011) Elevated number of recently activated T cells in bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: a role for interleukin 15? *Ann Rheum Dis* 70(1):227-233,
- [50] Steinman L. (2007) A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* ;13(2):139-45.
- [51] C. Infante-Duarte, H.F. Horton, M.C. Byrne and T. Kamradt, (2000) Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in TH cells, *J Immunol* **165** (11), pp. 6107–6115.
- [52] Ghilardi N, Ouyang W. (2007) Targeting the development and effector functions of TH17 cells. *Semin Immunol*. 19(6):383-93.
- [53] Niu X, He D, Zhang X, Yue T, Li N, Zhang JZ, Dong C, Chen G. (2010) IL-21 regulates Th17 cells in rheumatoid arthritis. *Hum Immunol*. 71(4):334-41.
- [54] Park H, Li Z, Yang XO, et al. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*;6(11):1133–41.
- [55] Mathur AN, Chang HC, Zisoulis DG, et al. (2007) STAT3 and STAT4 direct development of IL-17-secreting TH cells. *J Immunol*;178(8):4901-6
- [56] Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, et al. (2006) Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol*;7(9):937–4
- [57] Kokkonen H, Söderström I, Rocklöv J, Hallmans G, Lejon K, Rantapää Dahlqvist S. (2010) Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 62(2):383-91.
- [58] Lee YK, Mukasa R, Hatton RD, Weaver CT. (2009) Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr Opin Immunol*. 21(3):274-80.
- [59] Tak PP, Kalden JR. (2011) Advances in rheumatology: new targeted therapeutics. *Arthritis Res Ther*. 13 Suppl 1:S5.
- [60] Bastian H, Feist E, Burmester GR. (2011) Therapeutic strategies in rheumatoid arthritis. *Internist (Berl)*. 52(6):645-656.

- [61] McInnes IB, O'Dell JR. (2010) State-of-the-art: rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* Nov;69(11):1898-906.
- [62] Smolen JS, Aletaha D. (2011) Monitoring rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 23(3):252-8.
- [63] Nisar MK, Ostör AJ. (2010) Disease remission the goal of therapy in rheumatoid arthritis. *Practitioner.* 254(1735):17-21,2.
- [64] Lina C, Conghua W, Nan L, Ping Z. (2011) Combined Treatment of Etanercept and MTX Reverses Th1/Th2, Th17/Treg Imbalance in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J Clin Immunol.* [Epub ahead of print]
- [65] Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, Woodworth T, Alten R; (2008) OPTION Investigators. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet.* 371(9617):987-97.
- [66] Breedveld FC, Combe B. (2011) Understanding emerging treatment paradigms in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 13 Suppl 1:S3. PubMed PMID:21624182.
- [67] Waldburger JM, Firestein GS. (2009) Garden of therapeutic delights: new targets in rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 11(1):206.